

Luiz Gustavo de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE CONDRITIM
SULFATO E GLUCOSAMINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE
ULCERATIVA EM RATOS**

Juiz de Fora
2013

Luiz Gustavo de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE CONDRITIM
SULFATO E GLUCOSAMINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE
ULCERATIVA EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Saúde Brasileira da Universidade
Federal de Juiz de Fora para a
obtenção do título de Mestre em Saúde
Brasileira.

Orientador: Prof. Dr. Júlio Maria Fonseca Chebli.

Co-orientador: Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar.

Juiz de Fora
2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira, Luiz Gustavo de.

Avaliação da atividade anti-inflamatória de condroitim sulfato e glucosamina em modelo experimental de colite ulcerativa em ratos. / Luiz Gustavo de Oliveira. -- 2013. 94 p. : il.

Orientador: Julio Maria Fonseca Chebli

Coorientador: Jair Adriano Kopke de Aguiar

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2013.

1. Colite ulcerativa. 2. Condroitim sulfato. 3. Glucosamina. 4. Dextran sulfato de sódio. I. Chebli, Julio Maria Fonseca, orient. II. Aguiar, Jair Adriano Kopke de, coorient. III. Título.

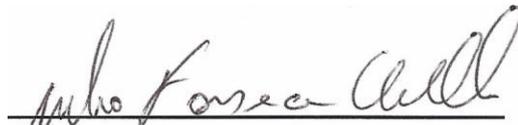
LUIZ GUSTAVO DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE CONDROITIM SULFATO E
GLUCOSAMINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE ULCERATIVA EM
RATOS

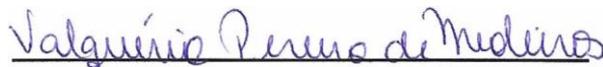
Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Mestrado - área de concentração
em Saúde Brasileira do Programa de Pós-
Graduação em Saúde da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal de Juiz
de Fora, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Saúde.

Aprovado em: 22/03/2013

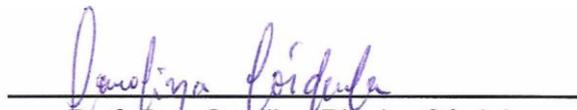
Banca Examinadora



Pr Dr. Julio Maria Fonseca Chebli
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. ra. Valquíria Pereira de Medeiros
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dra. Carolina Ribeiro Córdula
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

“Hoje levantei pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite. É minha função escolher que tipo de dia terei hoje... Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho. Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus por ter um teto pra morar. Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas amizades. Se as coisas não saírem como planejei, posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar. O dia está na minha frente, esperando para ser o que eu quiser...”
(Charles Chaplin)

Dedico este trabalho á minha MÃE, exemplo de mulher, força e dedicação, pois sem esse sonho teria acontecido. Agradeço também pelo apoio e incentivo dado por ela em toda essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao Jair, pela orientação, por todas as oportunidades, confiança e apoio nestes anos de trabalho, pela paciência em ensinar e a grande amizade que formamos neste tempo.

Ao prof. Júlio Chebli e Amaury pela oportunidade de concluir mais esta etapa na minha vida.

À prof. Christina pelos ensinamentos e participação no trabalho.

Aos professores membros da banca, Valquíria e Hugo, por terem aceitado analisar o trabalho.

À Cris, pela paciência e incentivo durante todo este tempo.

Ao meu grande amigo André, pelo apoio e incentivo no laboratório desde a graduação.

Aos amigos de laboratório, Pedro, Rafael, Camila M., Camila B., Pillar, Sarah, Miramar, Haryane, Shaira, pelos momentos de descontração e risadas.

À Camila Balbino e Bruna pela ajuda durante os experimentos.

À Ana Paula pelo esforço em me ajudar na aquisição de imagens das lâminas.

À todos os prof. do programa de pós-graduação em Saúde Brasileira.

À minha mãe, meu irmão e o Kaíque que estiveram sempre me apoiando e incentivando a todo o momento.

RESUMO

Doenças inflamatórias intestinais, entre elas colite ulcerativa e doença de Crohn, compreendem um amplo espectro de afecções que apresentam em comum inflamação crônica do trato gastrointestinal. Colite ulcerativa afeta exclusivamente o cólon e o reto, possui etiologia ainda pouco conhecida podendo estar relacionada com fatores ambientais, genéticos e de resposta imune. O tratamento se baseia em medicamentos como aminossalicilatos, glicocorticóides e imunossupressores, porém seus efeitos colaterais atrapalham a adesão do paciente ao tratamento por longos períodos. Condroitim sulfato (CS) e glucosamina (GlcN) são atualmente indicados para o tratamento de doenças inflamatórias, como a osteoartrite, principalmente por apresentarem efeito anti-inflamatório ao diminuírem a ação do fator de transcrição NF- κ B diminuindo a expressão de metaloproteases (MMP), TNF- α , iNOS entre outros mediadores inflamatórios. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos da associação de CS e GlcN na colite ulcerativa experimental induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) em ratos Wistar. Para isso foram avaliados o índice de atividade da doença (IAD), parâmetros hematológicos e bioquímicos, morfológicos e a atividade de MMP-2 e -9 da matriz extracelular no intestino grosso, concentração de NO tecidual e concentração de glicosaminoglicanos. Os animais foram divididos em quatro grupos: (1) controle, (2) controle + CS/GlcN, (3) DSS, (4) DSS + CS/GlcN. Observamos que o tratamento com CS/GlcN melhorou a severidade da colite aguda em ratos, verificado pela redução do *score* histológico e melhora de parâmetros hematológicos. CS/GlcN também reduziu a destruição de células calciformes observados pelo azul de alcian, bem como a produção de óxido nítrico, a atividade de mieloperoxidase e metaloproteases, principalmente de MMP-9. Além disso, foi observado uma redução na concentração de GAGs total no grupo DSS + CS/GlcN quando comparado ao grupo DSS. Portanto, a administração de CS/GlcN apresentou melhoras em alguns dos parâmetros avaliados principalmente na atividade de MMP-9, mostrando um potencial destes compostos para futura utilização no tratamento dessa patologia.

PALAVRAS-CHAVE: Doença Inflamatória Intestinal. Colite ulcerativa. Dextran sulfato de sódio. Condroitim Sulfato. Glucosamina.

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease, including ulcerative colitis and Crohn's disease comprising a broad spectrum of diseases those have in common chronic inflammation of the gastrointestinal tract. Ulcerative colitis affects only the colon and rectum, has still poorly understood etiology and this could may be related to environmental factors, genetic and immune response. Treatment is based on drugs as aminosalicylates, immunosuppressants and glucocorticoids, but its side effects hinder patient compliance with treatment for long periods. Chondroitin sulphate (CS) and glucosamine (GlcN) are currently indicated for treatment of inflammatory diseases such as osteoarthritis, mainly because of the anti-inflammatory effect by decreasing the activity of transcription factor NF- κ B and decreasing the expression of metalloproteases (MMP), TNF- α , iNOS and other inflammatory mediators. The objective of this study was to analyze the effects of the combination of CS and GlcN in experimental ulcerative colitis model induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats. To do so we evaluated the disease activity index (DAI), haematological and biochemical parameters, morphological changes and activity of MMP-2 and -9, NO and glycosaminoglycans concentration in the large intestine. Animals were divided into four groups: (1) control, (2) control + CS / GlcN, (3) DSS-induced colitis, (4) DSS + CS / GlcN. We observed that treatment with CS/GlcN improved the severity of acute colitis in rats verified by histological score reduction and improvement in hematological parameters. CS/GlcN also reduced goblet cells destruction observed by alcian blue, as well as nitric oxide production, the activity of myeloperoxidase and metalloproteases, especially MMP-9. Moreover, we observed a reduction in the concentration of total GAG + DSS group CS / GlcN when compared to DSS. Therefore, administration of CS/GlcN showed improvements in some of the parameters evaluated mainly on the activity of MMP-9, showing a potential future use of these compounds for the treatment of this pathology.

KEYWORDS: Inflammatory Bowel Disease. Ulcerative colitis. Dextran sodium sulfate. Chondroitin sulfate. Glucosamine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Influência dos fatores ambientais, genéticos e sistema imune na patogênese da DII. Uma variedade de fatores ambientais podem modificar a expressão de genes em indivíduos susceptíveis e modular a função do sistema imune intestinal resultando em uma resposta inflamatória..... 14
- Figura 2. Mecanismo molecular de ativação do NF-kB. Fosforilação de I κ B α pelo complexo IKK permitindo a translocação do NF-kB para o núcleo para iniciar transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória. Adaptado de Zingarelli *et al.*, 2003..... 22
- Figura 3. Estrutura básica de metaloproteases de matriz, mostrando os principais domínios (SP: peptídeo sinal; Pro: pró-domínio; SH, grupo tiol; Zn, zinco). A interação do grupo tiol no pró-domínio com o Zn⁺² no domínio catalítico mantém a MMP em estado inativo. Adaptado de Ravi *et al.*, 2007... 24

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Características de alguns modelos animais de colite por indução química. Adaptado de ELSON <i>et al.</i> , 1995. | 21 |
|---|----|

SUMÁRIO

| | | |
|------|--|----|
| 1 | Introdução | 12 |
| 1.1 | Doença Inflamatória Intestinal | 12 |
| 1.2 | Epidemiologia..... | 13 |
| 1.3 | Etiologia..... | 14 |
| 1.4 | Tratamento da doença inflamatória intestinal..... | 18 |
| 1.5 | Modelos animais de doença inflamatória intestinal | 19 |
| 1.6 | Colite e fator de transcrição nuclear kappa b | 21 |
| 1.7 | Colite e metaloproteases..... | 23 |
| 1.8 | Colite e óxido nítrico | 26 |
| 1.9 | Proteoglicanos e glicosaminoglicanos de matriz no cólon..... | 27 |
| 1.10 | Condroitim sulfato e Glucosamina | 28 |
| 2 | Justificativa do trabalho..... | 30 |
| 3 | Objetivos | 31 |
| 3.1 | Objetivo geral: | 32 |
| 3.2 | Objetivos específicos:..... | 32 |
| 4 | Material e métodos | 33 |
| 4.1 | Animais..... | 33 |
| 4.2 | Indução colite por DSS..... | 33 |
| 4.3 | Avaliação do índice de atividade da doença | 34 |
| 4.4 | Avaliação de parametros bioquímicos e hematológicos..... | 34 |
| 4.5 | Análise histológica..... | 35 |
| 4.6 | Atividade de mieloperoxidase (MPO) | 35 |
| 4.7 | Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) | 36 |
| 4.8 | Atividade das metaloproteases | 36 |
| 4.9 | Extração e análise de glicosaminoglicanos | 37 |
| 4.10 | Análise estatística | 38 |
| 5 | Resultados | 38 |
| 6 | Conclusão | 81 |
| | Referências | 83 |
| | Anexos | 90 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

As doenças inflamatórias intestinais (DII) compreendem um amplo espectro de patologias que apresentam em comum inflamação crônica do trato gastrointestinal, que podem ter ou não uma causa ou agente patogênico específico. O termo DII idiopática refere-se àquelas que não possuem uma etiologia conhecida. Incluídas nesta classificação estão colite ulcerativa, e a doença de Crohn (AHN *et al.*, 2001; PODOLSKY, 2002; STROBER; LUDVIKSSON; FUSS, 1998).

Diferenças nas características dos processos inflamatórios na colite ulcerativa e na doença de Crohn são observadas. Na colite, a inflamação se restringe ao cólon e reto, sendo encontrado infiltrado inflamatório na mucosa intestinal. Estes infiltrados consistem principalmente de linfócitos, células plasmáticas e granulócitos. Outras características típicas incluem distorções das criptas, depleção de células caliciformes e ulcerações (DANESE; FIOCCHI, 2011). Já na doença de Crohn, qualquer segmento do trato digestivo, desde a boca até o ânus, pode ser afetado sendo caracterizada por um processo inflamatório transmural frequentemente granulomatoso podendo apresentar também outras complicações como estenoses, abscessos e fístulas (BAUMGART; CARDING, 2007).

A colite ulcerativa apresenta sintomas e sinais clínicos típicos de uma doença recidivante tendo como principal manifestação clínica diarreia sanguinolenta com ou sem a presença de muco, podendo ser observado também, febre, perda do peristaltismo e da rigidez da parede intestinal. Na doença de Crohn ocorrem ataques intermitentes de diarreia, febre e dor abdominal (DANESE; FIOCCHI, 2011).

O prognóstico para pacientes com colite geralmente é bom nos primeiros 10 anos após o diagnóstico e ao longo do tempo a remissão ocorre na maioria dos casos. Complicações agudas como sangramentos e megacólon tóxico podem ocorrer em pacientes com inflamações extensas e severas, displasia epitelial e câncer também pode aparecer na fase crônica da doença (DANESE; FIOCCHI, 2011).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Colite ulcerativa e doença de Crohn são doenças de uma sociedade moderna e sua frequência em países desenvolvidos tem crescido desde o século 20. Uma alta incidência e prevalência das DII são observadas nas populações do norte da Europa e América do Norte e uma menor incidência e prevalência na população asiática, onde a colite é a forma mais comum de DII (AHUJA; TANDON, 2010).

Embora nos países em desenvolvimento seja observada menor prevalência de DII, a sua incidência tem aumentado em alguns destes países que vem se industrializando (ex. China e Índia) (MOLODECKY; KAPLAN, 2010).

Um ambiente e estilo de vida ocidentalizado estão ligados ao aparecimento de DII (DANESE; SANS; FIOCCHI, 2004), parece haver também diferenças na incidência das DII relacionadas ao sexo. Em geral existe uma pequena predominância do sexo feminino na doença de Crohn enquanto que na colite ulcerativa essa predominância tende ao sexo masculino (LOFTUS, 2004).

Em uma revisão de literatura realizada por Loftus 2004, a incidência da colite ulcerativa foi de 1,2 a 20,3 casos por 100.000 habitantes por ano, e sua prevalência foi de 7,6 a 246 casos por 100.000 habitantes por ano, enquanto que a doença de Crohn possui uma incidência de 0,03 a 15,6 casos por 100.000 habitantes e uma prevalência de 3,6 a 214 casos por 100.000 habitantes por ano. Entre as crianças, no entanto, a colite ulcerativa é menos prevalente do que a doença de Crohn (KUGATHASAN; COHEN, 2008).

Na América Central e do Sul, dados epidemiológicos sobre DII ainda são escassos, o que demonstra a raridade destas doenças ou de seus registros insuficientes para serem avaliadas. No Brasil, poucos são os estudos sobre os aspectos epidemiológicos das DII. A maioria deles apenas descrevem as características clínicas e a frequência de internação devido as DII, sem nenhuma referência à incidência e prevalência dessas doenças em termos populacionais. Victoria *et al.* 2009, em estudo realizado na região centro-oeste do estado de São Paulo avaliando a incidência e a prevalência das DII, verificaram uma prevalência de 14,81 e 5,65 casos por 100 mil habitantes de colite ulcerativa e doença de Crohn respectivamente. Apesar de estes números estarem abaixo da prevalência mundial, representam um aumento considerável no número de casos.

1.3 ETIOLOGIA

A etiologia das DII permanece ainda desconhecida. Uma das hipóteses utilizadas para a patogênese das DII é uma excessiva resposta imune adquirida a algumas bactérias entéricas comensais em indivíduos susceptíveis geneticamente, além de fatores ambientais que possam precipitar o início da doença (SARTOR, 2006). (Figura 1)

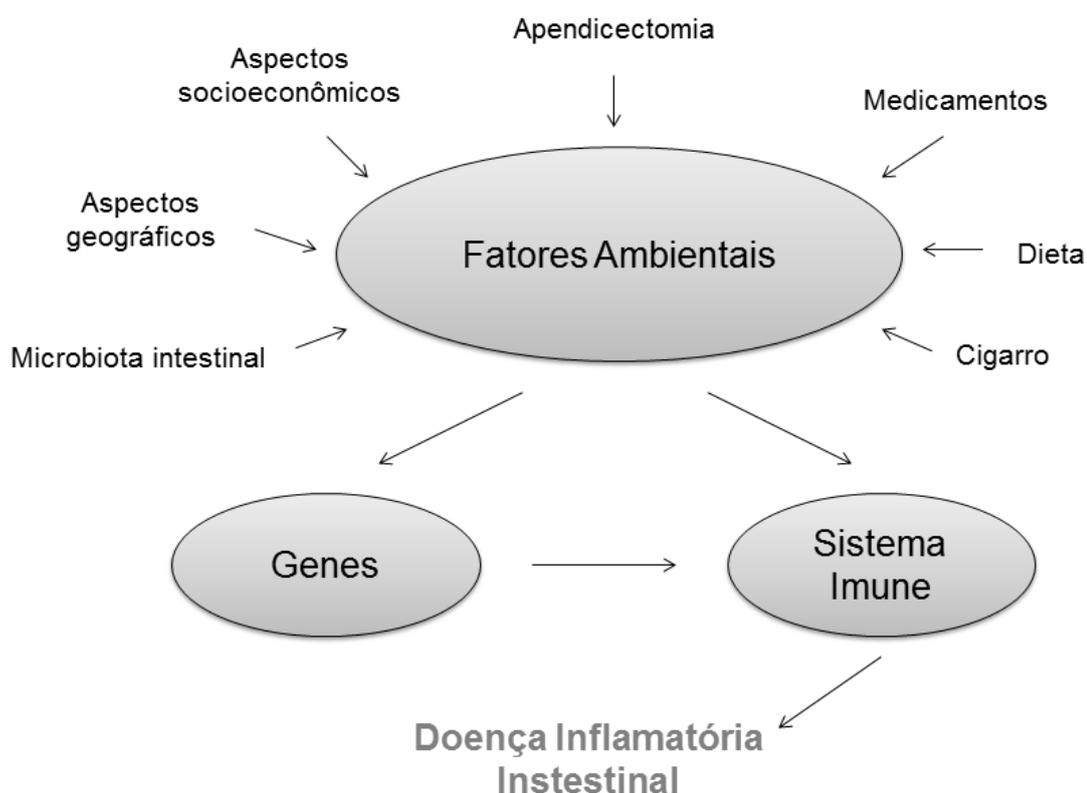


Figura 1. Influência dos fatores ambientais, genéticos e sistema imune na patogênese da DII. Uma variedade de fatores ambientais podem modificar a expressão de genes em indivíduos susceptíveis e modular a função do sistema imune intestinal resultando em uma resposta inflamatória.

1.3.1 FATORES AMBIENTAIS

Alguns fatores ambientais já tiveram sua associação com as DII demonstradas por meio de estudos clínicos, epidemiológicos e experimentais. Entre eles podemos citar cigarro, dieta, medicamentos, área geográfica, condição social, estresse, permeabilidade intestinal e apendicectomia (DANESE; SANS; FIOCCHI, 2004).

Exemplo indiscutível da influência de fatores ambientais na DII, o tabaco é um importante fator de risco para doença de Crohn, enquanto que a colite ulcerativa acomete com maior frequência os pacientes não fumantes e pessoas que pararam de fumar (RUBIN; HANAUER, 2000). Os mecanismos envolvidos neste efeito controverso na doença de Crohn e colite ainda não estão esclarecidos, mas sabe-se que fumar afeta o sistema imune sistêmico alterando funções da resposta imune inata e adaptativa (SOPORI, 2002).

Outro exemplo é a variação geográfica encontrada nas taxas de incidências das DII. Estudos demonstraram um gradiente entre o norte-sul na incidência das DII na América do Norte e Europa sendo mais comum em altas latitudes e em menor grau do leste para oeste, podendo atribuir essa diferença ocidental para oriental ao estilo de vida (DANESE; SANS; FIOCCHI, 2004; KARLINGER *et al.*, 2000). Tradicionalmente, as DII também têm sido mais prevalentes entre os grupos socioeconômicos mais altos e na zona urbana afetando mais indivíduos da raça branca, sem distinção entre colite e doença de Crohn (DANESE; SANS; FIOCCHI, 2004). Como explicação para esse comportamento foi levantada a “hipótese da higiene” que propõem que o aumento de distúrbios imunológicos pode ser relacionado à baixa exposição a antígenos entéricos e melhores condições sanitárias na infância. Assim, isso poderia levar a uma maior susceptibilidade ao indivíduo adulto para uma resposta imune inapropriada quando exposto a antígenos (infecção gastrointestinal) (MOLODECKY; KAPLAN, 2010).

A microflora intestinal e seus produtos também são importantes fatores ambientais na patogênese das DII em humanos e em vários modelos animais. A microbiota presente no íleo distal e no cólon fornece uma fonte abundante de organismos potencialmente prejudiciais, ligantes e antígenos que podem ativar a resposta imune inata e adaptativa. Estas bactérias e seus produtos biologicamente ativos estão associados à mucosa intestinal e à indução de uma resposta imune fisiológica e patofisiológica (SARTOR, 2008). Vários microrganismos são considerados como possíveis fatores etiológicos das DII, incluindo, *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia tracomatis*, *Cytomegalovirus* e *Escherichia coli* (DANESE; SANS; FIOCCHI, 2004). A importância da flora intestinal também é comprovada por estudos em alguns modelos animais, já que colite não foi observada quando os animais foram mantidos

em ambientes “*germ-free*”, mas somente com a reconstituição da microflora intestinal (NELL; SUERBAUM; JOSENHANS, 2010).

O mecanismo pelo qual as bactérias podem levar a iniciação e ou propagação do processo inflamatório intestinal pode ser relacionado com o aumento da permeabilidade local e desencadeamento de uma resposta imune (GERSEMANN; WEHKAMP; STANGE, 2012).

1.3.2 GENÉTICA

Estudos epidemiológicos e populacionais demonstraram fortes evidências que fatores genéticos possuem papel importante na susceptibilidade das DII. Entre essas, estão a maior incidência e prevalência em certas populações e a ligação familiar entre os pacientes (PODOLSKY, 2002).

As evidências mais convincentes aparecem em estudos realizados com gêmeos monozigóticos em que a taxa de concordância da doença de Crohn chega a 58% dos casos enquanto que nos gêmeos dizigóticos a taxa de concordância não possui tanta diferença para outros irmãos. Já gêmeos monozigóticos com colite ulcerativa a taxa fica entre 6-17% dos casos (BOUMA; STROBER, 2003). Assim pode-se sugerir que doença de Crohn possui maior influência de fator genético que colite ulcerativa.

Muito dos genes considerados de risco para as DII estão envolvidos no reconhecimento e processamento de antígenos microbianos da superfície da mucosa. Dessa forma um processamento anormal de moléculas microbianas por componentes do sistema imune é geralmente relacionado com a iniciação da inflamação, seguida por uma resposta imune adaptativa exagerada gerando a produção de moléculas pró-inflamatória e dano tecidual (SCHARL; ROGLER, 2012).

Uma meta-análise de estudos associado ao genoma, identificou na doença de Crohn no mínimo 71 *loci* replicados como NOD2, ATG16L1, IRGM, NALP3, etc. Já para colite ulcerativa foram identificadas 47 *loci* incluindo IL1R2, IL8RA-IL8RB, IL7R, IL12B, DAP, PRDM1, JAK2, IRF5, GNA12 (SCHARL; ROGLER, 2012).

Entre estes, NOD2, ATG16L1 e IRGM têm chamado a atenção para imunidade inata em geral e mais especificamente sobre o reconhecimento microbiano e autofagia sendo que em pacientes com doença de Crohn as mutações que ocorrem provocam defeitos na autofagia e apresentação de antígeno (LEES *et*

al., 2011; SCHARL; ROGLER, 2012). Enquanto NOD2 e variantes de genes de autofagia não influenciam a colite ulcerativa, estudos mostram que ECM1, CDH1, HNF4A, LAMB1 e GNA12 são genes relacionados à barreira epitelial e especialmente envolvidos no colite ulcerativa (LEES *et al.*, 2011).

Como exemplo de envolvimento genético nas DII, o gene que codifica a proteína NOD2 também conhecida como CARD15, expresso em macrófagos, pode servir como um receptor de reconhecimento padrão a lipopolissacarídeos bacterianos e regular a ativação de NF-κB, foi encontrado com mais variantes em indivíduos norte-americanos e europeus com DII do que indivíduos sem a doença. Essas variantes parecem resultar em uma redução da ativação de NF-κB por macrófagos e isso pode desencadear um desequilíbrio da homeostase (PODOLSKY, 2002).

1.3.3 SISTEMA IMUNE

No intestino normal, existe uma tolerância ou uma supressão da resposta imune contra não-patógenos (flora comensal ou antígenos da dieta) no lúmen intestinal. Na DII existem evidências de que este estado de tolerância a componentes da flora intestinal é perdido (MAYER, 2010).

O efeito agregado de alterações genéticas e presença de fatores ambientais está sustentado pela resposta imune da mucosa intestinal, entretanto, restam dúvidas se essa resposta foi desencadeada por um defeito intrínseco (ativação constitutiva ou falha no mecanismo de regulação) ou por conta do estímulo contínuo resultante de uma alteração na barreira de células epiteliais intestinais (PODOLSKY, 2002; SCHMITZ *et al.*, 1999).

Existem dois componentes básicos na resposta imune, a resposta imune inata e adaptativa. A imunidade inata é a forma mais simples de imunidade, em que carece de especificidade e memória para antígenos em que teve contato. É responsável pela primeira linha de defesa, em que a localização e eliminação do patógeno invasor são muito importantes para o hospedeiro (MAYER, 2010).

Já a resposta imune adaptativa ocorre por conta de uma incapacidade do sistema imune inato responder a uma reinfecção ou a um grande número de patógenos que sobrecarregam a resposta inata. A imunidade adaptativa é

caracterizada por especificidade e memória e em grande parte mediada por linfócitos T e B (MAYER, 2010).

Na colite, existe uma reação imunológica predominantemente por linfócitos Th2, enquanto na doença de Crohn existe um predomínio de Th1 (PODOLSKY, 2002). Na doença de Crohn estão aumentadas a secreção de fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon (IFN- γ) e interleucinas-1 e 12, já na colite ulcerativa são as interleucina-4, 5 e 13 (MAYER, 2010).

A ativação de células imunes é posteriormente acompanhada pela produção de mediadores de inflamação não específicos, como: outras citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, assim como metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos) e espécies reativas do oxigênio. Esses mediadores intensificam o processo inflamatório e a destruição tecidual, o que resulta nas manifestações clínicas da doença. O recrutamento adicional de leucócitos do espaço vascular para os sítios da doença é importante para a continuidade do processo inflamatório (PODOLSKY, 2002).

1.4 TRATAMENTO DA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Atualmente vários tipos de tratamentos clínicos das DII têm sido empregados para seu controle. Os medicamentos mais utilizados incluem aminossalicilatos, imunossupressores, corticosteróides, imunomoduladores e antibióticos, que são usados tanto para a indução da remissão clínica, como para a manutenção deste estado. Estas drogas têm a capacidade de reduzir as lesões inflamatórias e atenuar a expressão de algumas moléculas pró-inflamatórias. (STENSON; KORZENIC, 2003).

Entre os medicamentos mais utilizados pelos serviços de saúde para o tratamento das DII estão os corticosteróides, sulfassalazina, mesalazina e azatioprina, de acordo com recomendações nacionais (BRASIL, 2002a; BRASIL 2002b) e internacionais (CARTER; LOBO; TRAVIS, 2004).

Os efeitos benéficos destes medicamentos se contrapõem a uma variedade de efeitos colaterais que podem variar desde apenas mal-estar até a incidência de problemas mais graves. No caso de corticosteróides, até 50% dos pacientes apresentar efeitos como síndrome de Cushing, hipertensão arterial e catarata, os

aminossalicilatos podem provocar distúrbios gastrointestinais e a azatioprina pode ocasionar efeitos mais graves como febre, leucopenia e pancreatite (BRASIL, 2002a; BRASIL 2002b; CARTER; LOBO; TRAVIS, 2004).

Assim, a eficácia dos regimes terapêuticos para o tratamento das DII depende da estrita adesão dos pacientes ao tratamento prescrito, e por serem tratamentos longos, os seus efeitos colaterais atrapalham muito essa adesão.

1.5 MODELOS ANIMAIS DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Durante a última década, mais de 30 modelos de experimentação animal para DII foram desenvolvidos, apresentando variadas manifestações clínicas como observadas na DII em humanos, com o objetivo de elucidar a patogênese da doença (BYRNE; VINEY, 2006; MELGAR *et al.*, 2008).

Estes modelos contribuem para importantes avanços no entendimento dos mecanismos de inflamação e de patogênese da DII bem como o tratamento. Em geral um modelo de animal ideal deve apresentar algumas características fundamentais: o intestino deve apresentar alterações morfológicas, inflamação, sinais e sintomas, fisiopatologia e curso similar ou idêntico a DII humana (JURJUS; KHOURY; REIMUND, 2004).

Os modelos experimentais de inflamação intestinal podem ser classificados em espontâneos ou induzidos, sendo que todos eles são utilizados para estudos de inflamação aguda e crônica. Os mais utilizados são os modelos induzidos por substâncias químicas tóxicas (TABELA 1) tais como ácido acético, indometacina, ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS/etanol) ou por polissacarídeos como carrageninas e dextran sulfato de sódio (ELSON *et al.*, 1995).

Nos modelos químicos a lesão aguda do cólon é induzida após administração intracolônica de ácido acético, TNBS/etanol, ou outras substâncias capazes de produzir lesão epitelial do cólon seguido pelo rápido influxo de granulócitos e monócitos definindo as características da inflamação intestinal aguda (DIELEMAN *et al.*, 1997).

Já no modelo induzido por polissacarídeos, dextran sulfato de sódio (DSS), a colite é caracterizada por uma lesão aguda do cólon inicial, seguida por uma lenta regeneração do cólon (OKAYASU *et al.*, 1990). A forma ativa deste modelo é

precedida por dano epitelial não-inflamatório, provavelmente como consequência de um efeito tóxico direto do DSS sobre células epiteliais do cólon, uma característica patogênica hipoteticamente partilhada também pela colite ulcerativa (COOPER *et al.*, 1993).

A colite é induzida pela adição de DSS na água ingerida pelos animais e dependendo da concentração, duração e frequência de administração estes podem desenvolver colite aguda, crônica e displasia induzida pela colite (PERSE; CERAR, 2012).

DSS é um polissacarídeo sulfatado com uma ampla variação de peso molecular de 5 kDa podendo chegar a 1400 kDa, e seu peso molecular é um fator que pode interferir na indução de colite. Em ratos tratados com DSS de 500 kDa não houve aparecimento de lesões no intestino grosso, enquanto que DSS de 40kDa desenvolveu colite mais severa e difusa quando comparada ao DSS de 5kDa (KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 2000).

O exato mecanismo pelo qual o DSS induz colite é desconhecido, mas sabe-se que o DSS é tóxico para células epiteliais do cólon provocando a perda da integridade da barreira epitelial, tanto que as moléculas de DSS (alto peso molecular) penetram a mucosa. Estudo da análise da ingestão e distribuição do DSS demonstrou que este penetra na mucosa intestinal, podendo ser encontrada no baço, fígado e rins (PERSE; CERAR, 2012; SOLOMON *et al.*, 2010). As primeiras alterações relacionadas à ingestão do DSS foram observadas já no primeiro dia de administração em que houve perda do complexo de “*tight junctions*” e zonas de oclusão com aumento significativo na expressão de citocinas pró-inflamatórias no cólon (PERSE; CERAR, 2012; SOLOMON *et al.*, 2010).

Características clínicas observadas na colite induzida por DSS refletem as observadas em humanos com DII. A colite aguda é induzida por administração contínua de DSS 2-5% por um período de 4-9 dias. As manifestações clínicas na fase aguda podem incluir perda de peso, diarreia, sangue oculto nas fezes, anemia e eventual morte (PERSE; CERAR, 2012). Já as alterações histológicas são caracterizadas por erosões da mucosa, depleção mucinas, degeneração epitelial, presença de infiltrado de células de fase aguda, confinadas na lâmina própria, dano celular limitado à mucosa e lâmina própria além do aumento de citocinas pró-

inflamatórias e quimiocinas (MELGAR; KARLSSON; MICHAELSSON, 2005; OKAYASU *et al.*, 1990; PERSE; CERAR, 2012).

De acordo com Gaudio *et al.* 1999 o modelo experimental de colite induzido por DSS é altamente reprodutível além de compartilhar muitas características, não apenas estruturais e clínicas, mas também ultra-estruturais com a colite ulcerativa em humanos, sendo que os inúmeros trabalhos publicados demonstram a eficácia dos modelos experimentais para o estudo dessa doença, avaliando aspectos de biologia molecular, fisiologia, efeitos de drogas, e protetores ou indutores de colite ulcerativa.

Tabela 1. Características de alguns modelos animais de colite por indução química. Fonte: adaptado de ELSON *et al.*, 1995.

| Características | Ácido acético | TNBS/etanol | Indometacina | DSS |
|---------------------|---|---|--|----------------------------------|
| Espécies de animais | Rato, camundongo, coelho. | Rato, camundongo, coelho. | Rato, cachorro, coelho. | Rato e camundongo. |
| Área envolvida | Reto (enema), cólon direito ou íleo (laparotomia) | Cólon distal (enema), íleo (laparotomia) | Intest. Delgado distal e ceco | Cólon esquerdo > direito |
| Curso da doença | | | | |
| Pico | 1-3 dias | 2-3 dias | 2-3 dias | 7-10 dias |
| Duração | 2-3 dias (camundongos) / 2-3 semanas (outros) | 8 semanas (ratos) / 2-3 semanas (camundongos) | 7-10 dias (ratos Fisher) / (>11 ratos Lewis) | 2-3 semanas (um ciclo de 7 dias) |
| Reprodutibilidade % | 100 | 90 - 100 (ratos) | 90 - 100 | 100 |

1.6 COLITE E FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KAPPA B

O fator nuclear-kB (NF-kB) é um fator de transcrição que realiza importante papel, tanto em situações normais como na coordenação de respostas imunes e adaptáveis, regulando a expressão de mediadores inflamatórios (ZINGARELLI; SHEEHAN; WONG, 2003).

A família NF-kB/Rel inclui NF-kB1 (p50/p105), NF-kB2 (p52/p100), p65 (RelA), RelB, e c-Rel. Os principais membros desta família podem formar homodímeros e heterodímeros, sendo a forma ativa mais prevalente de NF-kB um heterodímero formado pelos polipeptídeos p50 e p65 (TAK; FIRESTEIN, 2001).

Em condições basais o NF- κ B existe no citoplasma em sua forma inativa associada com proteínas regulatórias, chamadas inibidores do κ B (I κ B), entres os quais se destacam I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ (TAK; FIRESTEIN, 2001). Estes inibidores impedem a translocação do NF- κ B para o núcleo, mantendo-o no citoplasma (ZINGARELLI; SHEEHAN; WONG, 2003).

O principal passo que leva a ativação do NF- κ B envolve fosforilação dos I κ B em resposta a uma variedade de sinais pró-inflamatórios, como endotoxinas, fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas 1- β (IL-1 β), bactérias, vírus, etc. Essa fosforilação é mediada pelo complexo kinase- κ B (IKKs), composto por três subunidades, IKK- α , IKK- β e IKK γ . Após fosforilação ocorre a degradação da I κ B permitindo a translocação do NF- κ B ao núcleo onde é transcrito genes relacionados a inflamação (TAK; FIRESTEIN, 2001; ZINGARELLI; SHEEHAN; WONG, 2003).

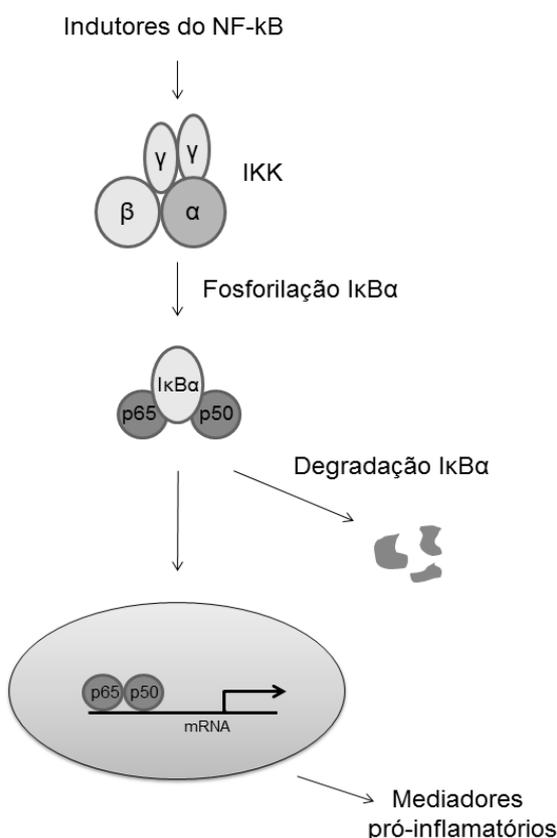


Figura 2. Mecanismo molecular de ativação do NF- κ B. Fosforilação de I κ B α pelo complexo IKK permitindo a translocação do NF- κ B para o núcleo para iniciar transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória. Adaptado de Zingarelli *et al.*, 2003.

NF- κ B possui elevada atividade em regiões de inflamação de diversas doenças e pode induzir a transcrição de citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, metaloproteases (MMPs), ciclooxigenases-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase indutível (iNOS) (TAK; FIRESTEIN, 2001). Por essa habilidade de induzir a expressão de vários mediadores pró-inflamatórios, NF- κ B tem sido relacionado como um dos principais fatores de transcrição na fisiopatologia de várias doenças inflamatórias crônicas (HAYDEN; WEST; GHOSH, 2006). As indicações iniciais de que o NF- κ B está envolvido na patogênese da DII veio com estudos utilizando biópsias de pacientes (WULLAERT, 2010). Analisando o estado de ativação do NF- κ B, pela ativação de p65 por imunofluorescência em biópsias intestinais com DII foi demonstrado que o NF- κ B além de expresso, está ativo em macrófagos e em células epiteliais da mucosa intestinal. Interessante ressaltar que o nível de ativação do NF- κ B teve correlação significativa com a severidade da inflamação intestinal (ROGLER; ANDUS, 1998). A ativação de NF- κ B é também encontrada em modelos experimentais de doença inflamatória intestinal, incluindo a colite induzida por DSS (ATREYA; ATREYA; NEURATH, 2008). Dessa forma, por conta de relação do NF- κ B com o aumento de citocinas pró-inflamatórias, MMPs, NO e outros mediadores inflamatórios afirma-se que a ativação do NF- κ B contribui para uma disfunção ou destruição celular, portanto sua inibição pode melhorar o curso da doença pela redução destes mediadores inflamatórios.

1.7 COLITE E METALOPROTEASES

As metaloproteases de matriz (MMPs) são endopeptidases dependentes de cálcio e zinco e são consideradas as principais enzimas envolvidas no controle da homeostase de todas as proteínas da matriz extracelular (MEC) em vários níveis incluindo regulação da função, crescimento e divisão celular, regulação da resposta imune, controle da síntese de elementos da MEC. Elas são proteinases capazes de degradarem quase todos os componentes da MEC tais como colágeno, proteoglicanos, fibronectina, elastina, e laminina (MEDINA; RADOMSKI, 2006; RAVI; GARG; SITARAMAN, 2007).

Algumas MMPs podem estar ancoradas a membrana e outras serem secretadas. Estas enzimas possuem uma estrutura que contém um pró-domínio que

mantém a MMP em um estado inativo e um domínio catalítico que atua em amplo espectro nos componentes da matriz (RAVI; GARG; SITARAMAN, 2007).

O domínio catalítico parece ser o mais importante das MMPs ele contém uma sequência altamente conservada para ligação do zinco, HEXXHXXGXXH, essencial para atividade proteolítica. A latência de MMP é mantida por um resíduo de cisteína, presente no pró-domínio que interage covalentemente com um átomo de Zn no centro ativo do domínio catalítico, bloqueando assim o acesso do sítio catalítico ao substrato (RA; PARKS, 2007). Com exceção de algumas MMPs, elas possuem também um domínio hemopexina que está ligada ao domínio catalítico, esse domínio determina a especificidade ao substrato, atividade proteolítica, e regula a interação de MMPs com seus inibidores teciduais (TIMPs) (RAVI; GARG; SITARAMAN, 2007).

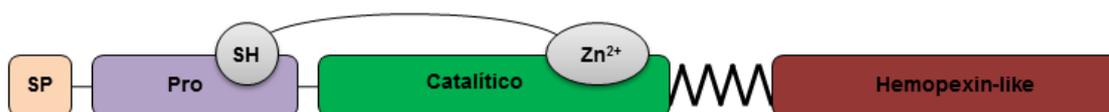


Figura 3. Estrutura básica de metaloproteases de matriz, mostrando os principais domínios (SP: peptídeo sinal; Pro: pró-domínio; SH, grupo tiol; Zn, zinco). A interação do grupo tiol no pró-domínio com o Zn^{2+} no domínio catalítico mantém a MMP em estado inativo. Adaptado de Ravi *et al.*, 2007.

Já foram identificadas 24 MMPs humanas, baseando-se em sua especificidade por substrato e homologia estrutural podem ser divididas em colagenases (MMP-1, 8, 13, 18), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelinas (MMP-3, 7, 10, 11), elastase (MMP-12), e outras (MMP-19, 23, 26, 27, 28) (RA; PARKS, 2007). Estas proteases são secretadas por vários tipos celulares, incluindo neutrófilos, células mesenquimais, células T, monócitos, macrófagos, células cancerígenas (MEDINA; RADOMSKI, 2006).

A atividade das MMPs é controlada em diversos níveis, seus genes são transcritos em respostas a alguns fatores, incluindo citocinas e fatores de crescimento. Além disso, sua atividade enzimática é regulada por inibidores teciduais endógenos (TIMPs) das MMPs, que formam um complexo altamente estável na razão de 1:1 conservando o sítio de ligação do zinco. O resultado deste complexo é uma enzima inativa incapaz de se ligar ao substrato (MEDINA; RADOMSKI, 2006).

A família das TIMPs consiste de no mínimo quatro membros (TIMP-1, 2, 3, e 4) e a interação destas proteínas com as MMPs são normalmente não-seletivas. MMPs estão presentes em pequenas quantidades, normalmente em sua forma latente, e quando ativadas estão envolvidas no remodelamento da MEC. Porém, em condições patológicas o aumento excessivo de MMP não pode ser controlado pelas TIMP, resultando em uma quebra da matriz extracelular e dano tecidual (MEDINA; RADOMSKI, 2006).

Aumento nos níveis de MMPs foi observado em pacientes com DII, sugerindo o papel destas enzimas no aumento da proteólise da mucosa, levando a ulcerações, inflamação e formação de fístulas (NAITO; YOSHIKAWA, 2005). Relacionado à resposta imune tem se associado também a atividade de metaloproteases, pois, recentes estudos mostram que estas enzimas podem atuar diretamente ou indiretamente na ativação/inativação de várias citocinas envolvidas na resposta imune e inflamatória. Estudos mostraram que algumas MMPs podem clivar e ativar o precursor de IL-1 β e TNF (PARKS; WILSON; LOPEZ-BOADO, 2004). Várias MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-12 E MT1-MMP1) também possuem atividades elevadas em uma variedade de modelos animais de colite bem como em pacientes com doença inflamatória intestinal. Alguns estudos mostram uma correlação direta dos níveis de MMPs com a atividade da doença (BAUGH *et al.*, 1999; NAITO; YOSHIKAWA, 2005; RAVI; GARG; SITARAMAN, 2007).

No grupo das gelatinases, existem duas MMPs, MMP-2 e MMP-9 que estão envolvida na DII. Os substratos conhecidos da MMP-2 são colágenos tipo I, IV, V, VII, X, XI, elastina, fibronectina, laminina, agregam. MMP-2 é expressa no cólon normal, principalmente nas células epiteliais e lamina própria. Durante a DII, a MMP-2 é altamente regulada e seu papel essencial esta relacionada à cicatrização tecidual (RAVI; GARG; SITARAMAN, 2007). Já MMP-9, como as outras metaloproteases, é sintetizada na sua forma inativa (pró-enzima) que requer uma ativação proteolítica. Porém a pró-MMP9 por si só é capaz de degradar certos tipos de colágeno. Esta gelatinase está ausente em todos os tecidos, exceto neutrófilos, macrófagos e osteoclastos (RAVI; GARG; SITARAMAN, 2007).

Embora estas enzimas apresentem similaridades estruturais elas possuem efeitos diferentes no desenvolvimento da inflamação intestinal. Expressão de MMP-2 e sua atividade estão aumentadas na colite induzida por DSS, o mesmo foi

observado em pacientes com DII. Esse efeito da MMP-2 está relacionado a manutenção da barreira epitelial, já que em ratos *knockout*-MMP-2 os animais foram mais susceptíveis ao desenvolvimento de colite induzida por DSS, e apresentaram uma disfunção da barreira epitelial (GARG *et al.*, 2006). MMP-9 também apresenta-se elevada tanto em atividade como na sua expressão na colite, porém os efeitos desta enzimas são contrários aos da MMP-2.

O aumento de MMP-9 está correlacionado com a atividade da doença e também a ocorrência de fístulas em casos agudos da doença de Crohn. E diferentemente da MMP-2, ratos *knockout*-MMP-9 são resistentes a alguns processos inflamatórios, inclusive DII (SANTANA *et al.*, 2006). Além disto, é a principal protease expressa na doença (BAUGH *et al.*, 1999). Desta forma, Garg *et al.* 2009 destaca a importância da descoberta de compostos que consigam inibir a MMP-9 sem alterar a atividade de MMP-2 já que são estruturas muito semelhantes.

1.8 COLITE E ÓXIDO NÍTRICO

Apesar de vários estudos, a fisiopatologia da DII ainda não foi totalmente compreendida. Existem vários estudos em relação ao papel do óxido nítrico (NO) como um possível fator na iniciação e propagação do processo inflamatório, isto porque o NO quando produzido em níveis elevados tem sido associado à desregulação da resposta imune e ao dano tecidual e celular (CROSS; WILSON, 2003).

A expressão da forma induzida da óxido nítrico sintase (iNOS) e a concentração de NO desempenham papel importante na fisiopatologia da DII. Estudos mostram que a produção de NO é induzida na inflamação do trato gastrointestinal, sendo que a concentração no reto de pacientes com doença inflamatória intestinal está significativamente maior do que em pacientes saudáveis (HERULF *et al.*, 1998; VERMEIREN *et al.*, 2012). Este aumento de NO foi atribuído ao aumento da atividade da iNOS no epitélio intestinal mostrando uma expressão maior desta proteína (CROSS; WILSON, 2003; OHTAKE *et al.*, 2010; VERMEIREN *et al.*, 2012).

Em modelo experimental a maioria dos estudos utilizando inibidores da iNOS ou em ratos *knockout*-iNOS mostraram melhoras na colite experimental, sugerindo o envolvimento da iNOS na progressão da DII (OHTAKE *et al.*, 2010).

1.9 PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS DE MATRIZ NO CÓLON

Proteoglicanos (PGs) são macromoléculas complexas, compostas por uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) ligadas covalentemente a um esqueleto protéico (JACKSON; BUSCH; CARDIN, 1991; KJELLEN; LINDAHL, 1991). GAGs, por sua vez, são polímeros lineares constituídos por unidades dissacarídicas repetitivas formadas por uma hexosamina (D-glucosamina e D-galactosamina) e um açúcar não nitrogenado, que pode ser um açúcar neutro (D-galactose), ou um ácido urônico (ácido D-glucurônico, ácido L-idurônico)(KJELLEN; LINDAHL, 1991).

Os proteoglicanos possuem papéis biológicos altamente diversificados, atuam como organizadores celulares influenciam o crescimento celular e a maturação de tecidos especializados, modulam a atividade de fatores de crescimento, regulam a resistência a tração da pele, afetam o crescimento e a invasão de células tumorais, entre outras funções (IOZZO, 1998).

A diversidade estrutural encontrada nos proteoglicanos é devido à composição do polissacarídeo, ou, glicosaminoglicanos. São reconhecidas atualmente seis classes distintas, ácido hialurônico (HA), condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (HS), heparina (HEP) e queratam sulfato (KS), baseadas em diferenças estruturais, devido à especificidade na composição e sulfatação, epimerização ou modificações na *N*-acetilação.

Com os avanços nos estudos de glicobiologia, as moléculas de GAGs mostram associação com a iniciação e controle de eventos relacionados a inflamação. Exemplos de processos influenciados pelos GAGs incluem produção de citocinas e quimiocinas, recrutamento de leucócitos e maturação de células inflamatórias (TAYLOR; GALLO, 2006). Trabalhos de relevância clínica tem sugerido que GAGs específicos e seus fragmentos de baixo peso molecular estão elevados em pacientes com osteoartrite, psoríases, artrite reumatoide e doença inflamatória intestinal, podendo influenciar o curso da doença (TAYLOR; GALLO, 2006).

Mudanças nos GAGs de matriz extracelular (MEC) da mucosa intestinal tem-se associado com DII. GAGs sulfatados são os principais constituintes da MEC presente no intestino, entre eles, condroitim sulfato, heparam sulfato, dermatam sulfato e ácido hialurônico (BELMIRO *et al.*, 2005; ISEMURA *et al.*, 1984).

Os GAGs de matriz exercem uma barreira mecânica e eletrostática regulando a permeabilidade vascular e da MEC. Russel 1999, sugerem que colite ulcerativa seja uma deficiência da barreira de GAGs presente na mucosa intestinal, tendo como resultado um aumento da permeabilidade intestinal devido à perda da barreira de mecânica e eletrostática exercida pelos GAGs, permitindo assim a penetração de toxinas e gerando resposta inflamatória. Análise de intestinos inflamados por técnicas indiretas, encontrou anormalidades nos GAGs de matriz extracelular limitado a mucosa na colite ulcerativa, sendo observado perda significativa de GAG na lâmina basal (MURCH *et al.*, 1993). Porém, estudo realizado em biópsias de pacientes com doença de Crohn, foi observado um aumento nas concentrações de glicosaminoglicanos mostrando que este aumento possa ser um mecanismo compensatório para restauração da integridade da mucosa intestinal, já que em áreas não inflamadas deste pacientes observou-se uma redução de GAGs e uma distribuição alterada destes na mucosa intestinal (BELMIRO *et al.*, 2005).

1.10 CONDROITIM SULFATO E GLUCOSAMINA

Glucosamina e Condroitim sulfato têm sido amplamente utilizados no tratamento da osteoartrite em humanos, uma doença inflamatória principalmente caracterizada por perdas de cartilagem articular e sinovite (IOVU; DUMAIS; DU SOUICH, 2008; PAVELKA *et al.*, 2002).

Condroitim sulfato (CS) é um glicosaminoglicano formado por unidades dissacarídicas compostas por resíduos de ácido D-glucurônico e *N*-acetilgalactosamina, podendo ser sulfatadas na posição 4, 6 ou ainda não sulfatada, unidos por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow4)$ (LAMARI, FOTINI N.; KARAMANOS, 2006).

Atualmente, CS é prescrito como medicamento em países europeus, tendo sido classificado como evidência 1A pelas recomendações da EULAR (*European League Against Rheumatism*) para o tratamento de OA de joelho e de mão

(JORDAN *et al.*, 2003). A utilização de CS como adjuvante terapêutico para tratamento de OA permite reduzir o uso de AINEs, além de melhorar os sinais clínicos da doença (CLEGG *et al.*, 2006). Entretanto, ainda são controversas as bases bioquímicas e fisiológicas que levam à melhora dos quadros clínicos de doenças articulares após tratamento com CS (LAMARI, F. N. *et al.*, 2006). Na busca deste entendimento, verificou-se que esta macromolécula apresenta certa ação anti-inflamatória, reduzindo a expressão de mediadores, como citocinas, na resposta induzida por LPS (CAMPO *et al.*, 2008). Esta resposta parece ser mediada pelo fator de transcrição NF- κ B (JOMPHE *et al.*, 2008). Além disso, outras ações farmacológicas do CS, que parecem depender de sua capacidade de interagir, por exemplo, com outras moléculas de matriz, fatores de crescimento, inibidores de protease, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e fatores de virulência de patógenos, também vêm sendo investigadas (VOLPI, 2011).

Em experimentos *in vitro*, o CS reduziu a concentração de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β), e provocou ainda diminuição da concentração sistêmica e articular de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio possivelmente agindo sobre a translocação do NF- κ B (DU SOUICH *et al.*, 2009; IOVU; DUMAIS; DU SOUICH, 2008). Além disso, o CS reduziu o aumento de proteases de matriz mediado por IL-1 β , como as metaloproteases de matriz (MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 e MMP-14) (IMADA *et al.*, 2010).

Estudo realizado em modelo animal de colite por Hori *et al.*, 2001, mostrou que o CS diminuiu o sangramento nas fezes, a erosão e manteve a leucometria global em níveis normais quando comparado ao ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), medicamento utilizado no tratamento da colite ulcerativa em humanos. Em 2008, outro estudo mostrou também um efeito de proteoglicanos de CS nos sinais clínicos e na redução do aumento de leucócitos (OTA *et al.*, 2008).

Outro composto utilizado em associação com CS no tratamento de osteoartrite, a glucosamina (GlcN) é um monossacarídeo nitrogenado solúvel em água e é uma molécula precursora para a síntese de glicosaminoglicanos, lipídeos e proteínas glicosiladas, sendo um dos açúcares mais abundantes do corpo (SHERMAN; OJEDA-CORREAL; MENA, 2012). Estudos sugerem que GlcN possa afetar a degradação da cartilagem, a resposta imune e algumas citocinas no

processo inflamatório (SHERMAN; OJEDA-CORREAL; MENA, 2012). Em modelo de osteoartrite em condrocitos humanos GlcN reduziu a atividade de NF-kB (LARGO *et al.*, 2003). GlcN também preveniu o aumento da produção de óxido nítrico e metaloproteases de matriz em modelo *in vitro* de degradação articular em cavalos (FENTON *et al.*, 2000).

A glucosamina, além de sua ação condroprotetora, tem mostrado em algumas publicações uma ação anti-inflamatória sobre neutrófilos, inibindo a geração de superóxidos e a liberação de grânulos enzimáticos (HUA; SAKAMOTO; NAGAOKA, 2002).

Yomogida *et al.*, 2008 mostrou o efeito da glucosamina sobre células do epitélio intestinal ativada (HT-29), em que suprimiu a produção TNF- α , IL-8 e a fosforilação de NF-KB, podendo assim exercer uma atividade anti-inflamatória, inibindo a ativação de células epiteliais intestinais. Em outro estudo, dessa vez em modelo experimental de colite induzida por DSS os resultados indicaram que a glucosamina melhorou os sintomas clínicos, suprimiu a inflamação do cólon e a lesão tecidual. Também inibiu a ativação das células epiteliais intestinais evidenciadas pela supressão da fosforilação de NF-KB na mucosa intestinal do modelo experimental de colite, sugerindo que a glucosamina é susceptível de inibir a ativação destas células *in vivo* (YOMOGIDA; KOJIMA; *et al.*, 2008).

2 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

De acordo com as informações apresentadas, CS e GlcN apresentam atividade anti-inflamatória confirmadas em diversos estudos, principalmente em modelos de osteoartrite. A grande maioria dos estudos envolvem a atividade anti-inflamatória destes compostos com um redução da fosforilação do NF-kB um importante fator de transcrição nuclear envolvido na resposta inflamatória.

Como descrevemos, o NF-kB exerce papel importante na DII, já que sua expressão e atividade estão aumentadas nesta patologia, e dessa forma uma variedade de mediadores envolvidos na inflamação, entre eles MMPs que podem estar envolvidas no reparo/dano tecidual e a iNOS enzima responsável pelo produção de NO.

Estudos demonstraram o efeito de CS e GlcN na redução da atividade de NF- κ B, assim, nossa hipótese foi de que a associação de CS/GlcN poderia reduzir a translocação do NF- κ B ao núcleo e indiretamente reduzir a síntese e atividade de MMP e NO tecidual em modelo de colite ulcerativa induzida por DSS. E apesar destes compostos já terem sido analisados em separado neste modelo experimental, até o momento não existem estudos sobre o efeito destas moléculas associadas sobre a atividade de MMP-2 e MMP-9 tecidual, bem como análise do padrão de GAGs de matriz na colite induzida por DSS.

Dessa forma, por conta da dificuldade dos pacientes com DII aderirem a tratamentos prolongados devido aos efeitos colaterais dos medicamentos e essa patologia ser um importante problema de saúde, pois geram repercussões importantes na qualidade de vida de seus portadores, a procura de novos compostos com atividades anti-inflamatória e com poucos efeitos colaterais se torna necessário para adesão ao tratamento dessas doenças, resolvemos testar a atividade anti-inflamatória de condroitim sulfato e glucosamina em um modelo de doença inflamatória intestinal em ratos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

- Avaliar os efeitos do condroitim sulfato e glucosamina, em associação, na progressão e no tratamento de colite ulcerativa induzida por dextran sulfato de sódio em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar o índice de atividade da doença em ratos normais, tratados e não tratados e correlacionar com parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos.
- Analisar atividade de MMP-2 e MMP-9 e mieloperoxidase na matriz extracelular do cólon dos animais.
- Analisar os níveis de óxido nítrico no cólon dos animais.
- Analisar o padrão de glicosaminoglicanos na matriz extracelular do cólon de animais normais, tratados e não tratados e suas possíveis alterações.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Dextran sulfato de sódio (DSS - MW: 36-50 kDa, MP Biomedicals, Solon, OH, USA); CS/GlcN (Aché Laboratórios Farmacêuticos, SP, Brasil); Brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); Cloridrato de *o*-dianisidina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); Sulfanilamida e *N*-[1-naftil]-etilenodiamina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); Nitrito de sódio (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); Acrilamida (Ludwig Biotecnologia Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil); *N-N'*-metilbisacrilamida (Neon Comercial Ltda., São Paulo, SP, Brasil); Tris (Biosolve Valkenswaard, Holanda); Triton x-100 (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil); Gelatina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); Papaina de látex de *Carica papaya*, e L-cisteína (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); Agarose (Bio-Rad Laboratories Inc., Richmond, CA, EUA); Brometo de *N*-cetil-*N,N,N*-trimetilamônio (Merck, Darmstadt, Alemanha).

4.2 ANIMAIS

Ratos machos da linhagem Wistar (entre 6-8 semanas de vida) foram obtidos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil) para os experimentos de indução da colite por dextran sulfato de sódio (DSS). Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Análise de Glicoconjugados, Departamento de Bioquímica, no Instituto de Ciências Biológicas, durante todo o período do experimento em caixas plásticas individuais, forradas com maravalha, em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Água filtrada e ração Nuvilab® foram administradas *ad libitum*. Os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com os preconizados pelo Comitê de Ética Animal da UFJF (002/2010-CEA UFJF) e pelo "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals".

4.3 INDUÇÃO COLITE POR DSS

O protocolo de indução de colite foi realizado, como descrito por Okayasu et al. 1990, com modificações. Os animais foram randomizados em quatro grupos:

grupo Controle (n=16), grupo Controle + CS/GlcN (n=10), grupo DSS (n=10); grupo DSS + CS/GlcN (n=10). Para indução da colite (Grupos DSS e DSS + CS/GlcN), foi administrado aos ratos solução de DSS 5%, *ad libitum*. Aos animais do grupo controle foi administrado somente água, enquanto para os grupos Controle + CS/GlcN e DSS + CS/GlcN, foi administrada solução de CS/GlcN com ou sem DSS. O volume diário consumido foi de aproximadamente 40 mL correspondendo uma dose diária de CS (125mg/dia) e GlcN (100mg/dia). Após sete dias de experimento, os ratos foram sacrificados por aprofundamento de anestesia com administração de pentobarbital sódico (100mg/kg) e tiveram o cólon e sangue retirados para estudos histológicos e bioquímicos.

4.4 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA

Para análise da colite ulcerativa induzida por DSS utilizou-se o índice de atividade da doença (IAD) descrito por Cooper et al. 1993. Foram considerados os seguintes parâmetros: perda de peso, consistência das fezes e sangramento. A pontuação utilizada foi: nenhuma perda de peso, 0 ponto; perda de peso de 1-5%, 1 ponto; perda de peso de 5-10%, 2 pontos; perda de peso de 10-15%, 3 pontos; e perda de peso maior que 15% sendo considerado 4 pontos. As fezes caracterizadas como normais e bem formadas (0 ponto); fezes soltas e pastosas com aparência de formadas (1 ponto); fezes muito moles (2 pontos); fezes diarreicas (4 pontos). Quanto ao sangramento foi considerado, nenhum sangramento (sangue oculto negativo) (0 ponto), sangue oculto positivo (1); traços de sangue visíveis nas fezes (2) e sangramento retal (4 pontos). O score final foi obtido após o somatório das pontuações de cada item para obtenção do IAD de 0 (ratos saudáveis) a 12 (atividade máxima da colite), dessa forma avaliando a indução da colite e possíveis melhoras do tratamento aos sinais clínicos.

4.5 AVALIAÇÃO DE PARAMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS

Punção cardíaca foi realizada para coleta de sangue no 7º dia do experimento para realização de análises bioquímicas e hematológicas. No exame hematológico foram avaliados a contagem de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e contagem global de leucócitos. Enquanto que, para avaliações bioquímicas, dosagens de TGO,

TGP e albumina sérica foram realizadas conforme instruções de seus respectivos kits de dosagem. As análises foram realizadas no Centro de Biologia da Reprodução-CBR da UFJF, utilizando analisador hematológico veterinário pochH-100i V Diff (Sysmex) e analisador bioquímico automático Labmax Progress (Labtest).

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras de tecidos (cólon) foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, e seu comprimento e peso medidos para avaliação do encurtamento do tecido (comprimento/peso). Em sequência o cólon foi aberto longitudinalmente e usando a técnica de rocambole (Swiss roll) foi enrolado e fixado com solução de paraformaldeído a 10% em tampão fosfato 0,05M, pH 7,4, por no mínimo 24 horas, processado e incluído em parafina para realização de cortes com 5 µm de espessura e corados. Foram realizadas técnicas de coloração com hematoxilina-eosina (HE), tricrômico de Masson e azul de alcian em pH 2,5.

Análise histológica dos cortes obtidos foi realizada como descrito por Cooper et al. 1993. Sendo a severidade do dano a mucosa avaliada como grau 0, mucosa colônica normal; grau 1, perda de 1/3 das criptas; grau 2, perda de 2/3 das criptas; grau 3, lâmina própria coberta com uma camada única de epitélio e presença de leve infiltrado inflamatório; grau 4, erosões e elevada infiltração de neutrófilos.

4.7 ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO)

A atividade de MPO foi dosada de acordo com Bradley *et al.* 1982. Resumidamente, a enzima foi extraída de cólon pela homogeneização do tecido em solução de 0,5% brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0. Em seguida a suspensão foi submetida a disruptor de células (3 ciclos de 20 segundos, potência 80%, 20 kHz) em banho de gelo e congelada/descongelada três vezes. Esta suspensão foi então centrifugada 4000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante obtido foi congelado a -80°C. Concentração proteica foi determinada pelo método de Lowry. Misturas de incubação, em microplaca de 96 poços, foram realizadas com 50µL de amostra, 200µL de 0,65mM de cloridrato de o-dianisidina e 30µL de peróxido de hidrogênio 0,09%. Medidas de

absorbância foram obtidas em intervalos de 1 minuto em um tempo final de 5 minutos a 450nm. A atividade de MPO foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 11,48 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (FIETZ *et al.*, 2008), sendo definido como 1 unidade enzimática (UE) de mieloperoxidase a quantidade de enzima capaz de degradar 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de peróxido de hidrogênio à 25°C. Os resultados foram expressos como atividade específica (mUE/mg proteína).

4.8 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Para determinação de NO, a concentração de nitrito foi medida no sobrenadante do tecido homogeneizado com tampão fosfato (PBS). Mistura de volumes iguais de amostra e reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico e 0,1% de *N*-[1-naftil]-etilenodiamina) foram realizadas e absorbância medida a 450nm. A concentração de nitrito foi obtida por curva padrão de nitrito de sódio e expressa como μg de NO/mg de tecido.

4.9 ATIVIDADE DAS METALOPROTEASES

A atividade das metaloproteases de matriz foi analisada por zimografia em eletroforese em gel de poliacrilamida com gelatina. Fragmentos do cólon foram macerados em nitrogênio líquido e, em seguida, adicionado 1ml de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, contendo CaCl_2 100 mM e 1 ml de Triton X-100 0,2% (v/v) para extração das enzimas. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante aliquoteado e mantidos a -80°C. A concentração proteica foi determinada pelo método de Lowry. Géis de 0,75 mm foram preparados com solução de acrilamida-bisacrilamida T 30%, C 2,7% e as amostras foram aplicadas (10 μg de proteína) para migração eletroforética (20 mA por gel, 4°C) em tampão Tris-glicina (25mM/192mM) pH 8,3 contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%. Para a análise de gelatinases foi acrescentado gelatina 2% como substrato ao gel, antes de sua polimerização. Após a migração, os géis foram lavados duas vezes em 100 mL de Triton X-100 2% (15 min, cada), para remoção do SDS e renaturação das enzimas, e incubados em 100 mL de tampão de incubação (50 mM Tris-HCl, pH 8,2, contendo 5 mM CaCl_2 e 1 μM ZnCl_2) por 24h a 37°C. Os géis foram corados com

Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,5% corante, 30% metanol, 10% ácido acético) e descorados em solução descorante (30% metanol, 10% ácido acético). A atividade das gelatinases foi evidenciada como regiões claras (descoloradas) no gel (MIURA *et al.*, 1995; SHAPIRO; KELLEY; KOBAYASHI, 2001). Para medir as intensidades das bandas foi utilizado o programa TotalLab Quant ®. As atividades foram corrigidas pelo conteúdo de proteínas.

4.10 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE GLICOSAMINOGLICANOS

As cadeias de glicosaminoglicanos foram extraídas após proteólise dos tecidos (cólon) com papaína (2mg/mL) em tampão fosfato-cisteína 0,05M, pH 6,5, na proporção de 2 ml de solução por 100mg de tecido. Após incubação de 18-24 horas a 60°C, proteínas ainda presentes na solução foram precipitados pela adição de ácido tricloroacético (TCA 10%, concentração final), em presença de NaCl 1M (concentração final). Após 10 minutos em banho de gelo o precipitado formado foi removido por centrifugação (6000 rpm, 15 minutos). Para precipitação de ácidos nucleicos foi adicionado ao sobrenadante cloreto de manganês 0,05M por uma hora em banho-maria a temperatura de 60°C. Os GAGs foram precipitados pela adição de 2,5 volumes de etanol, lentamente e sob agitação. Após 18 horas a -20°C, o precipitado formado foi coletado por centrifugação (6000 rpm, 20 minutos), seco a vácuo, ressuspenso em água destilada (100µl). Para identificação e/ou quantificação de GAGs foi utilizado o método de eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3-diaminopropano-acetato 0,05M, pH 9,0 (PDA), desenvolvido por JAQUES *et al.* 1968 e modificado por DIETRICH e DIETRICH 1976.

O método consiste em aplicar alíquotas (5µl) obtida da extração, a uma lâmina de gel de agarose 0,6% em tampão PDA 0,05M, pH 9,0. A corrida eletroforética foi realizada em uma câmara refrigerada, submetida a uma diferença de potencial de 100V, por aproximadamente 1 hora ou até que se obtenha a migração apropriada. Após a corrida, o gel foi mergulhado em solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) 0,1% por 2 horas para precipitação dos compostos (PGs ou GAGs). O gel então foi seco sob corrente de ar quente e os compostos corados com azul de toluidina 0,1% em solução ácido acético 1%/ etanol 50%, com posterior remoção do excesso de corante com solução de ácido acético

1%/ etanol 50%. Para quantificar os GAGs foi utilizado o programa TotalLab Quant®. As concentrações foram corrigidas pelo peso tecidual.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores presentes nas figuras e textos são expressos como média \pm erro padrão médio (S.E.M.). Análise estatística dos dados foi realizada utilizando SPSS Statistics para Windows versão 19. Foi avaliada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, a comparação dos dados distribuídos na curva da normalidade foi realizada pelo one-way ANOVA com o teste de Bonferroni para comparações múltiplas, e Teste t de student quando necessário. $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO 1 – Trabalho submetido à Revista da Associação Médica Brasileira

Atividade de MMP-2 e MMP-9 em modelo de colite induzido por DSS.

Activity of MMP-2 and MMP-9 in a DSS-induced colitis model

Luiz Gustavo de Oliveira^I; André Luiz da Cunha^{II}; Luiz Cláudio Ribeiro^{III}; Amaury Caiafa Duarte^{IV}; Maria Christina Marques Nogueira Castañon^V; Jair Adriano Kopke Aguiar^{VI}; Júlio Maria Fonseca Chebli^{VII}

^I Mestrando no Programa Pós-Graduação em Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil.

^{II} Mestre em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil.

^{III} Doutor em Demografia, Depto de Estatística/ICE, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil.

^{IV} Mestre em Bioquímica e Imunologia, Depto de Bioquímica/ICB, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil.

^V Doutor em Medicina (Dermatologia), Depto Morfologia/ICB, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil.

^{VI} Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), Depto de Bioquímica/ICB, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil.

^{VII} Doutor em Gastroenterologia, Departamento de Gastroenterologia, Faculdade Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil.

Trabalho realizado no Laboratório de Análise de Glicoconjugados do Depto. de Bioquímica/ICB, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil

RESUMO

Objetivo: Avaliar possível correlação do IAD em modelo de colite ulcerativa induzida por DSS com o grau de severidade de danos na mucosa colônica e aumento de atividade de metaloproteases (MMP).

Métodos: A colite foi induzida pela administração oral de DSS 5% por 7 dias consecutivos e seus efeitos determinados pelo índice de atividade da doença (IAD) e dosagens hematológicas. Alterações histológicas foram avaliadas em cortes corados com HE e azul de alcian. Atividade enzimática de mieloperoxidase foi determinada pelo método de Bradley, atividades de metaloproteases (MMP-2 e MMP-9) foram quantificadas por zimografia.

Resultados: Os animais do grupo DSS apresentaram elevado IAD e redução dos parâmetros hematológicos comparados ao grupo controle. A indução de colite provocou lesão tecidual com perda de mucinas e também aumentou atividade de MPO ($P < 0,001$) e de MMP-9 (45 vezes) comparado ao grupo controle.

Conclusão: Neste estudo, observamos uma correlação do IAD com o grau de alterações histopatológicas após indução da colite por DSS, podendo associar este resultado ao aumento principalmente da atividade de MMP-9.

SUMMARY

Objective: To evaluate a possible correlation of DAI with the severity of colonic mucosal damage and increased activity of metalloproteases (MMP) in model of ulcerative colitis induced by DSS.

Methods: Colitis was induced by oral administration of 5% DSS for 7 consecutive days, and its effects were determined by disease activity index (DAI) and hematological measurements. Histological changes were assessed in sections stained with HE and Alcian Blue. Myeloperoxidase activity was determined by the method of Bradley. Metalloprotease activities (MMP-2 and MMP-9) were quantified by zymography.

Results: Animals in the DSS group showed elevated DAI and reduced hematological parameters compared to the control group. The induction of colitis caused tissue injury with loss of mucin and increased MPO ($P < 0.001$) and MMP-9 activities (45 fold) compared to the control group.

Conclusion: In this study, we observed a correlation of DAI with the degree of histopathological changes after induction of colitis by DSS, and this result may be related mainly to increased activity of MMP-9.

INTRODUÇÃO

Doenças inflamatórias intestinais (DII) apresentam em comum inflamação crônica do trato digestivo, podendo ter ou não uma causa ou agente patogênico específico^{1, 2}.

Sua etiologia é complexa e multifatorial, acredita-se no envolvimento de fatores genéticos, ambientais, imunes e da microbiota intestinal^{3, 4}.

Por muitos anos, estudos sobre a compreensão da patogênese da DII foi adiada pela ausência de modelos experimentais que correspondessem à doença⁵. Mas atualmente mais de 30 modelos de experimentação animal foram desenvolvidos, apresentando as mais variadas manifestações clínicas das DII^{6, 7}. Estes modelos contribuem para importantes avanços no entendimento dos mecanismos de inflamação e da patogênese bem como possíveis descobertas de tratamento⁸.

Dentre os modelos utilizados, se destaca a indução de colite por dextran sulfato de sódio (DSS), devido a sua boa reprodutibilidade e por apresentar alterações clínicas, sintomas, marcadores inflamatórios e histopatológicos semelhantes à DII em humanos^{9, 10}. O exato mecanismo pelo qual o DSS induz colite é desconhecido, mas sabe-se que esse composto é tóxico para células epiteliais intestinais tendo assim como provável mecanismo a ação direta na permeabilidade intestinal permitindo a entrada de antígenos luminais resultando em uma resposta inflamatória^{11, 12}.

Aumento na atividade e expressão de metaloproteases de matriz extracelular (MMPs) foi descrita em pacientes com DII sugerindo que essas enzimas estão envolvidas no processo de degradação tecidual^{13, 14}. As MMPs são endopeptidases dependentes de cálcio e zinco e são consideradas as principais enzimas envolvidas no controle da homeostase da matriz extracelular (MEC) em vários níveis, incluindo crescimento, divisão e função celular, regulação da resposta imune, controle da síntese e remodelamento da matriz pela clivagem de quase todos os seus componentes como colágeno, proteoglicanos, fibronectina, elastina, e laminina^{15, 16}.

Várias MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-12 E MT1-MMP1) possuem suas atividades aumentadas em uma variedade de modelos animais de colite bem como em pacientes com doença inflamatória intestinal. Alguns estudos mostram uma correlação direta dos níveis de MMPs com a atividade da doença¹⁶.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi verificar uma possível correlação do IAD em modelo de colite ulcerativa induzida por DSS com a severidade de danos na mucosa colônica e aumento de atividade de MMPs.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Ratos machos da linhagem *Wistar* (entre 6-8 semanas de vida) foram obtidos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil) para indução da colite por DSS. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Análise de Glicoconjugados, do Departamento de Bioquímica no Instituto de Ciências Biológicas, durante todo experimento em caixas plásticas individuais de acordo com, "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals". Os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da UFJF (002/2010-CEEA UFJF) .

INDUÇÃO COLITE POR DSS

Para indução da colite foi utilizado DSS (MW: 36-50 kDa, MP Biomedicals, Solon, OH, USA), de acordo com Okayasu e cols. (1990), com modificações. Os animais foram randomizados em dois grupos: grupo controle (n=16), em que foi administrado água, e grupo DSS (n=10) foi administrado somente solução de DSS a 5%, *ad libitum*, por sete dias. O volume total de DSS consumido por rato foi de aproximadamente 40 mL/dia para o grupo. Após o final do período de experimento, os ratos foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia com administração de pentobarbital sódico (100mg/kg) e tiveram o cólon totalmente extirpado desde a junção cólon-cecal até o canal anal.

AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA

A colite ulcerativa foi avaliada usando o índice de atividade da doença (IAD) descrito por Cooper et al. (1993), com algumas modificações. Usamos como parâmetros a perda de peso (0-4 pontos), consistência das fezes (0-4 pontos) e sangramento (0-4 pontos). Estes pontos foram somados posteriormente para obter o IAD de 0 (ratos saudáveis) a 12 (atividade máxima da colite).

AVALIAÇÃO DOS PARAMETROS HEMATOLÓGICOS

Sangue coletado foi analisado quanto à contagem de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina para avaliação dos parâmetros hematológicos. As análises foram realizadas no Centro de Biologia da Reprodução-CBR da UFJF, utilizando analisador hematológico veterinário pochH-100i V Diff (Sysmex).

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Inicialmente, realizou-se a análise macroscópica sendo cada segmento de cólon lavado em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, e seu comprimento e peso medido para avaliação da razão comprimento/peso. Em sequência o cólon foi aberto longitudinalmente e usando a técnica de rocambole (Swiss roll), fixado com solução de paraformaldeído a 10% em tampão fosfato 0,05M, pH 7,4, por no mínimo 24 horas, processado e incluído em parafina para realização de cortes com 5 µm de espessura. Além da coloração de rotina (H&E) utilizou-se também a coloração específica para mucopolissacarídeos azul de alcian em pH 2,5. Os cortes avaliados histopatologicamente foram graduados como descrito por Cooper et al. (1993).

ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO)

A atividade de MPO no tecido foi medida de acordo com a técnica descrita por Bradley et al. 1982. A absorbância foi determinada no comprimento de onda de 450nm. A atividade de MPO foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 11,48 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)¹⁹. 1UE (unidade enzimática) de mieloperoxidase considerada como aquela que degrada 1µmol/min de peróxido de hidrogênio à 25°C. Os resultados foram expressos mUE/mg proteína.

EXTRAÇÃO DE METALOPROTEASES

Fragmentos do cólon foram macerados em nitrogênio líquido e, em seguida, adicionado 1ml de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, contendo CaCl_2 100 mM e 1 ml de Triton X-100 0,2% (v/v) para extração das enzimas. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 x g, e o sobrenadante aliquoteado. Proteína foi quantificada pelo método de Lowry.

ZIMOGRAMAS

Homogenatos de cólon (10 µg de proteína) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (10%, solução acrilamida-bisacrilamida T 30% C 2,7%, contendo gelatina 2 mg/mL) em tampão Tris-glicina (25mM/192mM) pH 8,3 contendo dodecil sulfato de sódio (0,1%). Após a migração, os géis foram lavados com de Triton X-100 (2%) e incubados com tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8,2, contendo 5 mM CaCl_2 e 1µM ZnCl_2 , por 24h a 37°C. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,5% corante, 30% metanol, 10% ácido acético) e descorados (30% metanol, 10% ácido acético). A atividade das gelatinases foi evidenciada como regiões claras (descoloradas) no gel^{20, 21}. Para medir as intensidades das bandas foi utilizado o

programa TotalLab Quant[®]. As atividades foram corrigidas pelo conteúdo de proteínas.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores apresentados são expressos como média \pm erro padrão médio (E.P.M.). Análise estatística dos dados foi realizada utilizando *SPSS Statistics para Windows*, versão 19. Foi avaliada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, a comparação dos dados distribuídos na curva da normalidade foi realizada pelo *one-way ANOVA* com o teste de Bonferroni para comparações múltiplas, e Teste *t student* quando necessário. $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Os sinais clínicos de colite experimental induzida por DSS em ratos foi determinado pela avaliação do índice de atividade da doença (IAD). Este índice é composto por três parâmetros (consistência das fezes, presença de sangramento retal e variação de peso dos animais) e fornece o grau de severidade do processo inflamatório e está correlacionado com danos à mucosa intestinal. Observamos um aumento do IAD para o grupo DSS após o primeiro dia de indução com aumento significativo do quarto ao sétimo dia, além de perda significativa de peso durante todos os dias de experimento (Figura 1 A, B), para o grupo controle houve ganho de peso e não foram observadas alterações clínicas. Perda de peso corporal foi o primeiro sinal clínico observado, a partir do terceiro dia as fezes apresentaram alterações em sua consistência, enquanto a presença de sangue foi visualizada a partir do quinto dia (Figura 1C). Macroscopicamente, observou-se também uma redução no comprimento do cólon no grupo DSS (Figura 1D).

A colite aguda induzida por DSS provocou alterações hematológicas diminuindo a contagem de eritrócitos ($P < 0.01$), hematócrito ($P < 0.05$) e hemoglobina ($P < 0.01$), mostrando perda acentuada de sangue comparado ao grupo controle (Tabela 1). Análise histológica da mucosa colônica de animais do grupo DSS apresentou áreas multifocais de erosão e ulcerações bem como regiões de perda de mais de 2/3 das criptas. Também foi observada congestão vascular, edema na lâmina própria e infiltrado inflamatório (Figura 2A). Nos animais do grupo controle a mucosa colônica se manteve normal, com o epitélio de revestimento e as criptas intactas (Figura 2A). Este resultado observado, também reflete na análise do score histológico (Figura 2B,

$P < 0,001$). Pela coloração de azul de Alcian, observamos que no grupo DSS (Figura 2A) houve redução significativa no número de células caliciformes bem como na produção de mucina enquanto no grupo controle houve a manutenção das criptas e das células caliciformes.

A atividade de mieloperoxidase (MPO), um marcador muito utilizado para avaliar a infiltração tecidual de neutrófilos (Figura 2C) mostrou-se elevada no grupo DSS comparado ao grupo controle, este resultado é consistente com as alterações histopatológicas observadas.

Existem grandes evidências do envolvimento de metaloproteases de matriz em processos inflamatórios intestinais, entre elas encontram-se duas gelatinases (MMP-2 e 9). Para avaliar as alterações na atividade de MMP-2 e MMP-9 nos grupos controle e induzido foi realizado análise densitométrica dos zimogramas como descrito em material e métodos. Observamos para os animais saudáveis somente a atividade de MMP-2 (Figura 2 D) enquanto para os animais induzidos, além do aumento da atividade de MMP-2 comparado ao grupo controle (3 vezes maior), observamos o aparecimento da atividade de MMP-9 (Figura 2 E).

DISCUSSÃO

O modelo experimental utilizando DSS possui como principais manifestações clínicas diarreia, sangue nas fezes, perda de peso, sangramento e anemia¹². As alterações histológicas mais encontradas no cólon são a diminuição de mucinas, degeneração epitelial, presença de erosões, infiltração de neutrófilos e abscesso da cripta¹¹. Essas manifestações e alterações histopatológicas também foram observadas em nosso estudo, além do encurtamento do comprimento do cólon avaliado macroscopicamente. A diarreia observada nos animais do grupo DSS a partir do terceiro dia pode ser devido ao aumento da permeabilidade das células intestinais ou por uma hiperosmolaridade no lúmen provocada pelo DSS²². A perda de peso e o encurtamento do cólon observados apresentam elevada correlação com as alterações patológicas e histológicas de colite e são bons marcadores de severidade da inflamação intestinal^{12, 22} (Figura 1). Aliados a esses fatores, o agravamento da doença se dá com a presença de sangramentos agudos avaliados pelo IAD e dosagens hematológicas^{12, 23}. Nós observamos uma redução significativa da contagem de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina no grupo DSS, demonstrando que estes animais sofreram grandes perdas de sangue.

As características histopatológicas observadas neste modelo animal se assemelham bastante com a doença em humanos¹¹. Na colite por DSS observamos presença de edemas na lâmina própria, infiltrado inflamatório, perda das criptas e células caliciformes (perda de mucinas observadas pelo azul de alcian) além de áreas multifocais de erosões e ulcerações demonstrando um grande dano tecidual no cólon. O infiltrado inflamatório observado na análise histopatológica foi confirmado pela atividade de mieloperoxidase (MPO) um marcador de infiltrado inflamatório muito utilizado no modelo de colite por DSS. A MPO é a principal enzima encontrada nos grânulos de neutrófilos, ela catalisa principalmente a oxidação de íons Cl⁻ a ácido hipocloroso e seu aumento está envolvido em dano tecidual²⁴. Em nosso trabalho, observamos uma atividade elevada de MPO no grupo DSS comparado ao grupo controle (P<0,001). Estudos recentes também mostraram que a redução da degradação de matriz presente na mucosa intestinal, pode estar relacionada a uma redução da atividade de MPO e melhora do curso da doença em modelo experimental de colite^{25, 26}.

Atividade de metaloproteases de matriz extracelular é atualmente muito discutida no seu envolvimento com as doenças inflamatórias intestinais. Estas enzimas e seus inibidores são produzidos no trato gastrointestinal por células estruturais, sendo que uma alteração neste equilíbrio pode provocar algumas condições inflamatórias no intestino¹⁵. Dentro deste grupo de enzimas se destacam, MMP-2 e MMP-9, conhecidas como gelatinases. MMP-2 é expressa constitutivamente enquanto a MMP-9 está ausente nos principais tecidos humanos²⁷. Algumas linhas de pesquisa sugerem que estas enzimas estejam envolvidas no processo de destruição e remodelamento tecidual em condições inflamatórias^{28, 29}.

Nosso estudo mostra uma elevada atividade de MMP-9 (45 vezes maior) no grupo DSS, enquanto houve um pequeno aumento de MMP-2 (3 vezes maior). Estudo realizado em biópsias de pacientes com colite ulcerativa demonstrou uma atividade maior de MMP-9 comparado a pacientes controles³⁰. Já estudos em modelos experimentais demonstraram que animais deficientes de MMP-9 atenuaram a colite mostrando que esta gelatinase está envolvida no processo inflamatório e sua inibição pode reduzir a inflamação³¹. Esse aumento de MMP-9 pode se relacionar com a elevada infiltração de neutrófilos observados pela atividade de MPO tecidual, bem como pelo elevado dano tecidual visualizado pela análise histológica já que estas enzimas estão envolvidas no processo de degradação da MEC.

CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram haver uma correlação entre o IAD e o grau de alterações histopatológicas no cólon de animais induzidos por DSS e essas alterações podem ser causadas principalmente por aumento da expressão/atividade MMP principalmente do tipo 9 e por mieloperoxidase produzida por células de resposta inflamatória. Sendo essas enzimas um possível alvo terapêutico para a diminuição de lesão tecidual no tratamento de DII.

REFERÊNCIAS

1. Colli MV, Amaro TA, Pinto ALT, Gaburri PD, Chebli JMF. Toxicidade da azatioprina na doença de Crohn: incidência, abordagem e evolução. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2008;54:415-21
2. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2011;365:1713-25
3. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006;3:390-407
4. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448:427-34
5. Gaudio E, Taddei G, Vetuschi A, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, et al. Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci*. 1999;44:1458-75
6. Byrne FR, Viney JL. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2006;9:207-17
7. Melgar S, Karlsson L, Rehnstrom E, Karlsson A, Utkovic H, Jansson L, et al. Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. *Int Immunopharmacol*. 2008;8:836-44
8. Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2004;50:81-92
9. Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288:G1328-38
10. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990;98:694-702

11. Perse M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:718617
12. Solomon L, Mansor S, Mallon P, Donnelly E, Hoper M, Loughrey M, et al. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. *Comparative Clinical Pathology.* 2010;19:235-39
13. Medina C, Videla S, Radomski A, Radomski MW, Antolin M, Guarner F, et al. Increased activity and expression of matrix metalloproteinase-9 in a rat model of distal colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284:G116-22
14. Naito Y, Yoshikawa T. Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease. *Mol Aspects Med.* 2005;26:379-90
15. Medina C, Radomski MW. Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318:933-8
16. Ravi A, Garg P, Sitaraman SV. Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: boon or a bane? *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:97-107
17. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest.* 1993;69:238-49
18. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982;78:206-9
19. Fietz S, Bondzio A, Moschos A, Hertsch B, Einspanier R. Measurement of equine myeloperoxidase (MPO) activity in synovial fluid by a modified MPO assay and evaluation of joint diseases - an initial case study. *Res Vet Sci.* 2008;84:347-53
20. Miura RO, Yamagata S, Miura Y, Harada T, Yamagata T. Analysis of glycosaminoglycan-degrading enzymes by substrate gel electrophoresis (zymography). *Anal Biochem.* 1995;225:333-40
21. Shapiro SD, Kelley D, Kobayashi D. Measurement of metalloproteinases. *Methods Mol Med.* 2001;56:383-90
22. Yan Y, Kolachala V, Dalmasso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV, et al. Temporal and Spatial Analysis of Clinical and Molecular Parameters in Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis. *PLoS One.* 2009;4:e6073
23. Kullmann F, Messmann H, Alt M, Gross V, Bocker T, Scholmerich J, et al. Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats. *Int J Colorectal Dis.* 2001;16:238-46
24. Prokopowicz Z, Marcinkiewicz J, Katz DR, Chain BM. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2012;60:43-54

25. Lee B, Lee JH, Lee HS, Bae EA, Huh CS, Ahn YT, et al. Glycosaminoglycan degradation-inhibitory lactic acid bacteria ameliorate 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in mice. *J Microbiol Biotechnol*. 2009;19:616-21
26. Lee HS, Han SY, Ryu KY, Kim DH. The degradation of glycosaminoglycans by intestinal microflora deteriorates colitis in mice. *Inflammation*. 2009;32:27-36
27. Garg P, Vijay-Kumar M, Wang L, Gewirtz AT, Merlin D, Sitaraman SV. Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296:G175-84
28. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci*. 2006;11:529-43
29. Siasos G, Tousoulis D, Kioufis S, Oikonomou E, Siasou Z, Limperi M, et al. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis: the impact of matrix metalloproteinases. *Curr Top Med Chem*. 2012;12:1132-48
30. Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, et al. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1999;117:814-22
31. Santana A, Medina C, Paz-Cabrera MC, Diaz-Gonzalez F, Farre E, Salas A, et al. Attenuation of dextran sodium sulphate induced colitis in matrix metalloproteinase-9 deficient mice. *World J Gastroenterol*. 2006;12:6464-72

Figura 1

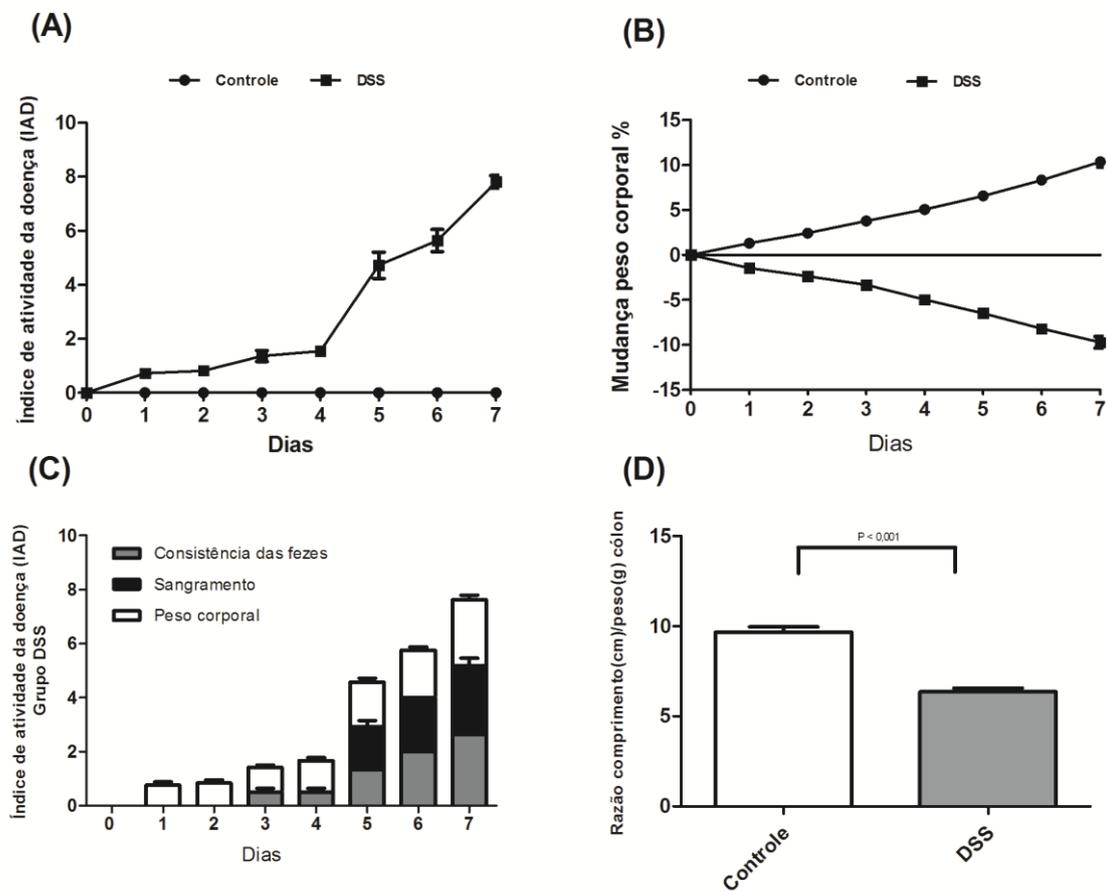


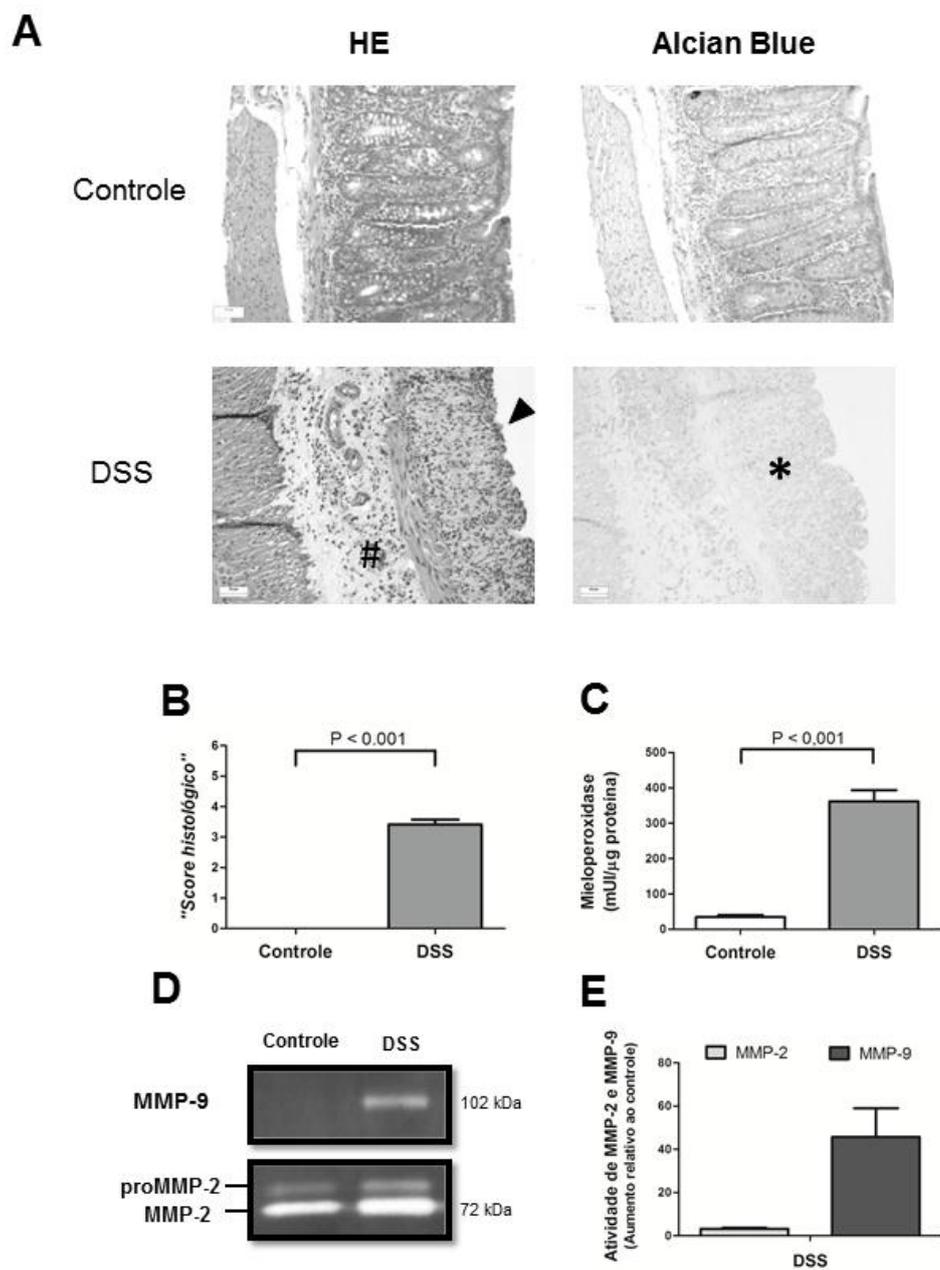
Tabela 2. Análise de parâmetros hematológicos com sangue total-EDTA nos animais dos grupos controle e DSS.

| Grupos | Hematimetria (x 10⁶/mm³) | Hematócrito (%) | Hemoglobina (g/dL) |
|---------------|---|----------------------------|-------------------------------|
| Controle | 8,88 ± 0,17 | 48,0 ± 1,0 | 17,7 ± 0,4 |
| DSS | ^a 6,75 ± 0,58 | ^b 39,3 ± 2,6 | ^a 13,1 ± 1,0 |

Dados representam os valores da média ± erro padrão.

Diferenças estatísticas significativas são mostradas com ^a $P < 0,01$ e ^b $P < 0,05$ comparados ao grupo controle.

Figura 2



LEGENDAS

Fig. 1. Avaliação do Índice de Atividade da Doença (IAD) em modelo de colite induzida por DSS. (A) O IAD do grupo DSS apresentou diferenças a partir do primeiro dia de experimento e (B) uma redução na perda de peso comparado ao grupo controle. (C) Grupo DSS começou apresentar alterações na consistência das fezes a partir do terceiro dia, e presença de sangramentos após o quinto dia de experimento enquanto o grupo controle não teve alterações. (D) Administração de DSS provocou encurtamento do cólon dos animais comparado ao grupo controle. Dados são representados pela média \pm erro padrão médio. DSS – dextran sulfato de sódio.

Fig. 2. Alterações Histopatológicas e Atividade Enzimática presentes no Cólon em modelo de colite induzida por DSS. (A) Mucosa colônica preservada no grupo controle, enquanto no grupo DSS observa-se área de erosões, com perda do epitélio de revestimento (\blacktriangle), edema e infiltrado inflamatório da lâmina própria e submucosa ($\#$), encurtamento e perda de criptas e de células caliciformes ($*$) (HE e azul de Alcian pH 2,5, Barra = 50 μ M). (B) O “*score histopatológico*” mostrou um aumento significativo no grupo DSS comparado ao controle, (C) o mesmo resultado foi observado para a atividade de MPO tecidual. Para análise da atividade de MMP-2 e MMP-9 foi realizado zimograma utilizando 10 μ g de proteína, em gel de poliacrilamida 10% contendo gelatina 2mg/mL. As atividades de MMP-2 e MMP-9 foram quantificadas por densitometria dos zimogramas (D) e representadas como aumento relativo ao grupo controle (E). Dados representam a média \pm erro padrão médio. Diferenças estatísticas significativas são mostradas com $P < 0,001$. DSS – dextran sulfato de sódio; HE – hematoxilina e eosina; MPO – mieloperoxidase; MMP – metaloproteases.

ARTIGO 2**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE CONDROITIM SULFATO E GLUCOSAMINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE ULCERATIVA EM RATOS**

¹Oliveira, L.G.; ¹Cunha, A.L.; ²Ribeiro, L.C.; ¹Duarte, A.C.; ³Castañon, M.C.M.N.;
⁵Michelacci Y. M.; ¹Aguiar, J.A.K; ⁴Chebli, J.M

Luiz Gustavo de Oliveira¹
André Luiz da Cunha¹
Luiz Cláudio Ribeiro²
Amaury Caiafa Duarte¹
Maria Christina Marques Nogueira Castañon³
Yara Maria Michelacci⁵
Jair Adriano Kopke Aguiar¹
Júlio Maria Fonseca Chebli⁴

¹Laboratório de Análises de Glicoconjugados, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil.

²Departamento de Estatística, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil.

³Departamento Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil.

⁴Departamento de Gastroenterologia, Faculdade Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil.

⁵Disciplina de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo.

RESUMO

Introdução: Colite ulcerativa é uma doença inflamatória intestinal que afeta o cólon e o reto, seu tratamento se baseia em anti-inflamatórios, porém seus efeitos adversos em tratamentos prolongados podem atrapalhar a adesão ao tratamento. Condroitim sulfato (CS) e glucosamina (GlcN) são atualmente indicados no tratamento de doenças inflamatórias pelo seu efeito anti-inflamatório, então nós avaliamos os efeitos do CS e GlcN na colite ulcerativa induzida por dextran sulfato de sódio (DSS).

Métodos: Colite foi induzida pela administração oral de DSS 5% por 7 dias. Os efeitos da administração de CS/GlcN no modelo de colite por DSS foram avaliados pelo índice de atividade da doença (IAD), avaliações hematológicas e histológicas. óxido nítrico (NO), atividade de mieloperoxidase (MPO) e metaloproteinases (MMP-2, MMP-9) foram determinadas na mucosa colônica. A composição de glicosaminoglicanos (GAGs) no cólon também foi determinada.

Resultados: O tratamento com CS/GlcN melhorou a severidade da colite aguda em ratos, como observado pela redução do *score* histológico e melhora de parâmetros hematológicos. CS/GlcN também reduziu a produção de NO, a atividade de MPO e de MMP-9 e a concentração de GAG quando comparados ao grupo DSS.

Conclusão: A administração de CS/GlcN levou a uma melhora da colite induzida por DSS em alguns parâmetros envolvidos na resposta inflamatória, mostrando que este medicamento possa vir ser utilizado como uma opção terapêutica.

PALAVRAS-CHAVE: Colite ulcerativa. Dextran sulfato de sódio. Condroitim Sulfato. Glucosamina.

INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) apresentam em comum inflamação crônica do trato gastrointestinal, podendo ter ou não uma causa ou agente patogênico específico¹⁻³. A hipótese mais amplamente utilizada para a patogênese das DII é uma excessiva resposta imune adquirida a algumas bactérias entéricas comensais, principalmente em indivíduos geneticamente susceptíveis, além de fatores ambientais que possam precipitar o início da doença⁴.

Na DII a ativação exagerada de células imunes é observada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6 resultando em dano tecidual. Neste contexto, o fator de transcrição nuclear NF-kB foi identificado como um dos principais reguladores desta resposta imunológica, e sua ativação está induzida na DII⁵. O NF-kB regula a transcrição de genes envolvidos na inflamação e como resultado há o aumento de IL-1 β , IL-6, TNF- α e enzimas como óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metaloproteases (MMPs), fatores que podem perpetuar o processo inflamatório^{6,7}.

Atualmente vários tipos de tratamentos clínicos das DII têm sido empregados para seu controle. Os medicamentos mais utilizados incluem aminossalicilatos, imunossupressores, corticosteróides, imunomoduladores e antibióticos, que são usados tanto para a indução da remissão clínica, como para a manutenção deste estado⁸. Estas drogas têm a capacidade de reduzir as lesões inflamatórias e atenuar a expressão de algumas moléculas pró-inflamatórias^{9,10}. Porém os efeitos benéficos destes medicamentos se contrapõem há uma variedade de efeitos colaterais que podem variar desde apenas mal-estar até a incidência de problemas mais graves¹¹. Portanto, o desenvolvimento de novas terapias para as DII é de grande relevância.

Condroitim sulfato (CS) é um glicosaminoglicano formado por unidades dissacarídicas compostas por resíduos de ácido D-glucurônico e *N*-acetilgalactosamina, podendo ser sulfatadas na posição 4, 6 ou ainda não sulfatada, unidos por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow4)$ ¹². Atribui-se ao CS uma atividade anti-inflamatória sendo atualmente recomendado pela EULAR (European League Against Rheumatism) para o tratamento de osteoartrite (OA) de joelho e de mão, com base em metanálises de diversos estudos clínicos¹³. Em experimentos *in vitro*, o CS reduziu a concentração de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β), e provocou ainda diminuição da

concentração sistêmica e articular de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio possivelmente agindo sobre a translocação do NF- κ B¹⁴. Além disso, o CS reduziu o aumento de proteases de matriz mediado por IL-1 β , como as metaloproteases de matriz (MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 e MMP-14)¹⁵.

Outro composto utilizado em associação com CS no tratamento de osteoartrite, a glucosamina (GlcN) é um monossacarídeo nitrogenado solúvel em água e é uma molécula precursora para a síntese de glicosaminoglicanos, lipídeos e proteínas glicosiladas, sendo um dos açúcares mais abundantes do corpo¹⁶. Estudos sugerem que GlcN possa afetar a degradação da cartilagem, a resposta imune e algumas citocinas no processo inflamatório¹⁶. Em modelo de osteoartrite em condrócitos humanos GlcN reduziu a atividade de NF- κ B¹⁷. GlcN também preveniu o aumento da produção de óxido nítrico e metaloproteases de matriz em modelo *in vitro* de degradação articular em cavalos¹⁸.

CS e GlcN já foram utilizadas em modelo experimental de colite em ratos. Hori et al. 2001, mostrou que o CS diminuiu alguns sinais clínicos e histopatológicos enquanto, Ota et al. 2008 observou um leve efeito do CS no mecanismo inflamatório da colite. Já a GlcN atuou suprimindo a fosforilação de NF- κ B²¹.

Conforme os estudos descritos, estes compostos parecem exercer uma atividade anti-inflamatória no modelo de colite experimental, porém não existem dados do efeito destes medicamentos na atividade de metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9), mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico (NO), bem como na composição de glicosaminoglicanos de matriz extracelular no modelo de colite induzida por DSS. Com isso, estudamos a administração de CS/GlcN, e verificamos os possíveis efeitos destes compostos na colite induzida por DSS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Dextran sulfato de sódio (DSS - MW: 36-50 kDa, MP Biomedicals, Solon, OH, USA); CS/GlcN (Aché Laboratórios Farmacêuticos, SP, Brasil); Brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); Cloridrato de *o*-dianisidina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); Sulfanilamida e *N*-[1-naftil]-etilenodiamina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); Nitrito de sódio (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); Acrilamida (Ludwig Biotecnologia Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil); *N-N'*-metilbisacrilamida (Neon Comercial Ltda., São Paulo, SP, Brasil); Tris (Biosolve Valkenswaard, Holanda); Triton x-100 (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil); Gelatina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); Papaina de látex de *Carica papaya*, e L-cisteína (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); Agarose (Bio-Rad Laboratories Inc., Richmond, CA, EUA); Brometo de *N*-cetil-*N,N,N*-trimetilamônio (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Animais

Ratos machos da linhagem Wistar (entre 6-8 semanas de vida) foram obtidos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil) para os experimentos de indução da colite por dextran sulfato de sódio (DSS). Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Análise de Glicoconjugados, Departamento de Bioquímica, no Instituto de Ciências Biológicas, durante todo o período do experimento em caixas plásticas individuais, forradas com maravalha, em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Água filtrada e ração Nuvilab® foram administradas *ad libitum*. Os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com os preconizados pelo Comitê de Ética Animal da UFJF (002/2010-CEA UFJF) e pelo “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”.

Indução de colite por DSS

O protocolo de indução de colite foi realizado, como descrito por Okayasu et al. 1990, com modificações. Os animais foram randomizados em quatro grupos: grupo Controle (n=16), grupo Controle + CS/GlcN (n=10), grupo DSS (n=10); grupo DSS + CS/GlcN (n=10). Para indução da colite (Grupos DSS e DSS + CS/GlcN), foi

administrado aos ratos solução de DSS 5%, *ad libitum*. Aos animais do grupo controle foi administrado somente água, enquanto para os grupos Controle + CS/GlcN e DSS + CS/GlcN, foi administrada solução de CS/GlcN com ou sem DSS. O volume diário consumido foi de aproximadamente 40 mL correspondendo uma dose diária de CS (125mg/dia) e GlcN (100mg/dia). Após sete dias de experimento, os ratos foram sacrificados por aprofundamento de anestesia com administração de pentobarbital sódico (100mg/kg) e tiveram o cólon e sangue retirados para estudos histológicos e bioquímicos.

Avaliação do índice de atividade da doença

Para análise da colite ulcerativa induzida por DSS utilizou-se o índice de atividade da doença (IAD) descrito por Cooper et al. 1993. Foram considerados os seguintes parâmetros: perda de peso, consistência das fezes e sangramento. A pontuação utilizada foi: nenhuma perda de peso, 0 ponto; perda de peso de 1-5%, 1 ponto; perda de peso de 5-10%, 2 pontos; perda de peso de 10-15%, 3 pontos; e perda de peso maior que 15% sendo considerado 4 pontos. As fezes caracterizadas como normais e bem formadas (0 ponto); fezes soltas e pastosas com aparência de formadas (1 ponto); fezes muito moles (2 pontos); fezes diarreicas (4 pontos). Quanto ao sangramento foi considerado, nenhum sangramento (sangue oculto negativo) (0 ponto), sangue oculto positivo (1); traços de sangue visíveis nas fezes (2) e sangramento retal (4 pontos). O score final foi obtido após o somatório das pontuações de cada item para obtenção do IAD de 0 (ratos saudáveis) a 12 (atividade máxima da colite), dessa forma avaliando a indução da colite e possíveis melhoras do tratamento aos sinais clínicos.

Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

Punção cardíaca foi realizada para coleta de sangue no 7º dia do experimento para realização de análises bioquímicas e hematológicas. No exame hematológico foram avaliados a contagem de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e contagem global de leucócitos. Enquanto que, para avaliações bioquímicas, dosagens de TGO, TGP e albumina sérica foram realizadas conforme instruções de seus respectivos kits de dosagem. As análises foram realizadas no Centro de Biologia da

Reprodução-CBR da UFJF, utilizando analisador hematológico veterinário pocH-100i V Diff (Sysmex) e analisador bioquímico automático Labmax Progress (Labtest).

Análise histológica

As amostras de tecidos (cólon) foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, e seu comprimento e peso medidos para avaliação do encurtamento do tecido (comprimento/peso). Em sequência o cólon foi aberto longitudinalmente e usando a técnica de rocambole (Swiss roll) foi enrolado e fixado com solução de paraformaldeído a 10% em tampão fosfato 0,05M, pH 7,4, por no mínimo 24 horas, processado e incluído em parafina para realização de cortes com 5 μm de espessura e corados. Foram realizadas técnicas de coloração com hematoxilina-eosina (HE), tricrômico de Masson e azul de alcian em pH 2,5.

Análise histológica dos cortes obtidos foi realizada como descrito por Cooper et al. 1993. Sendo a severidade do dano a mucosa avaliada como grau 0, mucosa colônica normal; grau 1, perda de 1/3 das criptas; grau 2, perda de 2/3 das criptas; grau 3, lâmina própria coberta com uma camada única de epitélio e presença de leve infiltrado inflamatório; grau 4, erosões e elevada infiltração de neutrófilos.

Atividade de mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO foi dosada de acordo com Bradley et al. 1982. Resumidamente, a enzima foi extraída de cólon pela homogeneização do tecido em solução de 0,5% brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0. Em seguida a suspensão foi submetida a disruptor de células (3 ciclos de 20 segundos, potência 80%, 20 kHz) em banho de gelo e congelada/descongelada três vezes. Esta suspensão foi então centrifugada 4000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante obtido foi congelado a -80°C . Concentração proteica foi determinada pelo método de Lowry. Misturas de incubação, em microplaca de 96 poços, foram realizadas com 50 μL de amostra, 200 μL de 0,65mM de cloridrato de o-dianisidina e 30 μL de peróxido de hidrogênio 0,09%. Medidas de absorvância foram obtidas em intervalos de 1 minuto em um tempo final de 5 minutos a 450nm. A atividade de MPO foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 11,48 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)²⁵, sendo definido como 1 unidade enzimática (UE) de mieloperoxidase a quantidade de enzima capaz de degradar 1 μmol /min de

peróxido de hidrogênio à 25°C. Os resultados foram expressos como atividade específica (mUE/mg proteína).

Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

Para determinação de NO, a concentração de nitrito foi medida no sobrenadante do tecido homogeneizado com tampão fosfato (PBS). Mistura de volumes iguais de amostra e reagente de Gries (1% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico e 0,1% de *N*-[1-naftil]-etilenodiamina) foram realizadas e absorvância medida a 450nm. A concentração de nitrito foi obtida por curva padrão de nitrito de sódio e expressa como µg de NO/mg de tecido.

Atividade das metaloproteases

A atividade das metaloproteases de matriz foi analisada por zimografia em eletroforese em gel de poliacrilamida com gelatina. Fragmentos do cólon foram macerados em nitrogênio líquido e, em seguida, adicionado 1ml de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, contendo CaCl₂ 100 mM e 1 ml de Triton X-100 0,2% (v/v) para extração das enzimas. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante alíquotado e mantidos a -80°C. A concentração proteica foi determinada pelo método de Lowry. Géis de 0,75 mm foram preparados com solução de acrilamida-bisacrilamida T 30%, C 2,7% e as amostras foram aplicadas (10µg de proteína) para migração eletroforética (20 mA por gel, 4°C) em tampão Tris-glicina (25mM/192mM) pH 8,3 contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%. Para a análise de gelatinases foi acrescentado gelatina 2% como substrato ao gel, antes de sua polimerização. Após a migração, os géis foram lavados duas vezes em 100 mL de Triton X-100 2% (15 min, cada), para remoção do SDS e renaturação das enzimas, e incubados em 100 mL de tampão de incubação (50 mM Tris-HCl, pH 8,2, contendo 5 mM CaCl₂ e 1µM ZnCl₂) por 24h a 37°C. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,5% corante, 30% metanol, 10% ácido acético) e descorados em solução descorante (30% metanol, 10% ácido acético). A atividade das gelatinases foi evidenciada como regiões claras (descoradas) no gel^{26, 27}. Para medir as intensidades das bandas foi utilizado o programa TotalLab Quant ®. As atividades foram corrigidas pelo conteúdo de proteínas.

Extração e análise de glicosaminoglicanos

As cadeias de glicosaminoglicanos foram extraídas após proteólise dos tecidos (cólon) com papaína (2mg/mL) em tampão fosfato-cisteína 0,05M, pH 6,5, na proporção de 2 ml de solução por 100mg de tecido. Após incubação de 18-24 horas a 60°C, proteínas ainda presentes na solução foram precipitados pela adição de ácido tricloroacético (TCA 10%, concentração final), em presença de NaCl 1M (concentração final). Após 10 minutos em banho de gelo o precipitado formado foi removido por centrifugação (6000 rpm, 15 minutos). Para precipitação de ácidos nucleicos foi adicionado ao sobrenadante cloreto de manganês 0,05M por uma hora em banho-maria a temperatura de 60°C. Os GAGs foram precipitados pela adição de 2,5 volumes de etanol, lentamente e sob agitação. Após 18 horas a -20°C, o precipitado formado foi coletado por centrifugação (6000 rpm, 20 minutos), seco a vácuo, ressuspenso em água destilada (100µl). Para identificação e/ou quantificação de GAGs foi utilizado o método de eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3-diaminopropano-acetato 0,05M, pH 9,0 (PDA), desenvolvido por JAQUES et al. 1968 e modificado por DIETRICH e DIETRICH 1976.

O método consiste em aplicar alíquotas (5µl) obtida da extração, a uma lâmina de gel de agarose 0,6% em tampão PDA 0,05M, pH 9,0. A corrida eletroforética foi realizada em uma câmara refrigerada, submetida a uma diferença de potencial de 100V, por aproximadamente 1 hora ou até que se obtenha a migração apropriada. Após a corrida, o gel foi mergulhado em solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) 0,1% por 2 horas para precipitação dos compostos (PGs ou GAGs). O gel então foi seco sob corrente de ar quente e os compostos corados com azul de toluidina 0,1% em solução ácido acético 1%/ etanol 50%, com posterior remoção do excesso de corante com solução de ácido acético 1%/ etanol 50%. Para quantificar os GAGs foi utilizado o programa TotalLab Quant®. As concentrações foram corrigidas pelo peso tecidual.

Análise estatística

Os valores presentes nas figuras e textos são expressos como média \pm erro padrão médio (S.E.M.). Análise estatística dos dados foi realizada utilizando SPSS Statistics para Windows versão 19. Foi avaliada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, a comparação dos dados distribuídos na curva da normalidade foi

realizada pelo one-way ANOVA com o teste de Bonferroni para comparações múltiplas, e Teste t de student quando necessário. $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Avaliação do índice de atividade da doença (IAD) após indução de colite por dextran sulfato de sódio (DSS)

A instalação de colite aguda por DSS foi avaliada pela análise do índice de atividade da doença (IAD) composta por três parâmetros: peso corporal, consistência das fezes e presença de sangramento. Alterações significativas do IAD foram observadas somente a partir do terceiro dia de indução de colite, tanto para o grupo DSS quanto no grupo DSS + CS/GlcN. A administração de condroitim sulfato/glucosamina (CS/GlcN), retardou os sinais clínicos nos dias 3, 5 e 7, mais acentuadamente no quinto dia ($P < 0.05$), seguido por uma pequena melhora nos dias seguintes até o sétimo dia ($P < 0.05$) quando comparado ao grupo DSS (Fig.1A). CS/GlcN também reduziu a perda de peso nos animais induzidos nos dias 6 e 7 comparado ao grupo DSS ($P < 0.05$), enquanto o aumento de peso foi observado nos grupos controles (Fig.1B). Verifica-se também no grupo DSS (Fig.1C) alterações na consistência das fezes a partir do terceiro dia, enquanto que no grupo DSS + CS/GlcN (Fig.1D) essa alteração só foi observada a partir do quinto dia. Já a presença de sangramento nos animais do grupo DSS foi notada uma pontuação muito maior no quinto dia (Fig.1C), sendo este valor menor nos animais induzidos que tiveram a administração de CS/GlcN (Fig.1D). Macroscopicamente, observou-se uma redução no encurtamento do cólon no grupo DSS + CS/GlcN (Fig.1F), porém reduções significativas não foram encontradas quando o comprimento é corrigido pelo peso do tecido (Fig.1E).

Efeitos da administração de CS/GlcN em parâmetros hematológicos e bioquímicos após indução da colite por DSS

A colite aguda induzida por DSS provocou alterações hematológicas diminuindo a contagem de eritrócitos ($P < 0.01$), hematócrito ($P < 0.05$) e hemoglobina ($P < 0.01$), mostrando perda acentuada de sangue comparado ao grupo controle. A administração de CS/GlcN aos animais induzidos mostrou uma menor redução da

contagem de eritrócitos ($P < 0.05$) e hemoglobina ($P < 0.05$) comparado ao grupo DSS (Fig. 2A, B, C). Aumentos no número de leucócitos foram observados tanto no grupo DSS quanto no grupo DSS + CS/GlcN quando comparados aos grupos controles, porém não significativo (Fig. 2D). Foram avaliados também transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e albumina sérica, os resultados mostraram que não houve alterações significativas nos níveis enzimáticos de TGO e TGP quando comparados aos animais saudáveis, já albumina sérica reduziu nos animais do grupo DSS e DSS + CS/GlcN (Tabela 1).

Efeitos da administração de CS/GlcN nas alterações histopatológicas na colite provocada por DSS.

Nos animais do grupo controle e controle + CS/GlcN a mucosa colônica se manteve normal, com o epitélio de revestimento e as criptas intactas (Fig.3A) contrastando com os animais do grupo DSS, que apresentaram áreas multifocais de erosão e ulcerações bem como regiões com perda de mais de 2/3 das criptas. Também, foi observado congestão vascular, edema na lâmina própria, infiltrado inflamatório e depleção de células caliciformes (Fig. 3A). Estas alterações induzidas pela administração do DSS, foram significativamente atenuadas pela administração de CS/GlcN, pois os animais apresentaram um menor encurtamento das criptas e raras áreas de erosões e ulcerações (Fig.3A). Também, foi observado células inflamatórias na lâmina própria em associação com o aumento da atividade mitótica no epitélio das criptas, ou seja, sinais de regeneração em um cenário evidente de injúria prévia. Este resultado observado, também reflete na análise do *score* histológico (Fig.3B, $P < 0.001$). Pela coloração de azul de alcian, observamos que no grupo DSS (Fig.3A) houve redução significativa no número de células caliciformes bem como na produção de mucina enquanto no grupo DSS + CS/GlcN (Fig.3A) houve a manutenção/regeneração de parte das criptas e preservação das células caliciformes evitando a redução na produção de mucinas. A atividade de mieloperoxidase (MPO), um marcador muito utilizado para avaliar a infiltração de neutrófilos tecidual, está aumentada na colite induzida por DSS (Fig.3C). O tratamento do grupo DSS com CS/GlcN reduziu esta atividade de MPO ($P < 0.01$) demonstrando uma redução do infiltrado neutrofílico na área inflamada comparado ao grupo DSS. Estes resultados também são consistentes com as alterações histopatológicas observadas (Fig. 3A).

Efeito da administração de CS/GlcN nos níveis de óxido nítrico (NO) tecidual

A presença de altas dosagens de óxido nítrico (NO) tem sido associada à iniciação e/ou propagação do processo inflamatório, bem como, alteração da resposta imune e dano tecidual. Dessa forma, dosamos os níveis de NO tecidual no cólon dos animais e observamos que NO tecidual foram reduzidos quando houve a administração de CS/GlcN no grupo DSS ($P < 0.05$), enquanto os grupos controles mantiveram um nível basal (Fig.4).

Efeito da administração de CS/GlcN na atividade de metaloproteases de matriz extracelular (MMP) do cólon

Existem grandes evidências do envolvimento de MMPs em condições inflamatórias no intestino, entre elas encontram-se duas gelatinases (MMP- 2 e 9). Para avaliar a atividade de MMP-2 e MMP-9 foram realizadas as extrações e os zimogramas conforme descrito em material e métodos. Os zimogramas e as análises densitométricas mostraram que nos animais saudáveis foi possível identificar somente a atividade de MMP-2 e atividades de MMP de alto peso molecular ($>170\text{kDa}$) (Fig.5A). No grupo DSS, além do aumento da atividade de MMP-2 comparado aos grupos controles, observamos o aparecimento da atividade de MMP-9 de maior peso molecular (102kDa), além da atividade de gelatinases de alto peso molecular ($>170\text{kDa}$). Com o tratamento do grupo DSS + CS/GlcN, notamos que houve uma redução estatisticamente significativa da atividade de MMP-9 ($P < 0.05$) e uma atividade menor de MMP-2 não estatisticamente significativa, observados pela análise densitométrica quando comparado ao grupo DSS (Fig.5B,C).

Efeitos da administração de CS/GlcN nos glicosaminoglicanos (GAGs) presentes no cólon

Mudança nos glicosaminoglicanos de matriz extracelular da mucosa intestinal já foi associada à doença inflamatória intestinal. As dosagens e quantificação dos GAGs mostraram que a indução da colite por DSS foi capaz de aumentar a quantidade de GAGs presentes no cólon ($192.1 \pm 12.8 \mu\text{g/g}$ tecido) comparado ao grupo controle ($132.5 \pm 13.1 \mu\text{g/g}$ tecido) (Fig.6B IV), este aumento de GAG total se relaciona principalmente aos aumentos de CS ($P < 0.01$; Fig.6B I) e HS ($P < 0.01$;

Fig.6B III), já que DS apresentou concentrações próximas ao controle. A administração de CS/GlcN, portanto, foi capaz de diminuir a quantidade de CS e HS (não significativo) e manter a quantidade de DS quando comparado ao grupo colite. O aumento de matriz extracelular também pode ser observado no grupo DSS após coloração por tricrômico de Masson quando comparados aos demais grupos (Fig. 6A). Os valores relativos dos GAGs de cólon também se encontram na tabela 2.

DISCUSSÃO

Associação de condroitim sulfato e glucosamina (CS/GlcN) têm sido muito utilizados no tratamento de diferentes doenças em humanos tais como a osteoartrite^{30, 31}. A glucosamina, além de sua ação condroprotetora, é capaz de inibir a fosforilação de NF-kB bem como a ativação de neutrófilos^{21, 32}. Condroitim sulfato também foi capaz de reduzir a fosforilação de NF-KB e conseqüentemente a redução da formação de citocinas e algumas enzimas^{30, 33} em condrócitos. Embora estes estudos mostrem um efeito anti-inflamatório de CS/GlcN em modelos de inflamação em animais, o estudo da associação destes compostos em modelo de colite experimental não foi descrito ainda. Portanto, investigamos se CS/GlcN apresentam algum efeito anti-inflamatório na colite usando o modelo de DSS.

Em concordância com estudos realizados neste modelo^{20, 21}, a administração de CS/GlcN foi capaz de reduzir o IAD retardando a progressão da colite. Além disso, nosso estudo mostrou que CS/GlcN foi capaz de evitar a redução dos parâmetros hematológicos, sugerindo uma diminuição na perda de sangue dos animais tratados. Administração de CS/GlcN aos animais do grupo DSS também foi capaz de melhorar as manifestações observadas na mucosa colônica reduzindo a inflamação e ulcerações provocadas pelo modelo, bem como a destruição de células calciformes.

A inflamação observada na colite ulcerativa exerce um papel importante, já que a infiltração de leucócitos na mucosa colônica leva a destruição tecidual e a sua disfunção³⁴. Nosso estudo revelou que CS/GlcN está reduzindo a infiltração de neutrófilos nos animais com colite, como observado pela redução significativa da atividade de MPO no cólon, enzima encontrada em grânulos citoplasmáticos de neutrófilos, tendo seu aumento relacionado ao dano tecidual³⁵. Campo et al. 2004 demonstraram também que CS associado à ácido hialurônico (HA) foi capaz de

reduzir a atividade de MPO em modelo agudo de dano hepático. Analisamos também óxido nítrico (NO) tecidual, e mostramos que o aumento dos níveis de NO produzidos nos animais com colite está reduzido no cólon do grupo DSS + CS/GlcN. Este resultado torna-se benéfico na patologia, pois altos níveis de NO têm sido associados à desregulação do sistema imune e ultimamente, a dano celular e tecidual³⁷. Estudos realizados em humanos também observaram que a concentração de NO no reto de pacientes com doença inflamatória intestinal está significativamente maior do que em pacientes saudáveis e a diminuição da produção de NO pela utilização de inibidores ou *knockout* do gene iNOS em ratos mostrou melhoras no curso da colite^{38, 39}.

Como observamos, na colite ulcerativa muitos fatores, como infiltração de neutrófilos, elevação de mediadores pró-inflamatórios, aumento de radicais livres, são implicados na patogênese desta doença. Neste contexto, a atividade de metaloproteases de matriz extracelular é atualmente muito discutida no seu envolvimento com as DII. Estas enzimas e seus inibidores são produzidos no trato gastrointestinal por células estruturais, e uma alteração neste equilíbrio pode provocar algumas condições inflamatórias no intestino⁴⁰. Dentro deste grupo de enzimas se destacam MMP-2, expressa constitutivamente, e MMP-9, ausente nos principais tecidos humanos⁴¹ é considerada como principal responsável por acelerar a destruição de matriz extracelular na colite ulcerativa⁴². Isso foi confirmado quando se observou uma atividade maior de MMP-9 em pacientes com colite ulcerativa comparado a pacientes controles⁴³ e em modelo de animais deficientes de MMP-9 que tiveram colite atenuada. Além disto, utilização de condroitim-4-sulfato em modelo experimental de artrite mostrou que este composto é capaz de reduzir MMP-9⁴⁴ mostrando que esta gelatinase está envolvida no processo inflamatório e sua inibição pode reduzir o processo inflamatório⁴⁵.

Nosso estudo mostrou que a atividade de MMP-2 e MMP-9 estão elevadas durante colite experimental, resultado semelhante ao observado por Garg et al. 2009. Enquanto no grupo DSS + CS/GlcN, a administração dos compostos reduziu significativamente a atividade de MMP-9 sem redução significativa de MMP-2. Este resultado torna-se importante, pois, MMP-9 é considerada um importante mediador de dano tecidual na colite, enquanto MMP-2 exerce uma proteção ao tecido apresentando um importante papel na manutenção da barreira intestinal⁴¹. Dessa forma, CS/GlcN parece agir inibindo essencialmente MMP-9, fato destacável, já que

algumas drogas acabam inibindo as duas gelatinases devido as suas semelhanças. Esses resultados nos levaram a sugerir que a redução de MMP-9 e até mesmo de NO na mucosa colônica seja possivelmente a inibição do NF-kB que está aumentado na DII e é um importante fator de transcrição que possui papel chave na resposta inflamatória, atuando como regulador da expressão de diversos genes pro-inflamatórios, como algumas interleucinas, iNOS e MMPs⁵. Estudos anteriores relacionaram o aumento da atividade de NF-kB no modelo de colite por DSS com o aumento de iNOS e NO, bem como expressão e atividade de MMPs por intermédio do NF-kB. Além disso, já foi relatado que CS e GlcN foram capazes de reduzir/inibir fosforilação do NF-kB em modelos experimentais de inflamação^{21, 30}.

Concentração de GAGs também são alterações observadas na matriz extracelular da mucosa intestinal durante a colite, embora poucos estudos sejam realizados. GAGs sulfatados são os principais constituintes da matriz presente no intestino, entre eles, condroitim sulfato, heparam sulfato, dermatam sulfato e ácido hialurônico^{46, 47}. Russel 1999, sugere que colite ulcerativa seja uma deficiência da barreira de GAGs presente na mucosa colônica, tendo como resultado um aumento da permeabilidade intestinal devido à perda da barreira mecânica e eletrostática exercida pelos GAGs, permitindo assim a penetração de toxinas e gerando resposta inflamatória. Estudos em biópsias utilizando técnicas indiretas na quantificação de GAGs, encontrou anormalidades destes compostos limitado a mucosa na colite ulcerativa, sendo observado perda significativa de GAG na lâmina basal⁴⁹. Porém, nós observamos um aumento de GAGs presentes na matriz do cólon em animais do grupo DSS e grupo DSS + CS/GlcN comparado ao grupo controle, este aumento na síntese de GAGs no colón inflamado sugere uma tentativa de reparo tecidual em que os fibroblastos presentes na lesão aumentem a síntese destes compostos além de outros presentes na MEC, como colágeno^{50, 51}.

Nossos dados sugerem que CS/GlcN demonstraram exercer uma atividade anti-inflamatória no modelo de colite induzida por DSS sendo efetivo na redução da atividade de MPO e na redução do *score* histológico, além reduzir os níveis de NO tecidual. CS/GlcN também atuaram reduzindo a atividade de MMP-9 uma importante protease envolvida no dano tecidual mantendo a atividade de MMP-2. Dessa forma este medicamento se mostra promissor no tratamento das DII devido ao seu efeito anti-inflamatório observado, necessitando de mais estudos com base no mecanismo de ação deste medicamento.

REFERÊNCIAS

1. Ahn BO, Ko KH, Oh TY, Cho H, Kim WB, Lee KJ, et al. Efficacy of use of colonoscopy in dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in rats: the evaluation of the effects of antioxidant by colonoscopy. *Int J Colorectal Dis.* 2001;16:174-81
2. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2002;347:417-29
3. Strober W, Ludviksson BR, Fuss IJ. The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease. *Ann Intern Med.* 1998;128:848-56
4. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2006;3:390-407
5. Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J Intern Med.* 2008;263:591-6
6. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene.* 2006;25:6758-80
7. Vallieres M, du Souich P. Modulation of inflammation by chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18 Suppl 1:S1-6
8. Yamamoto-Furusho JK. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2007;13:1893-6
9. Sartor RB. Pathogenetic and clinical relevance of cytokines in inflammatory bowel disease. *Immunol Res.* 1991;10:465-71
10. Stenson WF, Korzenic J. Inflammatory Bowel Disease. *Textbook of Gastroenterology.* 2003;4 ed.
11. Carter MJ, Lobo AJ, Travis SPL. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut.* 2004;53:v1-v16
12. Lamari FN, Karamanos NK. Structure of Chondroitin Sulfate. In: Nicola V, ed. *Advances in Pharmacology: Academic Press;* 2006:33-48
13. Jordan KM, Arden NK, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JWJ, Dieppe P, et al. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2003;62:1145-55
14. Volpi N. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulphate: new functions from an old natural macromolecule. *Inflammopharmacology.* 2011;19:299-306
15. Imada K, Oka H, Kawasaki D, Miura N, Sato T, Ito A. Anti-arthritic action mechanisms of natural chondroitin sulfate in human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *Biol Pharm Bull.* 2010;33:410-4

16. Sherman AL, Ojeda-Correal G, Mena J. Use of glucosamine and chondroitin in persons with osteoarthritis. *PM R*. 2012;4:S110-6
17. Largo R, Alvarez-Soria MA, Diez-Ortego I, Calvo E, Sanchez-Pernaute O, Egido J, et al. Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003;11:290-8
18. Fenton JI, Chlebek-Brown KA, Peters TL, Caron JP, Orth MW. Glucosamine HCl reduces equine articular cartilage degradation in explant culture. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000;8:258-65
19. Hori Y, Hoshino J, Yamazaki C, Sekiguchi T, Miyauchi S, Horie K. Effects of Chondroitin Sulfate on Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium in Rats. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 2001;85:155-60
20. Ota S, Yoshihara S, Ishido K, Tanaka M, Takagaki K, Sasaki M. Effects of proteoglycan on dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in rats. *Dig Dis Sci*. 2008;53:3176-83
21. Yomogida S, Kojima Y, Tsutsumi-Ishii Y, Hua J, Sakamoto K, Nagaoka I. Glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide, suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Int J Mol Med*. 2008;22:317-23
22. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990;98:694-702
23. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*. 1993;69:238-49
24. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*. 1982;78:206-9
25. Fietz S, Bondzio A, Moschos A, Hertsch B, Einspanier R. Measurement of equine myeloperoxidase (MPO) activity in synovial fluid by a modified MPO assay and evaluation of joint diseases - an initial case study. *Res Vet Sci*. 2008;84:347-53
26. Miura RO, Yamagata S, Miura Y, Harada T, Yamagata T. Analysis of glycosaminoglycan-degrading enzymes by substrate gel electrophoresis (zymography). *Anal Biochem*. 1995;225:333-40
27. Shapiro SD, Kelley D, Kobayashi D. Measurement of metalloproteinases. *Methods Mol Med*. 2001;56:383-90
28. Jaques LB, Ballieux RE, Dietrich CP, Kavanagh LW. A microelectrophoresis method for heparin. *Can J Physiol Pharmacol*. 1968;46:351-60
29. Dietrich CP, Dietrich SM. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem*. 1976;70:645-7

30. Iovu M, Dumais G, du Souich P. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16 Suppl 3:S14-8
31. Pavelka K, Gatterova J, Olejarova M, Machacek S, Giacobelli G, Rovati LC. Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Arch Intern Med*. 2002;162:2113-23
32. Hua J, Sakamoto K, Nagaoka I. Inhibitory actions of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on the functions of neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2002;71:632-40
33. du Souich P, Garcia AG, Verges J, Montell E. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of chondroitin sulphate. *J Cell Mol Med*. 2009;13:1451-63
34. Lv Y, Yang X, Huo Y, Tian H, Li S, Yin Y, et al. Adenovirus-mediated hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein suppresses dextran sulfate sodium-induced acute ulcerative colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18:1950-60
35. Prokopowicz Z, Marcinkiewicz J, Katz DR, Chain BM. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2012;60:43-54
36. Campo GM, Avenoso A, Campo S, Ferlazzo AM, Micali C, Zanghi L, et al. Hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate treatment reduces damage in carbon tetrachloride-induced acute rat liver injury. *Life Sci*. 2004;74:1289-305
37. Cross RK, Wilson KT. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2003;9:179-89
38. Herulf M, Ljung T, Hellstrom PM, Weitzberg E, Lundberg JO. Increased luminal nitric oxide in inflammatory bowel disease as shown with a novel minimally invasive method. *Scand J Gastroenterol*. 1998;33:164-9
39. Vermeiren J, Hindryckx P, Van Nieuwenhuysse G, Laukens D, De Vos M, Boon N, et al. Intrarectal nitric oxide administration prevents cellular infiltration but not colonic injury during dextran sodium sulfate colitis. *Dig Dis Sci*. 2012;57:1832-7
40. Medina C, Radomski MW. Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;318:933-8
41. Garg P, Vijay-Kumar M, Wang L, Gewirtz AT, Merlin D, Sitaraman SV. Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296:G175-84
42. Medina C, Videla S, Radomski A, Radomski MW, Antolin M, Guarner F, et al. Increased activity and expression of matrix metalloproteinase-9 in a rat model of distal colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;284:G116-22

43. Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, et al. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1999;117:814-22
44. Sandya S, Sudhakaran PR. Effect of glycosaminoglycans on matrix metalloproteinases in type II collagen-induced experimental arthritis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007;232:629-37
45. Santana A, Medina C, Paz-Cabrera MC, Diaz-Gonzalez F, Farre E, Salas A, et al. Attenuation of dextran sodium sulphate induced colitis in matrix metalloproteinase-9 deficient mice. *World J Gastroenterol*. 2006;12:6464-72
46. Belmiro CL, Souza HS, Elia CC, Castelo-Branco MT, Silva FR, Machado RL, et al. Biochemical and immunohistochemical analysis of glycosaminoglycans in inflamed and non-inflamed intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis*. 2005;20:295-304
47. Isemura M, Sato N, Munakata H, Aikawa J, Ototani N, Yosizawa Z, et al. Glycosaminoglycans of human colonic mucosa and colonic adenocarcinoma. *Tohoku J Exp Med*. 1984;142:89-95
48. Russell AL. Glycoaminoglycan (GAG) deficiency in protective barrier as an underlying, primary cause of ulcerative colitis, Crohn's disease interstitial cystitis and possibly Reiter's syndrome. *Med Hypotheses*. 1999;52:297-301
49. Murch SH, MacDonald TT, Walker-Smith JA, Levin M, Lionetti P, Klein NJ. Disruption of sulphated glycosaminoglycans in intestinal inflammation. *Lancet*. 1993;341:711-4
50. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2005;41:27-51
51. Eckes B, Kessler D, Aumailley M, Krieg T. Interactions of fibroblasts with the extracellular matrix: implications for the understanding of fibrosis. *Springer Semin Immunopathol*. 1999;21:415-29

FIGURAS

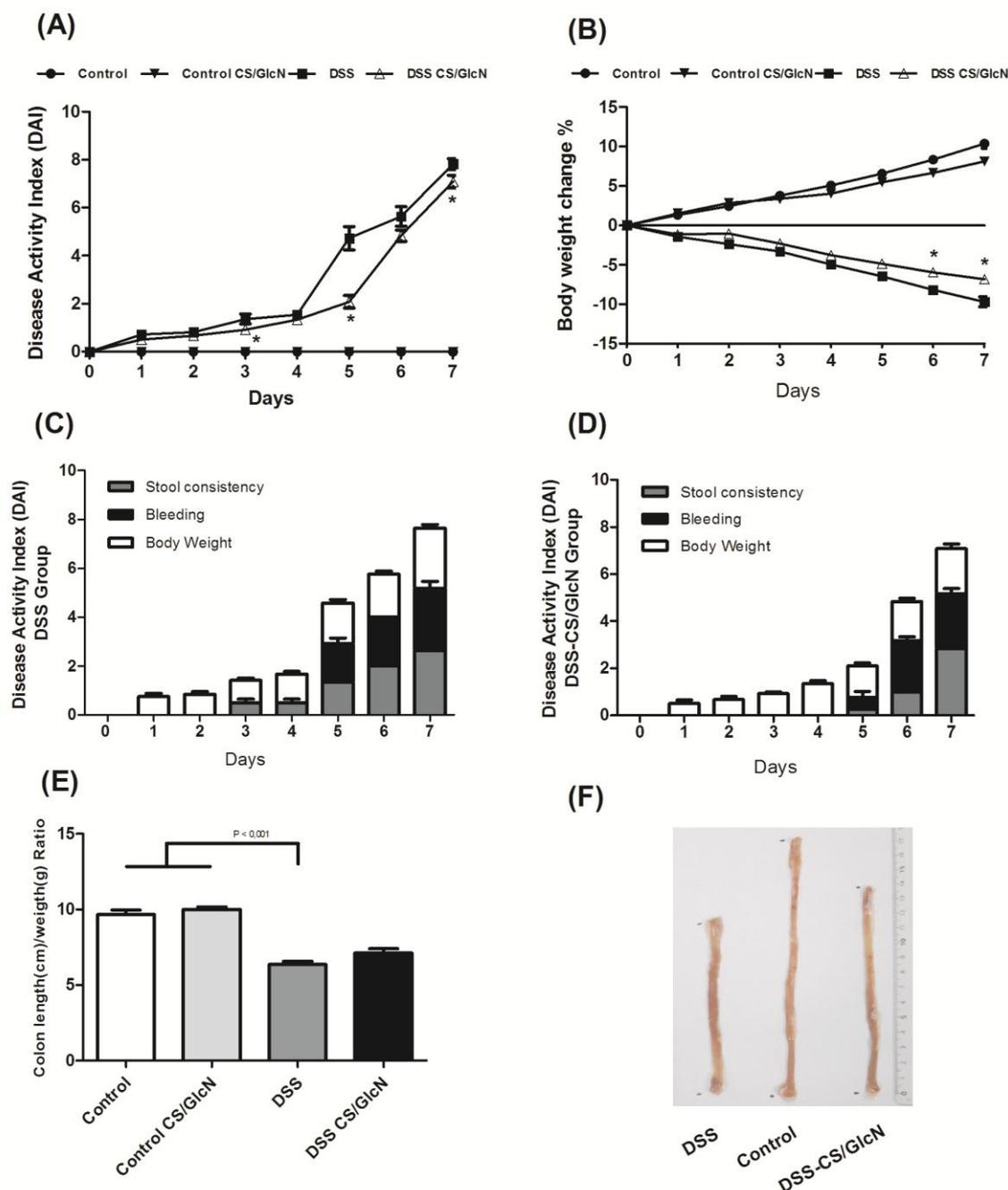


Fig. 1. Efeitos da administração de CS/GlcN no índice de atividade da doença (IAD) em modelo de colite induzida por DSS. O IAD do grupo DSS+CS/GlcN apresentou diferenças significativas nos dias 3, 5 e 7 (A) comparados ao grupo DSS e uma redução na perda de peso (B) nos dias 6 e 7. Administração de CS/GlcN retardou alterações na consistência das fezes e no aparecimento de sangramentos (D) comparado ao grupo DSS (C). Administração de DSS provocou encurtamento do cólon dos animais comparado aos grupos controles (E, F). Dados são representados pela média \pm erro padrão. * $P < 0.05$ vs. grupo DSS.

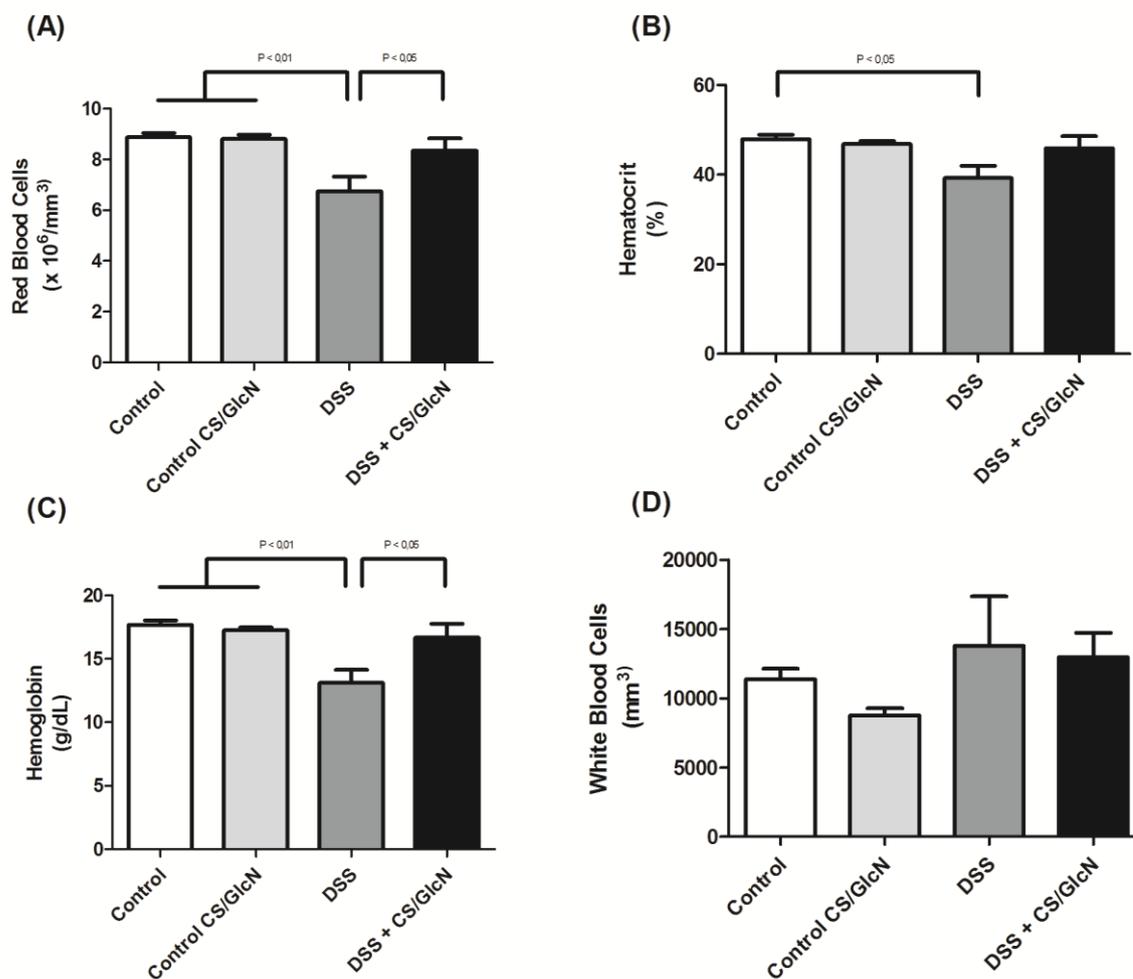


Fig. 2. Administração de CS/GlcN reduziu alterações nos parâmetros hematológicos de hematimetria (A), hematócrito (B), hemoglobina (C) e leucócitos (D). As análises foram realizadas com o sangue total-EDTA e o soro dos animais colhidos no final do experimento. Dados representam os valores da média \pm erro padrão. Diferenças estatísticas significativas são mostradas com $P < 0.01$ e $P < 0.05$.

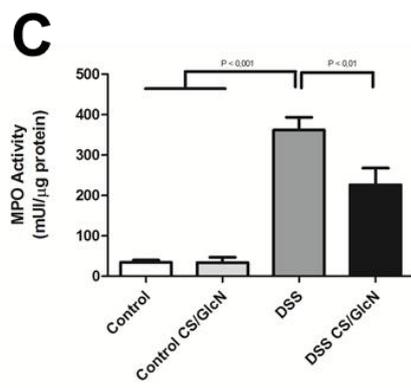
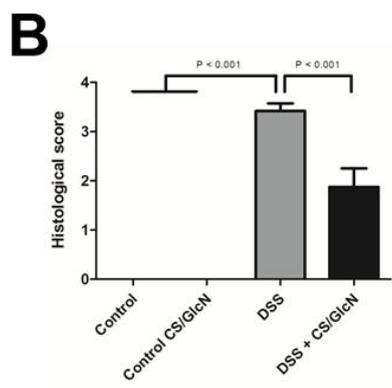
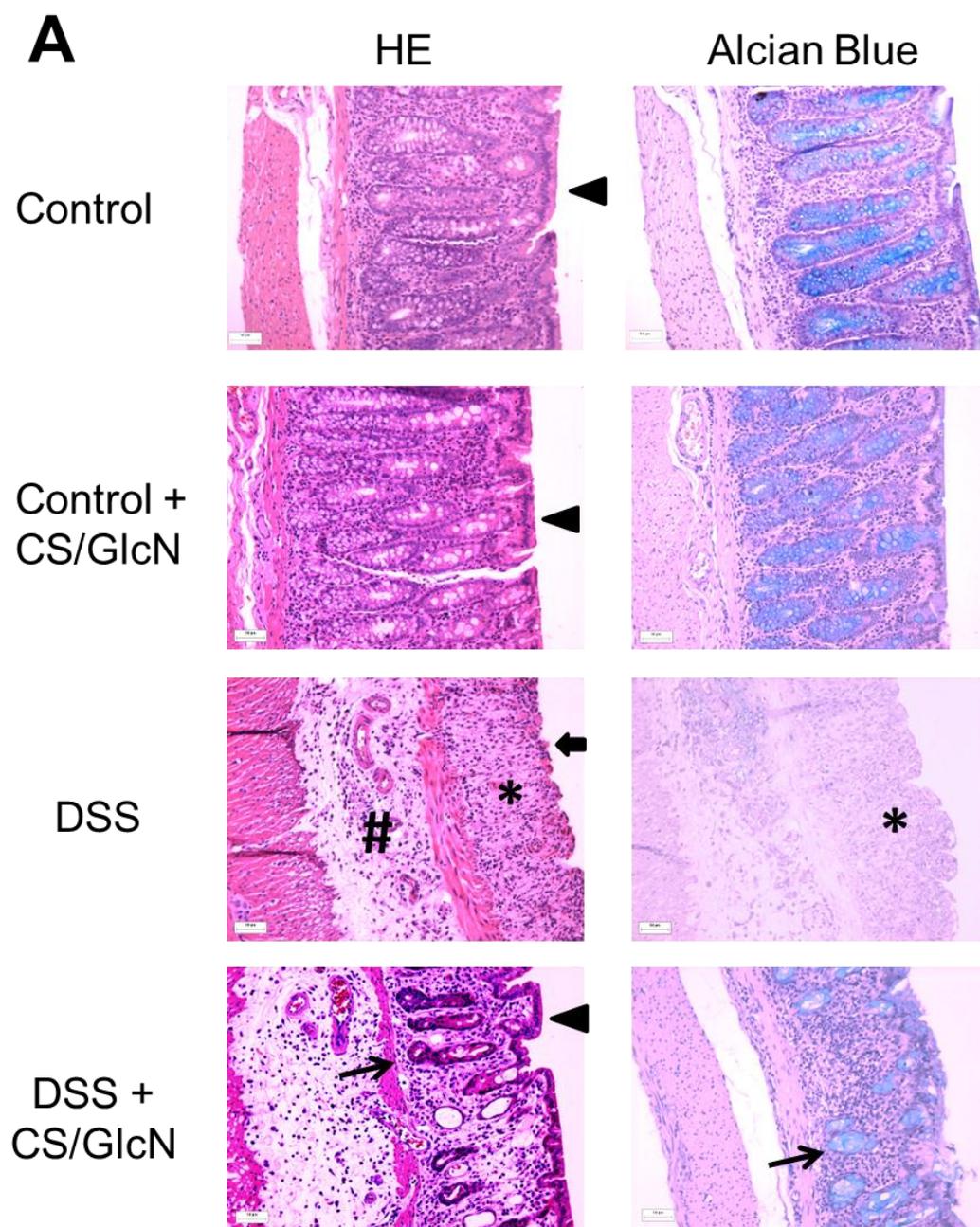


Fig. 3. Análise histopatológica da administração de CS/GlcN em modelo de colite induzida por DSS. O cólon foi fixado e corado em HE e azul de alcian (pH 2.5). (A) Manutenção da estrutura colônica no grupo controle (◀), enquanto no grupo DSS observa-se áreas de erosões e ulcerações com perda de células epiteliais (◀), infiltração de células inflamatórias e edemas (#) (HE), perda de criptas e células caliciformes (*) (azul de alcian), o grupo DSS + CS/GlcN reduziu estas alterações histológicas e o encurtamento das criptas (→). (B) O score histológico mostrou um aumento significativo no grupo DSS comparado ao controle, e o tratamento com CS/GlcN reduziu esse score significativamente comparado ao grupo DSS, (C) o mesmo resultado foi observado para a atividade de MPO tecidual. Dados representam a média ± erro padrão (n=4-6). Diferenças estatísticas significativas são mostradas com $P<0.001$ e $P<0.01$.

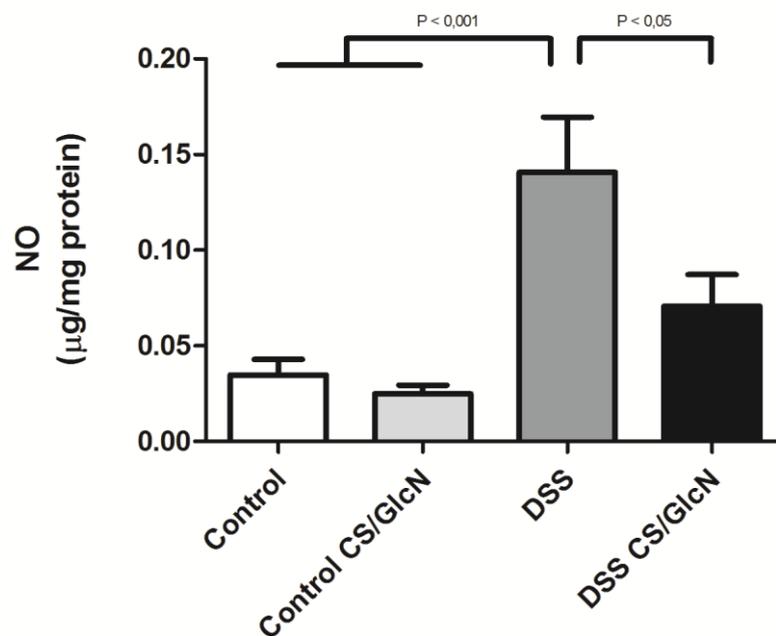


Fig. 4. Administração de CS/GlcN diminui os níveis de NO tecidual no modelo de colite induzida por DSS. Dados representam a média \pm erro padrão. Diferenças estatísticas significativas são mostradas com $P < 0.001$ e $P < 0.05$.

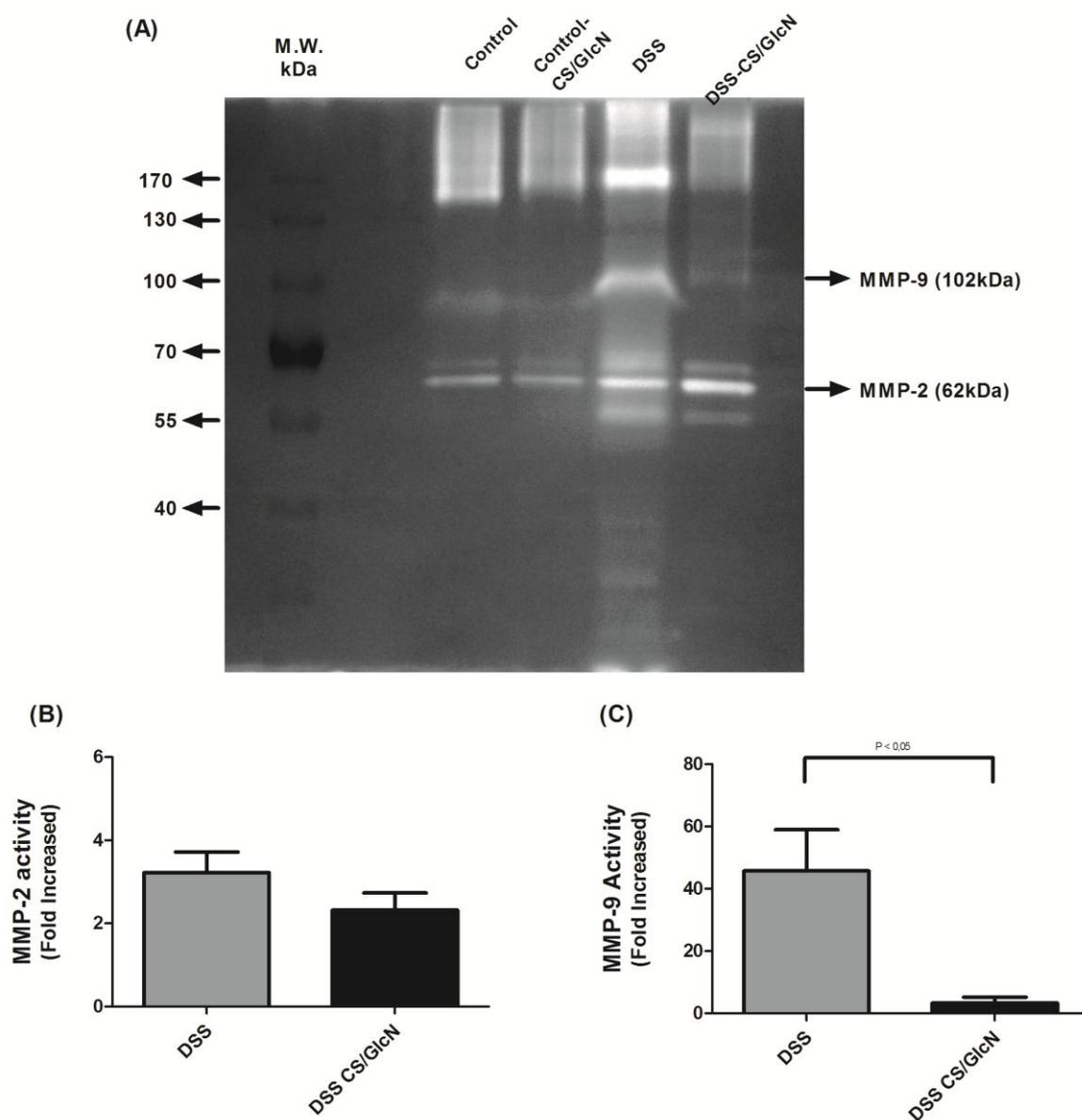


Fig. 5. CS/GlcN reduz atividade de MMP-9 e não da MMP-2 durante colite experimental induzida por DSS. Foi utilizado 10 μ g de proteína total de cada extração, em gel 10% de acrilamida/bis contendo gelatina 2mg/mL com tempo de incubação de 24h (A). As atividades de MMP-2 (B) e MMP-9 (C) foram quantificadas por densitometria e representadas como aumento relativo ao grupo controle. Dados representam média \pm erro padrão. Diferenças estatísticas significativas são mostradas com $P < 0.05$.

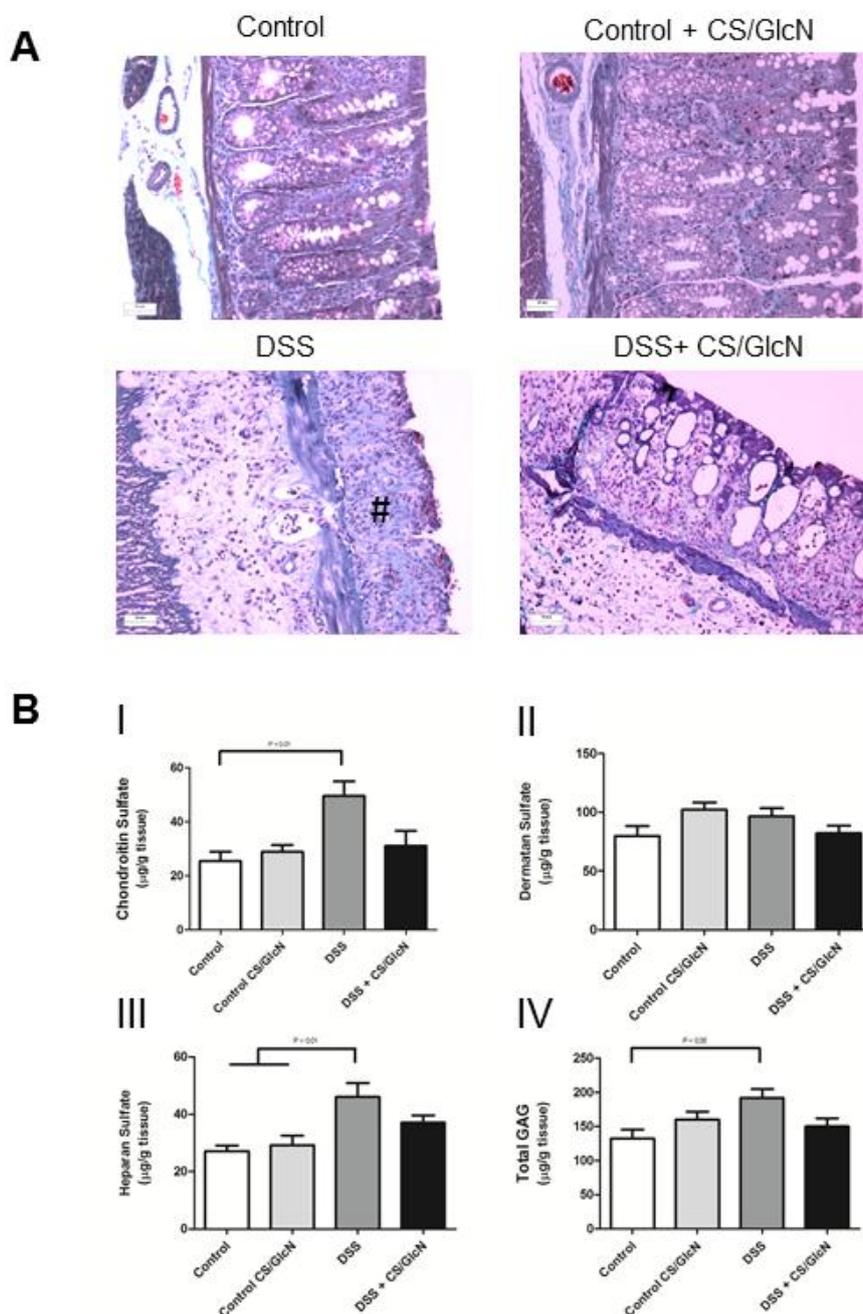


Fig. 6. Análise da composição de glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular (MEC) dos grupos controle, controle CS/GlcN, DSS e DSS+CS/GlcN. (A) Na análise histológica do cólon dos animais dos diferentes grupos pela coloração de Tricrômico Masson, observa-se no grupo DSS um aumento de MEC (#) comparado aos grupos controles, (B) este resultado reflete no aumento de GAG total, principalmente pelo aumento de CS e HS do grupo DSS. Dados representam média \pm erro padrão. Diferenças estatísticas significativas são mostradas com $P < 0.01$ e $P < 0.05$.

TABELAS

Tabela 1. Dosagens bioquímicas de ALT, AST e Albumina no soro dos animais do grupo controle, controle CS/GlcN, DSS e DSS-CS/GlcN.

| Grupo | Dosagens bioquímicas | | |
|------------------|----------------------|------------|-----------------|
| | TGP (U/L) | TGO (U/L) | Albumina (g/dL) |
| Controle | 55.6±3.1 | 143.8±16.0 | 2.9±0.7 |
| Controle-CS/GlcN | 48.6±1.9 | 99.0±3.6 | 2.9±0.7 |
| DSS | 42.3±1.2 | 112.3±10.2 | 2.3±0.5 |
| DSS-CS/GlcN | 43.2±1.0 | 114.2±4.3 | 2.3±0.3 |

Administração de CS/GlcN não alterou os parâmetros analisados, não mostrando diferença significativa entre os grupos. Dados representam a média ± desvio padrão.

Tabela 2. Quantificação de glicosaminoglicanos de matriz extracelular presentes no cólon de ratos Wistar em modelo de colite induzida por DSS.

| Grupo | GAG total <i>µg/g tissue</i> | GAG's | | |
|------------------|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | CS | DS | HS |
| | | | % | |
| Controle | 132,5 ± 13,14 | 19,1 ± 1,15 | 60,0 ± 1,61 | 20,9 ± 0,87 |
| Controle-CS/GlcN | 160,2 ± 11,65 | 18,0 ± 0,61 | 64,0 ± 1,25 | 18,0 ± 0,90 |
| DSS | 192,0 ± 12,81 | 25,9 ± 2,85 | 50,4 ± 2,14 | 23,7 ± 1,31 |
| DSS-CS/GlcN | 150,3 ± 11,94 | 20,0 ± 2,43 | 54,9 ± 2,19 | 25,1 ± 1,65 |

6 CONCLUSÃO

- Administração de CS/GlcN demonstrou exercer atividade anti-inflamatória no modelo de colite induzida por DSS.
- CS/GlcN reduziu a perda de sangue nos animais observado pelos análises hematológicas.
- Administração de CS/GlcN também reduziu o score histológico, juto com a infiltração de neutrófilos observado pela atividade de MPO.
- Análise histológica pelo azul de alcian mostrou que estes compostos evitaram a destruição de células caliciformes e assim a produção de mucinas.
- CS/GlcN diminuiu os níveis de NO tecidual.
- Atividade de MMP-9 foi reduzida, sem alteração na atividade de MMP-2, após administração de CS/GlcN
- Indução da colite por DSS aumentou a concentração de GAGs.

REFERÊNCIAS

AHN, B. O. et al. Efficacy of use of colonoscopy in dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in rats: the evaluation of the effects of antioxidant by colonoscopy. **Int J Colorectal Dis**, v. 16, n. 3, p. 174-81, 2001.

AHUJA, V.; TANDON, R. K. Inflammatory bowel disease in the Asia-Pacific area: a comparison with developed countries and regional differences. **J Dig Dis**, v. 11, n. 3, p. 134-47, 2010.

ATREYA, I.; ATREYA, R.; NEURATH, M. F. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. **J Intern Med**, v. 263, n. 6, p. 591-6, 2008.

BAUGH, M. D. et al. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 117, n. 4, p. 814-22, 1999.

BAUMGART, D. C.; CARDING, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. **Lancet**, v. 369, n. 9573, p. 1627-40, 2007.

BELMIRO, C. L. et al. Biochemical and immunohistochemical analysis of glycosaminoglycans in inflamed and non-inflamed intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. **Int J Colorectal Dis**, v. 20, n. 4, p. 295-304, 2005.

BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 7, p. 521-33, 2003.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v. 78, n. 3, p. 206-9, 1982.

BRASIL. Secretaria de Assistência a Saúde/Ministério da Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para o tratamento de doença de Crohn. Portaria 858, 12 de novembro de 2002. **DOU**, Brasília, n. 214, seção I, p. 77-82, 2002a.

BRASIL. Secretaria de Assistência a Saúde/Ministério da Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para o tratamento de retocolite ulcerativa. Portaria 861/02, 12 de novembro de 2002. **DOU**, Brasília, n. 214, seção I, p. 87-89, 2002b.

BYRNE, F. R.; VINEY, J. L. Mouse models of inflammatory bowel disease. **Curr Opin Drug Discov Devel**, v. 9, n. 2, p. 207-17, 2006.

CAMPO, G. M. et al. Purified human plasma glycosaminoglycans reduced NF-kappaB activation, pro-inflammatory cytokine production and apoptosis in LPS-treated chondrocytes. **Innate Immun**, v. 14, n. 4, p. 233-46, 2008.

CARTER, M. J.; LOBO, A. J.; TRAVIS, S. P. L. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. **Gut**, v. 53, n. suppl 5, p. v1-v16, 2004.

CLEGG, D. O. et al. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. **N Engl J Med**, v. 354, n. 8, p. 795-808, 2006.

COOPER, H. S. et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. **Lab Invest**, v. 69, n. 2, p. 238-49, 1993.

CROSS, R. K.; WILSON, K. T. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 9, n. 3, p. 179-89, 2003.

DANESE, S.; FIOCCHI, C. Ulcerative colitis. **N Engl J Med**, v. 365, n. 18, p. 1713-25, 2011.

DANESE, S.; SANS, M.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. **Autoimmun Rev**, v. 3, n. 5, p. 394-400, 2004.

DIELEMAN, L. A. et al. Role of animal models for the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol Suppl**, v. 223, p. 99-104, 1997.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal Biochem**, v. 70, n. 2, p. 645-7, 1976.

DU SOUICH, P. et al. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of chondroitin sulphate. **J Cell Mol Med**, v. 13, n. 8A, p. 1451-63, 2009.

ELSON, C. O. et al. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 109, n. 4, p. 1344-67, 1995.

FENTON, J. I. et al. Glucosamine HCl reduces equine articular cartilage degradation in explant culture. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 8, n. 4, p. 258-65, 2000.

FIETZ, S. et al. Measurement of equine myeloperoxidase (MPO) activity in synovial fluid by a modified MPO assay and evaluation of joint diseases - an initial case study. **Res Vet Sci**, v. 84, n. 3, p. 347-53, 2008.

GARG, P. et al. Selective ablation of matrix metalloproteinase-2 exacerbates experimental colitis: contrasting role of gelatinases in the pathogenesis of colitis. **J Immunol**, v. 177, n. 6, p. 4103-12, 2006.

GARG, P. et al. Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 296, n. 2, p. G175-84, 2009.

GAUDIO, E. et al. Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. **Dig Dis Sci**, v. 44, n. 7, p. 1458-75, 1999.

GERSEMANN, M.; WEHKAMP, J.; STANGE, E. F. Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. **J Intern Med**, v. 271, n. 5, p. 421-8, 2012.

HAYDEN, M. S.; WEST, A. P.; GHOSH, S. NF-kappaB and the immune response. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6758-80, 2006.

HERULF, M. et al. Increased luminal nitric oxide in inflammatory bowel disease as shown with a novel minimally invasive method. **Scand J Gastroenterol**, v. 33, n. 2, p. 164-9, 1998.

HORI, Y. et al. Effects of Chondroitin Sulfate on Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium in Rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, n. 2, p. 155-160, 2001.

HUA, J.; SAKAMOTO, K.; NAGAOKA, I. Inhibitory actions of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on the functions of neutrophils. **J Leukoc Biol**, v. 71, n. 4, p. 632-40, 2002.

IMADA, K. et al. Anti-arthritic action mechanisms of natural chondroitin sulfate in human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. **Biol Pharm Bull**, v. 33, n. 3, p. 410-4, 2010.

IOVU, M.; DUMAIS, G.; DU SOUICH, P. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 16 Suppl 3, p. S14-8, 2008.

IOZZO, R. V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 609-52, 1998.

ISEMURA, M. et al. Glycosaminoglycans of human colonic mucosa and colonic adenocarcinoma. **Tohoku J Exp Med**, v. 142, n. 1, p. 89-95, 1984.

JACKSON, R. L.; BUSCH, S. J.; CARDIN, A. D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. **Physiol Rev**, v. 71, n. 2, p. 481-539, 1991.

JAQUES, L. B. et al. A microelectrophoresis method for heparin. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 46, n. 3, p. 351-60, 1968.

JOMPHE, C. et al. Chondroitin sulfate inhibits the nuclear translocation of nuclear factor-kappaB in interleukin-1beta-stimulated chondrocytes. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 102, n. 1, p. 59-65, 2008.

JORDAN, K. M. et al. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 12, p. 1145-1155, 2003.

JURJUS, A. R.; KHOURY, N. N.; REIMUND, J. M. Animal models of inflammatory bowel disease. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 50, n. 2, p. 81-92, 2004.

KARLINGER, K. et al. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Eur J Radiol**, v. 35, n. 3, p. 154-67, 2000.

KITAJIMA, S.; TAKUMA, S.; MORIMOTO, M. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. **Exp Anim**, v. 49, n. 1, p. 9-15, 2000.

KJELLEN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interactions. **Annu Rev Biochem**, v. 60, p. 443-75, 1991.

KUGATHASAN, S.; COHEN, S. Searching for new clues in inflammatory bowel disease: tell tales from pediatric IBD natural history studies. **Gastroenterology**, v. 135, n. 4, p. 1038-41, 2008.

LAMARI, F. N.; KARAMANOS, N. K. Structure of Chondroitin Sulfate. In: NICOLA, V. (Ed.). **Advances in Pharmacology**: Academic Press, v. Volume 53, 2006. p.33-48. ISBN 1054-3589.

LAMARI, F. N. et al. Metabolism and biochemical/physiological roles of chondroitin sulfates: analysis of endogenous and supplemental chondroitin sulfates in blood circulation. **Biomed Chromatogr**, v. 20, n. 6-7, p. 539-50, 2006.

LARGO, R. et al. Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 11, n. 4, p. 290-8, 2003.

LEES, C. W. et al. New IBD genetics: common pathways with other diseases. **Gut**, v. 60, n. 12, p. 1739-53, 2011.

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

MAYER, L. Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. **J Gastroenterol**, v. 45, n. 1, p. 9-16, 2010.

MEDINA, C.; RADOMSKI, M. W. Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 318, n. 3, p. 933-8, 2006.

MELGAR, S.; KARLSSON, A.; MICHAELSSON, E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 288, n. 6, p. G1328-38, 2005.

- MELGAR, S. et al. Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. **Int Immunopharmacol**, v. 8, n. 6, p. 836-44, 2008.
- MIURA, R. O. et al. Analysis of glycosaminoglycan-degrading enzymes by substrate gel electrophoresis (zymography). **Anal Biochem**, v. 225, n. 2, p. 333-40, 1995.
- MOLODECKY, N. A.; KAPLAN, G. G. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. **Gastroenterol Hepatol (N Y)**, v. 6, n. 5, p. 339-46, 2010.
- MURCH, S. H. et al. Disruption of sulphated glycosaminoglycans in intestinal inflammation. **Lancet**, v. 341, n. 8847, p. 711-4, 1993.
- NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease. **Mol Aspects Med**, v. 26, n. 4-5, p. 379-90, 2005.
- NELL, S.; SUERBAUM, S.; JOSEPHANS, C. The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 8, p. 564-77, 2010.
- OHTAKE, K. et al. Oral nitrite ameliorates dextran sulfate sodium-induced acute experimental colitis in mice. **Nitric Oxide**, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2010.
- OKAYASU, I. et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 98, n. 3, p. 694-702, 1990.
- OTA, S. et al. Effects of proteoglycan on dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in rats. **Dig Dis Sci**, v. 53, n. 12, p. 3176-83, 2008.
- PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LOPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 8, p. 617-29, 2004.
- PAVELKA, K. et al. Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study. **Arch Intern Med**, v. 162, n. 18, p. 2113-23, 2002.
- PERSE, M.; CERAR, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 718617, 2012.
- PODOLSKY, D. K. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**, v. 347, n. 6, p. 417-29, 2002.
- RA, H. J.; PARKS, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biol**, v. 26, n. 8, p. 587-96, 2007.

RAVI, A.; GARG, P.; SITARAMAN, S. V. Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: boon or a bane? **Inflamm Bowel Dis**, v. 13, n. 1, p. 97-107, 2007.

ROGLER, G.; ANDUS, T. Cytokines in inflammatory bowel disease. **World J Surg**, v. 22, n. 4, p. 382-9, 1998.

RUBIN, D. T.; HANAUER, S. B. Smoking and inflammatory bowel disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 12, n. 8, p. 855-62, 2000.

RUSSELL, A. L. Glycoaminoglycan (GAG) deficiency in protective barrier as an underlying, primary cause of ulcerative colitis, Crohn's disease interstitial cystitis and possibly Reiter's syndrome. **Med Hypotheses**, v. 52, n. 4, p. 297-301, 1999.

SANTANA, A. et al. Attenuation of dextran sodium sulphate induced colitis in matrix metalloproteinase-9 deficient mice. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 40, p. 6464-72, 2006.

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

_____. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 577-94, 2008.

SCHARL, M.; ROGLER, G. Inflammatory bowel disease pathogenesis: what is new? **Curr Opin Gastroenterol**, v. 28, n. 4, p. 301-9, 2012.

SCHMITZ, H. et al. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 116, n. 2, p. 301-9, 1999.

SHAPIRO, S. D.; KELLEY, D.; KOBAYASHI, D. Measurement of metalloproteinases. **Methods Mol Med**, v. 56, p. 383-90, 2001.

SHERMAN, A. L.; OJEDA-CORREAL, G.; MENA, J. Use of glucosamine and chondroitin in persons with osteoarthritis. **PM R**, v. 4, n. 5 Suppl, p. S110-6, 2012.

SOLOMON, L. et al. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. **Comparative Clinical Pathology**, v. 19, n. 3, p. 235-239, 2010.

SOPORI, M. Effects of cigarette smoke on the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 5, p. 372-7, 2002.

STENSON, W. F.; KORZENIC, J. Inflammatory Bowel Disease. **Textbook of Gastroenterology**, v. 4 ed., 2003.

STROBER, W.; LUDVIKSSON, B. R.; FUSS, I. J. The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease. **Ann Intern Med**, v. 128, n. 10, p. 848-56, 1998.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. **J Clin Invest**, v. 107, n. 1, p. 7-11, 2001.

TAYLOR, K. R.; GALLO, R. L. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. **FASEB J**, v. 20, n. 1, p. 9-22, 2006.

VERMEIREN, J. et al. Intrarectal nitric oxide administration prevents cellular infiltration but not colonic injury during dextran sodium sulfate colitis. **Dig Dis Sci**, v. 57, n. 7, p. 1832-7, 2012.

VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, H. R. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of Sao Paulo State, Brazil. **Arq Gastroenterol**, v. 46, n. 1, p. 20-5, 2009.

VOLPI, N. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulphate: new functions from an old natural macromolecule. **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 6, p. 299-306, 2011.

WULLAERT, A. Role of NF-kappaB activation in intestinal immune homeostasis. **Int J Med Microbiol**, v. 300, n. 1, p. 49-56, 2010.

YOMOGIDA, S. et al. Glucosamine suppresses interleukin-8 production and ICAM-1 expression by TNF-alpha-stimulated human colonic epithelial HT-29 cells. **Int J Mol Med**, v. 22, n. 2, p. 205-11, 2008.

YOMOGIDA, S. et al. Glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide, suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. **Int J Mol Med**, v. 22, n. 3, p. 317-23, 2008.

ZINGARELLI, B.; SHEEHAN, M.; WONG, H. R. Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. **Crit Care Med**, v. 31, n. 1 Suppl, p. S105-11, 2003.

ANEXOS

Anexo A – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em experimentação animal.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO -

Certificamos que o Protocolo nº 02/2010 - CEEA sobre "Avaliação do efeito de condroitim sulfato e/ou glucosamina em modelo experimental de colite ulcerativa em ratos", projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Jair Adriano Kopke de Aguiar, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/02/2010.

C E R T I F I C A T E

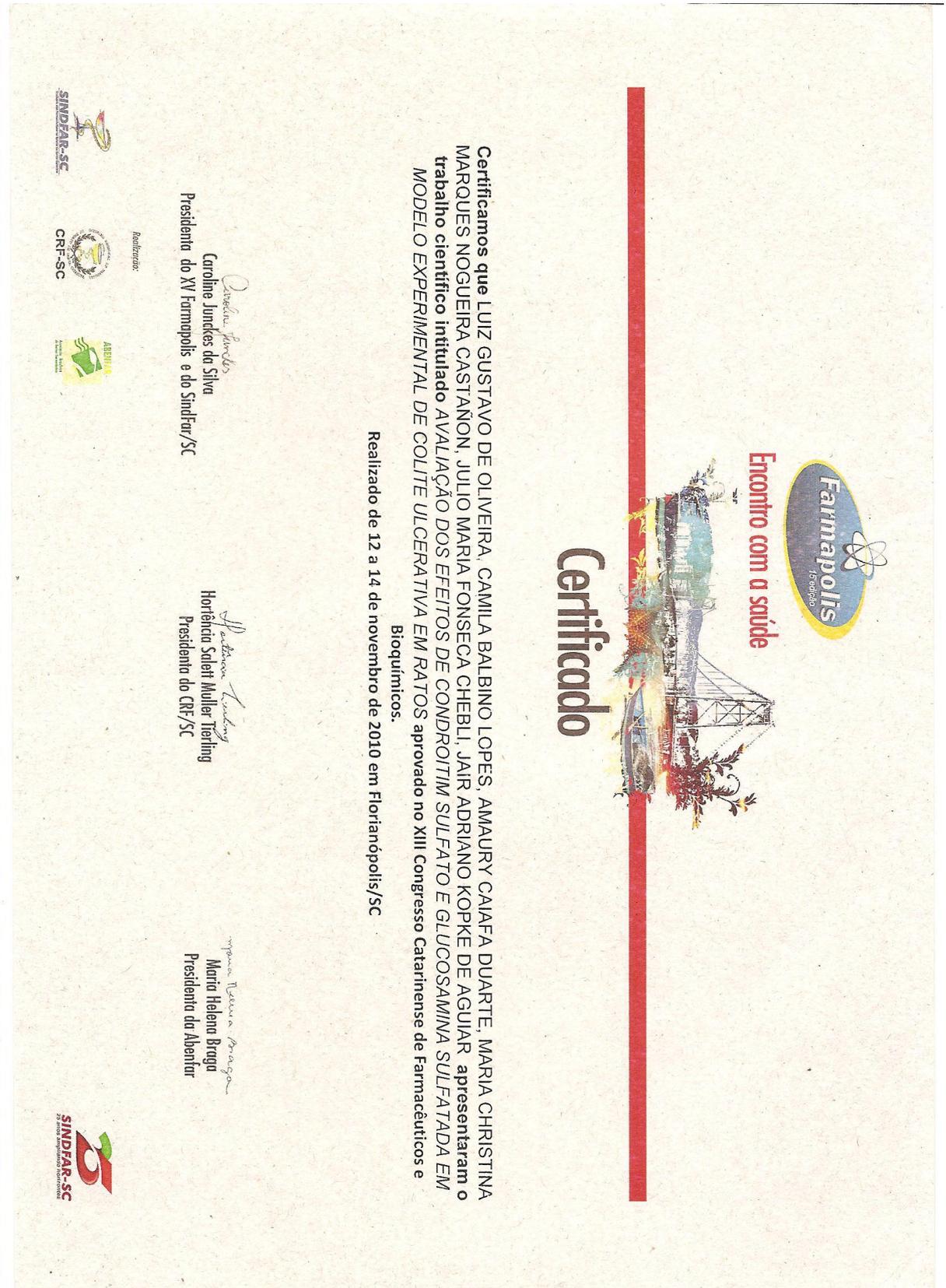
We certify that the protocol nº 02/2010 - CEEA about "Avaliação do efeito de condroitim sulfato e/ou glucosamina em modelo experimental de colite ulcerativa em ratos" - Jair Adriano Kopke de Aguiar - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF - ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 02/02/2010.

Juiz de Fora, 02 de Fevereiro de 2010

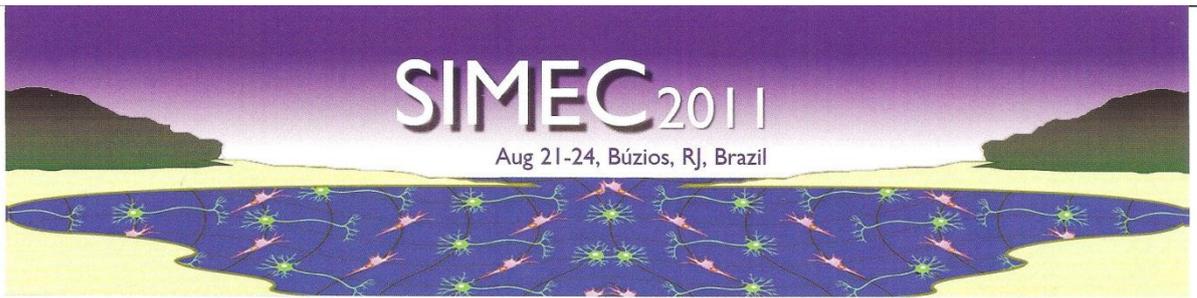

Presidente/CEEA


Secretário/CEEA

Anexo B – Certificado de apresentação do trabalho no XIII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos.



Anexo C – Apresentação do trabalho no VI SIMEC



Certificate

EVALUATION OF EFFECTS OF CHONDROITIN SULFATE AND GLUCOSAMINE SULFATED IN AN EXPERIMENTAL MODEL
OF ULCERATIVE COLITIS IN RATS.

authored by

**OLIVEIRA L. G. D., LOPES C. B., CUNHAA L. D., DUARTEA. C., CASTAÑON M. C. M. N.,
CHEBLI J. M. F., AGUIAR J. A. K. D.**

was presented at the Poster Session during the XI Brazilian Symposium on
Extracellular Matrix and VI International Symposium on Extracellular Matrix
held in Armação dos Búzios, RJ, Brazil, on August 21-24, 2011.


Ruy G. Jaeger


Cecilia Hedin Pereira

Organizing Committee
SIMEC 2011

Anexo D – Certificado de premiação do trabalho na XLI Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBQ)



Sociedade Brasileira de Bioquímica e
Biologia Molecular - SBBq

CERTIFICATE

We hereby certify that the abstract entitled

Evaluation of the Effects of Chondroitin Sulfate and Glucosamine
Sulfated in an Experimental Model of Ulcerative Colitis in Rats. (O-02)

Oliveira, L.G. (UFJF), Santos, B.C. (UFJF), Cunha, A.L. (UFJF), Duarte, A.C. (UFJF), Castañon,
M.C.M.N. (UFJF), Chebli, J.M. (UFJF), Michelacci, Y.M. (UNIFESP), Aguiar, J.A.K. (UFJF)

received the "SBBq AWARD" for the best poster presented during the XLI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), May 19th to 22nd, 2012, in the Convention Center of the Rafain Palace Hotel in Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil.

May 22nd, 2012


Helena C.F. Oliveira

President of SBBq

Braskem
New ways to look at the world

Anexo E – Certificado do Seminário de Saúde Brasileira

**CERTIFICADO**

Certificamos que **LUIZ GUSTAVO DE OLIVEIRA**, aluno do Curso de Mestrado em Saúde, participou do Seminário Saúde Brasileira, realizado pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, apresentando o trabalho intitulado: “Avaliação dos efeitos de **Condroitim sulfato e Glucosamina sulfatada em modelo experimental de Colite Ulcerativa em ratos Wistar**”.

Juiz de Fora, 06 de outubro de 2011.


Prof.ª Dr.ª Darcília Maria Nagen da Costa
Coordenadora Adjunta e de Ensino PPGS/UFJF


Prof. Dr. André Avarese de Figueiredo
Coordenador de Pesquisa PPGS/UFJF