



Felipe Meira de Faria

**“AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA INTESTINAL DE
PROANTOCIANIDINAS DE *Rhizophora mangle* L. NO TRATAMENTO DE
COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ÁCIDO TRI-NITRO-BENZENO
SULFÔNICO (TNBS) EM RATOS E DEXTRANA SAL SÓDICO (DSS) EM
CAMUNDONGOS”**

**Campinas
2013**



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

Felipe Meira de Faria

“AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA INTESTINAL DE PROANTOCIANIDINAS DE *Rhizophora mangle* L. NO TRATAMENTO DE COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ÁCIDO TRI-NITRO-BENZENO SULFÔNICO (TNBS) EM RATOS E DEXTRANA SAL SÓDICO (DSS) EM CAMUNDONGOS”

Orientação: Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

ESTA EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR FELIPE MEIRA DE FARIA, E
ORIENTADO PELA PROFa. Dra. ALBA
REGINA MONTEIRO SOUZA BRITO.



Assinatura do orientador

**Campinas
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

F225a Faria, Felipe Meira de, 1984-
Avaliação da resposta anti-inflamatória intestinal de proantocianidinas de *Rhizophora mangle* L. no tratamento de colite experimental induzida por ácido trinitro-benzeno sulfônico (TNBS) em ratos e dextrana sal sódico (DSS) em camundongos / Felipe Meira de Faria. - Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Alba Regina Monteiro Souza Brito.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Rhizophora mangle*. 2. Proantocianidinas. 3. Doenças inflamatórias intestinais. I. Brito, Alba Regina Monteiro Souza, 1954-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of the intestinal anti-inflammatory response of proanthocyanidins of *Rhizophora mangle* in the treatment of experimental colitis induced by trinitro benzene sulfonic acid (TNBS) in rats and dextran sodium sulfate (DSS) in mice.

Palavras-chave em inglês:

Rhizophora mangle

Proanthocyanidins

Inflammatory bowel diseases

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Alba Regina Monteiro Souza Brito [Orientador]

Stephen Hyslop

Claudio Saddy Rodrigues Coy

Adair Roberto Soares dos Santos

Guillermo Schmeda Hirschmann

Data da defesa: 27-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

FELIPE MEIRA DE FARIA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ALBA REGINA MONTEIRO SOUZA BRITO

MEMBROS:

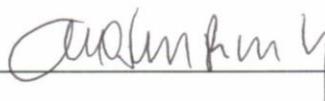
1. PROFA. DRA. ALBA REGINA MONTEIRO SOUZA BRITO



2. PROF. DR. STEPHEN HYSLOP



3. PROF. DR. CLAUDIO SADDY RODRIGUES COY



4. PROF. DR. ADAIR ROBERTO SOARES DOS SANTOS



5. PROF. DR. GUILLERMO SCHMEDA HIRSCHMANN



Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 27 de fevereiro de 2013

Dedicatória

*Dedico este trabalho à
Anderson Luiz Ferreira,
o Dersinho,
grande parceiro,
amigo
e tutor.*

Agradecimentos

É evidente que antes de tudo, agradeço à Profa Alba R. M. S. Brito pela orientação, amizade, conversas, broncas, cervejas, caronas e ajuda;

Aos meus companheiros do Laboratório de Produtos Naturais, a começar por aqueles que já foram voar por outros cantos, como Vítinho, Bitá, Erikinha, Cibele, Maria Silene, Chris, Deborah, Luis e Dersinho, e aqueles que ainda estão na luta, como Cinza, Aninha e Ricardo “Lineuzinho”. Todos vocês foram fundamentais para que os dias de trabalho fossem sempre produtivos, mas, acima de tudo, divertidos;

Aos Professores Marcelo Aparecido, Wagner Vilegas e Lourdes Campaner por todo suporte oferecido desde o preparo dos extratos até a identificação dos taninos;

Aos Professores Carlos Amílcar Parada e Marcos José Salvador, pelas constantes conversas sem pé nem cabeça, e outras tantas bastante cabeça mas, sobretudo pelo apoio e amizade;

À Prof^a Cláudia Helena Pellizzon, pelo apoio técnico com as lâminas histológicas durante a primeira etapa do trabalho;

Ao Prof Paulo Pinto Joazeiro, Sílvio Consonni e Stephanie Federighi também pelo suporte com material histológico, além da amizade e apoio;

À Profa Clélia Akiko Hiruma Lima, pela disponibilidade, conhecimento e apoios dados desde sempre;

Ao Prof Edson Antunes, por ser sempre solícito, educado e gentil, além de profissional exemplar, por quem tenho profunda admiração (Luiz-Ferreira, A, 2009);

Ao Prof Adair Roberto Soares dos Santos, pela amizade, ensinamentos e conversas sempre divertidas e instrutivas, pelo qual também tenho grande admiração;

Aos membros de banca de qualificação, Professores Fabíola Taufic Iglesias, Sisi Marcondes Paschoal e Stephen Hyslop pelas sugestões, puxões de orelha e colaboração à finalização do trabalho;

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar a tese e por, certamente, contribuir com o trabalho, sinto-me honrado por suas presenças;

Ao Prof. Dr. Walber Toma que, além de ser um professor excelente, é de um caráter raro, obrigado pelos ensinamentos e amizade;

Ao Lazineho, grande profissional e amigo;

A muitas pessoas que participaram ativamente de minha vida nesses 40 meses e que de alguma forma me influenciaram positivamente;

À minha mãe, Ana Luísa, que sempre esteve ao meu lado incondicionalmente, deu-me raízes e asas;

À Stephanie Federighi, pela amizade, companhia, alegria, amor e paz que trouxe à minha vida, e tudo mais que há por vir;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, que financiou a execução deste trabalho.

Epígrafe

*“ Ao término de um período de decadência
sobrevém o ponto de mutação.
A luz poderosa que fora banida ressurgue.
Há movimento,
mas este não é gerado pela força...
o movimento é natural, surge espontaneamente.
Por essa razão,
a transformação do antigo torna-se fácil.
O velho é descartado,
e o novo é introduzido.
Ambas as medidas se harmonizam com o tempo,
não resultando daí, portanto, nenhum dano.”*

I Ching
(retirado de “O ponto de mutação” de Fritjof Capra)

SUMÁRIO

RESUMO	XIX
ABSTRACT	XX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS GERAIS	1
1.2 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS (DII).....	1
1.2.1 <i>Epidemiologia</i>	2
1.2.2 <i>Etiologia</i>	3
1.2.3 <i>Fisiopatologia das DII</i>	7
1.2.4 <i>Terapêutica das DII</i>	10
1.2.5 <i>Antioxidantes</i>	14
1.3 PLANTAS MEDICINAIS	16
1.3.1 <i>Polifenóis</i>	17
1.3.2 <i>Rhizophora mangle</i>	18
2 OBJETIVOS.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	21
3.1.1 <i>Coleta do material vegetal</i>	21
3.1.2 <i>Preparação dos extratos e frações vegetais</i>	21
3.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA	22
3.2.1 <i>Preparo das amostras para ESIMS/MS</i>	22
3.2.2 <i>FIA-ESI-IT-MS</i>	22

3.3	DROGAS E REAGENTES.....	23
3.4	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	24
3.5	ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	24
3.5.1	<i>Colite aguda induzida por DSS em camundongos</i>	24
3.5.2	<i>Colite aguda induzida por TNBS em ratos</i>	26
3.5.3	<i>Colite sub-crônica induzida por TNBS em ratos</i>	27
3.6	ENSAIOS <i>EX VIVO</i> PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	28
3.6.1	<i>Níveis de glutathione (GSH)</i>	29
3.6.2	<i>Atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px)</i>	29
3.6.3	<i>Atividade da catalase (CAT)</i>	29
3.6.4	<i>Peroxidação lipídica (TBARS)</i>	30
3.7	ENSAIOS <i>EX VIVO</i> PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	30
3.7.1	<i>Atividade da mieloperoxidase (MPO)</i>	31
3.7.2	<i>Expressão de COX-1 e COX-2</i>	32
3.7.3	<i>Níveis de TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-12 e IL-10</i>	33
3.8	PREPARO DO MATERIAL HISTOLÓGICO.....	34
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4	RESULTADOS	36
4.1	ANÁLISE FITOQUÍMICA	36
4.2	COLITE AGUDA INDUZIDA POR DSS EM CAMUNDONGOS	43
4.3	COLITE AGUDA INDUZIDA POR TNBS EM RATOS	55
4.4	COLITE INDUZIDA POR TNBS COM TRATAMENTO SUB-CRÔNICO EM RATOS	61

5	DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÕES	82
7	PERSPECTIVAS.....	83
8	PUBLICAÇÕES REFERENTES À TESE.....	84
9	BIBLIOGRAFIA	96

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1 Resumo dos fatores relacionados com a etiologia das DII.....	3
Figura 2 <i>R. mangle</i> em manguezal de Santos/SP; cascas secas; cascas secas moídas. (Fotos por Felipe Meira de Faria).....	18
Figura 3 Diagrama da metodologia empregada para extração e fracionamento das cascas de <i>R. mangle</i>	22
Figura 4 Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> de: A) extrato acetona:água (7:3,v/v) ; B) fração aquosa; C) fração butanólica; D) fração acetato de etila de das cascas de <i>R. mangle</i> . Para condições espectrométricas, ver: 3.2 Análise fitoquímica.....	36
Figura 5 Estruturas do monômero (m/z 289) e do dímero da catequina ou [epi]catequina (m/z 577).....	37
Figura 6 Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 885, obtido em modo negativo com energia de colisão de 20%. Para condições espectrométricas ver item 3.2 Análise fitoquímica.....	38
Figura 7 Estrutura proposta para o íon precursor de m/z 1173.....	39
Figura 8 Proposta de fragmentação de uma possível proantocianidina trimérica identificada no extrato das cascas de <i>R. mangle</i> . Os principais mecanismos de fragmentação envolvidos são: RDA (Retro-Diels-Alder), e QM (Quinona Metídeo).....	40
Figura 9 Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 597, obtido em modo negativo com energia de colisão de 20%. Para condições espectrométricas ver item 3.2 Análise fitoquímica.....	41
Figura 10 Estrutura proposta para o íon precursor de m/z 597.....	42

- Figura 11** Intestino de cada grupo experimental do modelo de colite induzida por DSS..... 44
- Figura 12** Fotomicrografias em, corte transversal, de intestinos de camundongos submetidos ao modelo agudo de colite induzida por DSS, mostrando grupo normal (não-colítico ou salina – A e B) e grupo colítico (não-tratado ou DSS controle – C e D). Imagens A, C e E mostram as túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa em aumento de 100x; Figuras B, D e F mostram detalhes da túnica mucosa no em aumento de 200x..... 45
- Figura 13** Fotomicrografias, em corte transversal, de intestinos de camundongos submetidos ao modelo agudo de colite induzida por DSS: grupos tratados com Aq 0.5 mg (A e B), Aq 1.5 mg (C e D) e Aq 3.0 mg (E e F). Imagens A, C e E mostram as túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa em aumento de 100x; Figuras B, D e F mostram detalhes da túnica mucosa no em aumento de 200x..... 46
- Figura 14** Fotomicrografias em corte transversal de intestinos de camundongos submetidos ao modelo agudo de colite induzida por DSS: grupos tratados com BuOH 0.5 mg (A e B), BuOH 1.5 mg (C e D) e BuOH 3.0 mg (E e F). Imagens A, C e E mostram as túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa em aumento de 100x; Figuras B, D e F mostram detalhes da túnica mucosa no em aumento de 200x..... 47
- Figura 15** Fotomicrografias, em corte transversal, de intestinos de camundongos submetidos ao modelo agudo de colite induzida por DSS, mostrando grupos tratados com EtOAc 0,5 mg (A e B), EtOAc 1,5 mg (C e D) e EtOAc 3,0 mg (E e F). Imagens A, C e E mostram as túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa em aumento de 100x; Figuras B, D e F mostram detalhes da túnica mucosa no em aumento de 200x. 48
- Figura 16** Evolução ponderal dos camundongos submetidos ao modelo de colite aguda induzida pela administração de DSS e tratados com Aq, BuOH e EtOAc (0.5, 1.5, 3.0 mg.Kg⁻¹)..... 50
- Figura 17** Efeito da administração oral de BuOH (0.5 e 1.5 mg) e EtOAc (1.5mg) por 7 dias sobre a expressão de COX-1 e COX-2 na mucosa cólica de camundongos

submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida pela administração de DSS. Dados expressos como média \pm d.p. (n = 5), ANOVA seguida de teste <i>a posteriori</i> de Dunnett, * p <0.05 e *** p <0.001 quando comparados com o grupo colítico (DSS).....	53
Figura 18 Fotomicrografias em corte longitudinal de intestinos de ratos submetidos ao modelo agudo de colite induzida por TNBS, mostrando grupos normal (A e B) e colítico (C e D). Imagens A e C mostram corte em aumento de 2x; imagens B e D mostram corte em aumento de 10x.	55
Figura 19 Fotomicrografias em corte longitudinal de intestinos de ratos submetidos ao modelo agudo de colite induzida por TNBS, mostrando grupos BuOH 0,5 mg (A e B), BuOH 1,5 mg (C e D), BuOH 3,0 mg (E e F). Imagens A, C e E mostram corte em aumento de 2x; imagens B, D e F mostram corte em aumento de 10x.	56
Figura 20 Fotomicrografias em corte longitudinal de intestinos de ratos submetidos ao modelo agudo de colite induzida por TNBS, mostrando grupos EtOAc 0,5 mg (A e B), EtOAc 1,5 mg (C e D), EtOAc 3,0 mg (E e F). Imagens A, C e E mostram corte em aumento de 2x; imagens B, D e F mostram corte em aumento de 10x.	58
Figura 21 Evolução ponderal dos ratos submetidos ao modelo de colite crônica induzida pela administração de TNBS e tratados com BuOH 0.5mg.Kg ⁻¹ e EtOAc 1.5mg.Kg ⁻¹	61
Figura 22 Fotomicrografias em corte longitudinal de intestinos de ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS com tratamento sub-crônico, mostrando grupos (A) normal, (B) colítico, (C) BuOH e (D) EtOAc. Imagens mostram as túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa.....	62
Figura 23 Efeito da administração oral de BuOH (0.5 mg.Kg ⁻¹) e EtOAc (1.5 mg.Kg ⁻¹) por 21 dias sobre a expressão de COX-1 e COX-2 na mucosa cólica de camundongos submetidos ao modelo sub-crônico de colite induzida pela administração de TNBS. Dados expressos como média \pm d.p. (n = 5), ANOVA seguida de teste <i>a posteriori</i> de Dunnett, * p <0.05 e ** p <0.01 quando comparados com o grupo colítico (TNBS).	67

Figura 24 Esquema do possível mecanismo de ação de compostos polifenólicos.
Adapatdo de Shapiro *et al*, 2007..... 81

Tabela 1 Agentes biológicos imunomoduladores no tratamento das DII.	13
Tabela 2 DAI, critérios para pontuação de parâmetros de avaliação dos danos causados ao cólon pela administração de DSS.	25
Tabela 3 Critérios de pontuação para avaliação de cortes histológicos do cólon de animais submetidos à colite induzida por DSS.....	26
Tabela 4 Critérios para avaliação das lesões do cólon de ratos submetidos ao modelo de inflamação intestinal induzido por TNBS.....	28
Tabela 5 Efeito dos tratamentos Aq, BuOH e EtOAc nas doses de 0.5, 1.5 e 3.0 mg.Kg ⁻¹ em camundongos submetidos ao modelo de colite aguda induzida pela administração de DSS.....	49
Tabela 6 Efeito dos tratamentos BuOH e EtOAc sobre os níveis cólicos de GSH e atividade das enzimas GSH-Px e MPO na mucosa cólica de camundongos submetidos ao modelo agudo de colite induzida pela administração de DSS....	51
Tabela 7 Efeito dos tratamentos BuOH e EtOAc sobre os níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-1 β e IL-6 na mucosa cólica de camundongos submetidos ao modelo agudo de colite induzida pela administração de DSS.	52
Tabela 8 Resumo dos efeitos dos tratamentos experimentais sobre os itens medidos no modelo de colite aguda induzida por DSS em camundongos.	54
Tabela 9 Avaliação macroscópica dos danos causados pela administração intra-retal de TNBS em modelo experimental de colite aguda.	59
Tabela 10 Efeito dos tratamentos BuOH e EtOAc sobre os níveis de GSH e atividade das enzimas GSH-Px e MPO na mucosa cólica de ratos submetidos ao modelo agudo de colite induzida pela administração TNBS.	60
Tabela 11 Resumo dos efeitos dos tratamentos experimentais sobre os itens medidos no modelo de colite aguda induzida por TNBS em ratos.	60

Tabela 12 Avaliação dos danos causados pela administração intra-retal de TNBS em ratos tratados por 21 dias com BuOH 0.5 mg.Kg ⁻¹ e EtOAc 1.5mg.Kg ⁻¹	63
Tabela 13 Efeito dos tratamentos BuOH e EtOAc sobre os níveis de GSH e atividade das enzimas GSH-Px e CAT na mucosa cólica de ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS com tratamento sub-crônico.	64
Tabela 14 Efeito dos tratamentos BuOH e EtOAc sobre os níveis de TBARS e atividade da MPO na mucosa cólica de ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS com tratamento sub-crônico.....	65
Tabela 15 Efeito dos tratamentos BuOH e EtOAc sobre os níveis de TNF- α , Il-6, IL-12 e IL-10 na mucosa cólica de ratos submetidos ao modelo de colite induzida pela por de TNBS com tratamento sub-crônico.	66
Tabela 16 Resumo dos efeitos dos tratamentos experimentais sobre os itens medidos no modelo de colite aguda induzida por TNBS com tratamento sub-crônico em ratos.	68

Resumo

As doenças inflamatórias intestinais (DII) compreendem doença de Crohn e retocolite ulcerativa inespecífica, ambas caracterizadas por processo inflamatório crônico e descontrolado no intestino mediado por células do sistema imune. DII têm sido objeto de extensas pesquisas nos últimos anos; indefinição sobre etiologia e ausência de tratamento eficaz os justificam. Nesse cenário, produtos naturais surgem como alternativas terapêuticas, uma vez que moléculas com atividade farmacológica pronunciada, especialmente compostos fenólicos, têm merecido destaque. Neste trabalho foram avaliadas três frações orgânicas (aquosa – Aq, butanólica – BuOH, e acetato de EtOAc) obtidas a partir das cascas de *Rhizophora mangle* em modelos experimentais de colite induzida por dextrana sal sódico (DSS) em camundongos e ácido 2,4,6-tri-nitro-benzeno-sulfônico (TNBS) em ratos. BuOH (0.5 e 1.5 mg.Kg⁻¹) e EtOAc (1.5 mg.Kg⁻¹) foram efetivas no modelo de colite por DSS, enquanto BuOH 0.5 mg.Kg⁻¹ e EtOAc 1.5 mg.Kg⁻¹ mostraram-se eficazes na colite aguda por TNBS. No modelo sub-crônico de colite os tratamentos BuOH e EtOAc reduziram novamente os danos causados pelo TNBS, embora BuOH tenha se mostrado mais eficiente. A avaliação de mediadores envolvidos nesses modelos experimentais mostrou que tanto BuOH quanto EtOAc exercem ação sobre a atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) e mieloperoxidase (MPO) bem como sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleucinas 1 β , 6 e 12 (IL-1 β , IL-6 e IL-12), além de reduzirem a expressão de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) no modelo de DSS. No modelo sub-crônico de colite induzida por TNBS, as duas frações atuaram sobre a atividade da GSH-Px e catalase (CAT) e sobre os níveis de glutathiona (GSH), TNF- α e IL-12; EtOH também reduziu os níveis de IL-6 e levou ao aumento de citocina anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10), BuOH por sua vez mostrou-se eficaz em reduzir o índice de peroxidação lipídica (TBARS) e atividade da MPO, atuando também sobre a expressão de ciclo-oxigenase-1 (COX-1). A análise fitoquímica revelou presença de procianidinas oligoméricas nas duas frações ativas, BuOH e EtOAc, sugerindo que estas substâncias sejam responsáveis pelos efeitos produzidos pelos tratamentos experimentais. As frações BuOH e EtOAc apresentaram efeitos importantes sobre os componentes imune, inflamatório e oxidante em modelos experimentais de colite induzida por TNBS e DSS em doses consideradas baixas para uma mistura de substâncias. As procianidinas de *R. mangle* surgem então como alternativa terapêutica interessante sobre as DII.

Abstract

Inflammatory bowel diseases (IBD) comprises Crohn's disease and ulcerative colitis, both are characterized by an immune-mediated chronic inflammatory process in the gut. IBD have been studied over the past few years; undefined etiology and the absence of effective treatments justify these studies. In this scenario, natural products arises as therapeutic alternative, once various studies in animal models have shown efficient treatments. Nowadays, molecules with pronounced pharmacological activities, especially phenolic compounds, have been highlighted. In this work three organic fractions (aqueous – Aq, butanolic – BuOH and ethyl acetate – EtOAc) obtained from *Rhizophora mangle* barks were evaluated in experimental models of dextran sodium sulphate (DSS)-induced colitis in mice and 2,4,6-tri-nitro-benzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis in rats. BuOH (0.5 and 1.5 mg.Kg⁻¹) and EtOAc (1.5 mg.Kg⁻¹) were effective in the DSS-induced model, while BuOH (0.5 mg.Kg⁻¹) and EtOAc (1.5 mg.Kg⁻¹) were also effective in acute TNBS-induced model of colitis, which lead to the evaluation of these last ones in sub-chronic TNBS-induced models of colitis. In this model, both treatments reduced the injury provoked by the instillation of TNBS, although BuOH has shown more efficiency. The evaluation of the mediators involved in these experimental models showed that either BuOH as EtOAc act on the glutathione peroxidase (GSH-Px) and myeloperoxidase activities as well as on pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor- (TNF- α), interferon- (IFN- γ) and interleukins -1 β , 6 and 12 (IL-1, IL-6 and IL-12) levels, and down-regulation of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) expression in the DSS-induced model of colitis. Whereas in the sub-chronic TNBS-induced model of colitis, both fractions showed effects on the GSH-Px and catalase (CAT) activities, and glutathione (GSH), TNF- α and IL-12 levels; EtOAc also reduced IL-6 levels and lead to the enhancement of the levels of an anti-inflammatory cytokine, interlukin-10 (IL-10), on the other hand BuOH showed to be efficient in reducing lipid peroxidation index (TBARS) and MPO activity, acting on the upregulation of cyclo-oxygenase-1 (COX-1). Phytochemistry analysis reveals the presence of oligomeric procyanidins in both fractions, BuOH and EtOAc, suggesting that these substances are responsible for the effects produced by the experimental treatments. BuOH and EtOAc fractions presented important effects on the immune, inflammatory and oxidant components in the experimental models of TNBS and DSS-induced colitis using doses, considered, lower for a mixture of substances. The procyanidins of *R. mangle* became an interesting alternative therapeutic for IBD.

1 Introdução

1.1 Aspectos gerais

O papel do trato gastrintestinal é digerir e absorver nutrientes enquanto propulsiona material não digerido e/ou indigesto; paradoxalmente, a ingestão alimentar traz uma infinidade de antígenos que deve ser impedida de acessar a mucosa. Assim, uma única camada de enterócitos responsáveis pela absorção de nutrientes deve também servir como barreira regulatória – a primeira linha de defesa para a imunidade inata. Os trilhões de bactérias que habitam o cólon humano são benéficos ao seu hospedeiro no lúmen intestinal, auxiliando na digestão, gerando butirato e vitamina D, e limitando a colonização de patógenos (Veldhoen & Brucklacher-Waldert, 2012).

No entanto, as bactérias comensais podem ser um grave problema de saúde se atingirem a circulação. Para tanto, o epitélio que reveste o trato gastrintestinal deve detectar e, quando for o caso, responder às bactérias e seus produtos, outros patógenos, antígenos de alimentos e medicamentos. No caso da inflamação intestinal, agentes patogênicos, bactérias comensais e antígenos representam os gatilhos do processo, ao passo que as células epiteliais, células dendríticas e os macrófagos são os principais componentes que detectam e respondem na sequência (Bach, 2002; Chassaing & Darfeuille-Michaud, 2011).

1.2 Doenças inflamatórias intestinais (DII)

As doenças inflamatórias intestinais (DII) compreendem dois subfenótipos principais, a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI);

ambas compartilham características epidemiológicas e terapêuticas, bem como clínicas, que incluem inflamação crônica da mucosa resultando em diarreia, sangramento, dor abdominal, perda de peso e, em crianças, crescimento retardado (Cho & Brant, 2011). DC e RCUI são distintas pela distribuição da inflamação intestinal (Xavier & Podolsky, 2007) no que se refere à localização (DC pode afetar qualquer porção do trato gastrintestinal; RCUI é restrita ao cólon e reto), distribuição das lesões (difusas em RCUI e esparsas e descontínuas em DC) e profundidade (restrita à mucosa e submucosa em RCUI e transmural em DC).

1.2.1 Epidemiologia

RCUI e DC são doenças da sociedade moderna e sua frequência em países desenvolvidos tem aumentado desde meados do século XX. Quando a DII é diagnosticada numa nova população, a RCUI invariavelmente precede DC e tem maior incidência, sendo esta de 1,2 a 20,3 casos e sua prevalência é de 7,6 a 246 casos em 100 mil por ano. Já a DC apresenta incidência de 0,03 a 15,6 casos e prevalência de 3,6 a 214 casos em 100 mil por ano. Entre as crianças, no entanto, a RCUI é menos prevalente do que a DC. Maior incidência e prevalência das DII são vistas nas populações do norte Europeu e da América do Norte; em contrapartida, a menor ocorre na Ásia continental, onde a RCUI é de longe a forma mais comum encontrada (Danese & Fiocchi, 2011).

1.2.2 Etiologia

A patogênese das DII ainda não está clara, mas se sabe que há uma complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e imunológicos (Figura 1). Há um grande número de evidências de que a origem das DII está associada a uma resposta imune inadequada ou exagerada aos constituintes normais da microbiota intestinal em indivíduos predispostos geneticamente (Khor *et al.*, 2011).

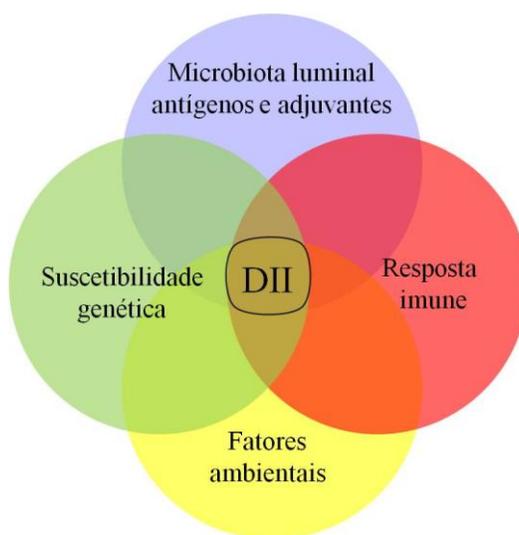


Figura 1 Resumo dos fatores relacionados com a etiologia das DII.

Acredita-se que a perda de tolerância imunológica seja um fator ambiental responsável pela resposta inflamatória descontrolada na DII aguda. Assim, tanto a resposta imune inata quanto aquela adaptativa são elementos-chave na interação entre micro-organismos e hospedeiro (Wirtz & Neurath, 2000).

Dieta, uso de fármacos, condições sócioeconômicas, tabagismo, e alguns agentes patogênicos (por exemplo, *Mycobacterium paratuberculosis*, vírus do sarampo) têm sido implicados no desenvolvimento de inflamação intestinal em

coortes de pacientes (Danese *et al.*, 2004; Krishnan & Korzenik, 2002; Lakatos, 2009; Maunder, 2005; Rigueiro *et al.*, 2005). No entanto, os resultados são controversos, e mais pesquisas são necessárias para uma ligação sólida entre qualquer um desses fatores e DII (Singh *et al.*, 2009).

Estudos em modelos animais mostraram que o estresse psicológico pode resultar em aumento da permeabilidade epitelial, que é mediada por fatores neuronais e imunológicos, e pode aumentar a sensibilidade a estímulos pró-inflamatórios ou reativar a inflamação (Kiank *et al.*, 2010; Soderholm & Perdue, 2001).

Neste contexto, muitos, mas não todos os estudos, suportam conceitos de que estresse precoce ou trauma podem ser fator predisponente para o desenvolvimento ou recidivas de DII (Camara *et al.*, 2009). Mais recentemente, o estresse do retículo endoplasmático (resultando em síntese de proteínas deformadas) e o estresse metabólico (redução da produção de ATP por enterócitos) têm sido apresentados como componentes patogênicos de DII (Kaser & Blumberg, 2010; Kaser *et al.*, 2008). E achados ressaltam a complexidade do processo inflamatório intestinal e sua ligação com supostos fatores etiológicos; disbiose bacteriana, infecções, medicações específicas (por exemplo, drogas anti-inflamatórias não esteroidais – DAINE) e isquemia podem induzir estresse metabólico no enterócito (Lewis & McKay, 2009).

A saúde depende de uma interação benéfica entre hospedeiro e microbiota intestinal. Isto é, certamente, verdade para um intestino saudável, particularmente no cólon que abriga o maior e mais diversificado número de microrganismos. O sistema imunológico do intestino é geralmente tolerante à carga microbiana; uma quebra na tolerância, no entanto, é tida como importante para DII, o que é mais demonstrado em

modelos animais do que em pacientes com DC, sem ter associação alguma com RCUI (Jostins *et al.*, 2012).

Tem sido postulado ainda que alterações na composição da microbiota intestinal, defeitos de imunidade das mucosas ou os dois fatores combinados, podem levar a RCUI; no entanto, as evidências também são escassas. Uma questão fundamental é a caracterização da microbiota intestinal normal e no intestino de pacientes portadores de DII, a qual aguarda respostas do Projeto Microbioma Humano, que visa definir a composição da microbiota intestinal, em condições de saúde e doença (Danese & Fiocchi, 2011).

Há consenso de que a densidade bacteriana é maior em pacientes com RCUI ou DC do que em indivíduos saudáveis, mas as alterações específicas das DII não são claras. O fato da antibiótico-terapia não ter efeito clínico na RCUI, reforça, de modo contrário o papel das bactérias na DII. No entanto, anticorpos séricos antibacterianos estão presentes em pacientes com RCUI, mas são muito mais comuns e encontram-se em níveis mais elevados em pacientes com DC (Morgan *et al.*, 2012).

Predisposição genética é fator importante na etiologia das DII e histórico familiar associado às DII é encontrado em até 20% dos pacientes. A descoberta de que variantes de NOD2 (domínio intracelular de oligomerização de nucleotídeos-2) estão associados com a suscetibilidade à DC abriu uma nova era na pesquisa da base genética das DII. Estudos recentes sugeriram que as influências genéticas desempenham papel mais importante na DC do que na RCUI (Cho & Abraham, 2007).

Entre doenças complexas, estudos de associação genômica têm sido bem sucedidos para as DII, identificando 99 *loci* de risco não sobrepostos, incluindo 28

compartilhados entre a DC e RCUI. Os genes implicados no surgimento de DII no início da infância e da fase adulta são os mesmos, sugerindo contribuição semelhante das predisposições genéticas e vias fisiopatológicas. Somando-se à complexidade na compreensão dos mecanismos da doença, um alelo suscetível muitas vezes requer outros sinais genéticos e não genéticos para a doença se manifestar (Khor *et al.*, 2011).

Ambiente e estilo de vida comum em países desenvolvidos também estão ligados ao aparecimento de DII; tabagismo, dietas ricas em gordura e açúcar, o uso de medicamentos, estresse e alto nível socioeconômico parecem estar associados às DII, assim como à apendicectomia. Remoção de um apêndice inflamado está associada à diminuição na incidência de RCUI, apesar de ter efeito limitado em pacientes com apendicite aguda antes dos 20 anos de idade; uma meta-análise mostrou que a apendicectomia reduziu o risco de desenvolvimento de RCUI em 69% (Ordas *et al.*, 2012).

Outra meta-análise mostrou que fumar protege contra a RCUI em comparação com não-fumantes. Doentes com RCUI que fumam tendem a ter um curso de doença mais leve do que os não-fumantes; a atividade da doença é maior naqueles que param de fumar (Mahid *et al.*, 2006). Por outro lado, fumar parece exacerbar a DC, sugerindo que o tabagismo prejudica a autofagia envolvida com a DC (Lunney & Leong, 2012).

Existem poucas evidências epidemiológicas para estabelecer uma associação entre o uso de DAINÉ não-seletivos e aparecimento ou recidiva de DII (Takeuchi *et al.*, 2006); já o uso de contraceptivos orais está moderadamente associado ao início da doença (Cornish *et al.*, 2008), enquanto o aleitamento materno é protetor contra o

desenvolvimento posterior de DII, mas somente quando o tempo de aleitamento materno ultrapassa três meses (Klement *et al.*, 2004).

1.2.3 Fisiopatologia das DII

Além das barreiras físicas do trato gastrintestinal (por exemplo, ácido gástrico, muco, defensinas, IgA secretora e integridade da camada epitelial) que são fatores limitantes para antígenos e micróbios que entram no organismo, existe um elegante sistema de reconhecimento para discriminar entre microbiota endógena e exógena. Foi demonstrado que existe uma série de receptores codificadores de micróbios (ou sensores) ou assinaturas moleculares, que os reconhecem e que estão amplamente espalhados sobre a mucosa, os padrões moleculares associados a micro-organismos (MAMPS) ligados a receptores de reconhecimento padrão (PRR) são classificados como: (1) receptor toll-like (TLR) e receptor de lectina tipo C, (2) NOD e (3) o gene induzível de ácido retinóico-1 (RIG-1) (Takeuchi & Akira, 2010). A ativação desses receptores ou sensores provoca resposta rápida, geralmente envolvendo fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B) e mobilização de uma cascata pró-inflamatória (Fukata *et al.*, 2005; Stagg *et al.*, 2003).

Dentro do epitélio intestinal, a ativação de NF- κ B demonstrou ser necessária para uma ampla diversidade de funções biológicas, incluindo a sinalização imune inata e apoptose, sendo então um elemento chave na proteção do desenvolvimento da inflamação intestinal (Siggers & Hackam, 2011; Steinbrecher *et al.*, 2008).

A resposta inflamatória do cólon é caracterizada pela migração de diversas células inflamatórias que liberam amplo espectro de mediadores da inflamação, como

as espécies reativas de oxigênio (ERO), lipídios e seus metabólitos, citocinas, quimiocinas e proteases. DII não estão restritas à resposta primária das células epiteliais, mas sim a uma complexa interação entre vários tipos celulares sendo a maioria proveniente do sistema imune (Schrenk, 2009).

DII são caracterizadas pela infiltração de células da imunidade inata (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e *natural killer* - NK) e adaptativa (células B e T) na lâmina própria; números aumentados e ativação destas células na mucosa intestinal elevam os níveis locais de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e várias interleucinas (IL) pro-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e IL-12, IL-23 (Sanchez-Munoz *et al.*, 2008). Em indivíduos saudáveis, esta resposta inflamatória encontra-se sob controle de citocinas imunomoduladoras, consideradas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-11) de forma que estas citocinas estão em equilíbrio com seus equivalentes anti-inflamatórios. Alterações neste equilíbrio conduzem a dano no tecido, como consequência de uma inflamação grave, com manifestações clínicas da enfermidade (Ardizzone & Bianchi Porro, 2002). As citocinas são mediadores fundamentais da interação entre as células imunes ativadas e não-imunes, incluindo células epiteliais e mesenquimais (Andoh *et al.*, 2008).

Citocinas afetam as funções imunológicas, além do paradigma clássico de células T auxiliares Th1/Th2, onde Th1 indica resposta predominantemente mediada pela produção de interferon- γ (IFN- γ) na DC, enquanto na Th2 aponta exagerada na RCUI mediada por aumento na produção de IL-13 (Scaldaferri & Fiocchi, 2007). Assim, (1) as respostas Th1 e Th2 na DC e RUCI, na verdade, podem ser secundárias a defeitos da resposta imune inata; (2) a disfunção de células T reguladoras pode

contribuir para anormalidades imunes das mucosas, e (3) as células Th17, recentemente descritas também estão envolvidas na resposta inflamatória do intestino em ambas as formas de DII (Bouguen *et al.*, 2011).

Na DII, a diferenciação e sobrevivência de células T dependem da quantidade relativa de citocinas-chave reguladoras produzidas, principalmente, por macrófagos e células dendríticas (Monteleone & Caprioli, 2008). Na presença de IL-12 e IFN- γ , células T virgens CD4⁺ adotam um fenótipo Th1, o qual as faz ativar macrófagos que secretam IL-1, IL-6 e TNF- α , criando um ciclo de feedback positivo; já na presença de IL-4, estas células T adotam um fenótipo Th2 (Abraham & Cho, 2009).

O papel do TNF- α parece ser ainda mais amplo, através da ativação do NF- κ B, induzindo a expressão de vários genes como o da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e fator de crescimento endotelial (vEGF). Além disso, múltiplos efeitos biológicos como a indução do recrutamento de leucócitos (incluindo a indução de molécula de adesão de célula vascular, VCAM), secreção de IL e modulação do óxido nítrico (NO) também são atribuídos a esta citocina (Bouguen *et al.*, 2011). Além do TNF- α , outra citocina chave, a IL-12, comanda a resposta inflamatória mediada por células Th1 (Monteleone & Caprioli, 2008). Tanto respostas normais do hospedeiro a agentes patogênicos intracelulares, quanto respostas inflamatórias anormais ligadas a doenças autoimunes, como a DC, onde aumento da produção de IL-12 nas células apresentadoras de antígenos da mucosa intestinal é encontrado, seriam comandados por esta citocina (Bouguen *et al.*, 2011).

O desenvolvimento Th17 é desencadeado por IL-6, IL-21, IL-23 e por fator de transformação do crescimento- β (TGF- β). Embora a função das células Th17 não seja

ainda bem conhecida, existe uma parte importante desta população de células T que expressa receptores de IL-23 (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2008). IL-23, secretada por células apresentadoras de antígeno, é também citocina central envolvida com diferenciação e função das células Th17. A interação IL-23-Th17 medeia defesas microbianas e inflamação intestinal (McGeachy & Cua, 2007).

IL-12 e IL-23 são potentes ativadoras de células Th1 e Th17, respectivamente; ambas são compostas de uma subunidade p40; em consequência anti-p40 pode ter potencial terapêutico na inibição da ativação de Th1 por IL-12 e de Th17 por IL-23 nas DII (Brand, 2009).

1.2.4 Terapêutica das DII

O tratamento deve começar pelo diagnóstico preciso, o que não é tarefa fácil. Somente o conjunto de resultados compreendido por história clínica, anamnese, achados endoscópicos, radiológicos e histológicos, bem como exames laboratoriais definem com precisão tal diagnóstico. O conjunto permite ainda distinguir a DC da RCUI; no entanto, em aproximadamente 10% dos pacientes, pelo menos inicialmente, isto não é possível (Xavier & Podolsky, 2007).

Alguns dos objetivos específicos da farmacoterapia das DII incluem o controle da exacerbação aguda, manutenção da remissão e tratamento das complicações específicas tais como formação de fístulas. Drogas específicas podem ser mais bem adaptadas a um ou mais destes objetivos (Timmer *et al.*, 2012).

Corticosteróides, aminosalicilatos (5-ASA) e agentes imunossupressores, tais como azatioprina e metotrexato, são rotineiramente empregados no tratamento das

DII (Pithadia & Jain, 2011). Os esteróides são o tratamento de escolha para crises moderada e grave, mas são inadequados para uso no longo prazo devido aos seus efeitos colaterais e incapacidade de manter a remissão. Corticosteróides também têm sido empregados quando o 5-ASA se mostra ineficiente. São tratamentos eficazes para DC, mas muitos pacientes experimentam sintomas recorrentes quando as doses são reduzidas ou retiradas, podendo causar dependência (Ray, 2012); além disso, esteroides não são eficazes no tratamento de pacientes de DC com fístulas. Três estudos mostraram que esses pacientes recebendo prednisolona apresentaram piora e tiveram maior necessidade de intervenção cirúrgica em comparação com pacientes que não estavam recebendo corticóides (Nielsen *et al.*, 2009).

Estudos demonstraram que 5-ASA é funcionalmente ativo porque bloqueia a produção de prostaglandinas e leucotrienos, inibe a quimiotaxia dos neutrófilos, a secreção de substâncias pró-oxidantes e a ativação do NF- κ B (Kim *et al.*, 2009). Dentre as preparações de 5-ASA, sulfasalazina e mesalazina (também conhecida como mesalamina) têm sido utilizados por muitos anos no tratamento de DII, tanto para a doença ativa quanto para controle de remissão. Os últimos dados clínicos desses aminossalicilatos no tratamento de DII demonstram que sulfasalazina e mesalazina são úteis para o tratamento da RCUI, ativa ou não, enquanto não têm efeito clínico sobre a DC (Nielsen & Munck, 2007). Os efeitos colaterais do 5-ASA ocorrem em 10 a 45% dos pacientes com RCUI e alguns desses efeitos são dose-dependentes como as dores de cabeça, fadiga e náuseas. Reações alérgicas a esses medicamentos incluem febre, erupção cutânea, síndrome de Stevens-Johnson, hepatite, pneumonia, anemia hemolítica, e imunossupressão (Pithadia & Jain, 2011).

A terapia com azatioprina, um agente imunossupressor, mostrou-se mais eficaz na manutenção da remissão da DC. Azatioprina ou 6-mercaptopurina podem ser eficazes como terapia para manutenção de pacientes em que mesalazina ou sulfassalazina falhou; naqueles pacientes que não toleram essas drogas que necessitam repetidas administrações de esteroides, azatioprina também tem sido usada. Todavia, agentes imunossupressores como a azatioprina, requerem várias semanas de uso para atingir o seu efeito terapêutico, o que significa papel limitado no quadro agudo (Timmer et al., 2012).

Há evidências que sugerem que o metotrexato, um agente imunossupressor administrado por via intramuscular, é benéfico na indução da remissão de DC e eficaz na retirada completa de esteróides nestes pacientes. No entanto, o tratamento com essa droga por via oral não apresenta diferenças com placebo (McDonald *et al.*, 2012). Parece razoável concluir que, na era da terapia biológica, o metotrexato desempenha papel limitado no tratamento de longo prazo das DII (Gonzalez-Lama *et al.*, 2012). Outro imunossupressor usado na clínica médica é a ciclosporina; no entanto uma meta-análise recente mostrou que são poucas as evidências de benefícios associados ao seu uso, assim como do tacrolimo (Khan *et al.*, 2011).

A terapêutica das DII avançou consideravelmente na última década, com a introdução de terapias biológicas que podem direcionar-se especificamente às etapas da cascata imunológica. A entrega da droga para o local apropriado ao longo do trato gastrointestinal também tem sido um grande desafio, e uma segunda geração de agentes têm sido desenvolvidos no sentido de melhorar a entrega da droga, aumentando eficácia e reduzindo efeitos colaterais (Pithadia & Jain, 2011).

Dentre essas terapias, destaca-se o infliximab, um anticorpo monoclonal quimérico contra TNF- α , cujo uso em pacientes com DC (Nakamura *et al.*, 2008) e RCUI (Rutgeerts *et al.*, 2005) já foi aprovado por órgãos competentes (por exemplo, o Food and Drug Administration – FDA). Desde que o infliximab foi introduzido na prática clínica, essa droga ganhou importância no tratamento das DII. As indicações para seu uso incluem DC fistulante e luminal (em adultos e crianças), RCUI recorrente e manifestações extra-intestinais. Nos últimos anos, anticorpos anti-TNF- α totalmente humanos (adalimumab e certolizumab pegol) entraram na prática clínica e ampliaram opções terapêuticas para pacientes com DII. Outro agente biológico recentemente introduzido na terapêutica, o natalizumab, um anticorpo imunoglobulina G4 (IgG4) monoclonal humanizado contra integrina α 4 que inibe a adesão e migração de leucócitos para o tecido inflamado (Ahluwalia, 2012; Eksteen *et al.*, 2008). Os inibidores da fosfodiesterase tiazolo (PDE4I) como rolipram, OPC-6535, mesopram, roflumilaste e tetomilast têm mostrado efeitos benéficos em colite experimental (Ichikawa *et al.*, 2008). Outros alvos biológicos estão resumidos na Tabela 1, abaixo.

Tabela 1 Agentes biológicos imunomoduladores no tratamento das DII.

Alvos moleculares	Anticorpo	Via de administração	de DII	Aprovação pela FDA	Referência
CD3	Visilizumab	IV	RCUI	-	(Baumgart <i>et al.</i> , 2010; Plevy <i>et al.</i> , 2007)
CD40	Ch5D12	IV	DC	-	(Kasran <i>et al.</i> , 2005)
CD25	Daclizumab	IV	RCUI	-	(Van Assche <i>et al.</i> , 2006)
IL-6R	Tocilizumab (MRA)	IV	DC	-	(Ito <i>et al.</i> , 2004)
p40 IL-12/IL-23	Briakinumab e Ustekinumab	IV ou SC	DC	-	(Sandborn <i>et al.</i> , 2008; Toedter <i>et al.</i> , 2009)
Integrina α 4	Natalizumab	IV	DC	+	(Ghosh <i>et al.</i> , 2003; Sandborn <i>et al.</i> , 2005)
Integrina α 4 β 7	MLN-02	IV	RCUI	-	(Feagan <i>et al.</i> , 2005)

Abreviações: IV – intra-venoso; SC – sub-cutâneo. Adaptado de (Ahluwalia, 2012).

No Japão, terapias alternativas como a citofereze extracorpórea (CAP) têm sido adotadas na clínica desde 2009. A técnica tem como objetivo a diminuir populações de células inflamatórias na circulação extracorpórea, utilizando uma coluna com esferas de acetato de celulose que adsorvem granulócitos e monócitos/macrófagos sem linfócitos (granulocitofereze – GMA) (Sakuraba *et al.*, 2009). Outra técnica é o uso de uma coluna, para remoção de leucócitos, que retém e remove a maioria dos granulócitos, macrófagos e linfócitos assim como plaquetas (leucocitofereze – LCAP) (Fukunaga & Matsumoto, 2012). Um estudo realizado nos Estados Unidos da América mostrou que a GMA não é eficaz para RCUI (Sands *et al.*, 2008), entretanto, esse dado pode ser explicado pelo número de sessões adotados no mesmo (até 10). Assim, considerando as práticas adotadas no Japão, a CAP mostrou-se como interessante alternativa terapêutica para RCUI e DC (Fukunaga & Matsumoto, 2012).

Um último foco, mas não menos relevante, tem sido a terapia com microbiota fecal (FMT) envolvendo transplante de bactérias intestinais de uma pessoa saudável para uma pessoa com DII. Estudos recentes ajudaram a identificar os mecanismos pelos quais organismos comensais previnem a inflamação (Reading & Kasper, 2011). Estes estudos destacam o potencial terapêutico da reposição de espécies de *Bacteroidetes* e *Firmicutes* em DII (Damman *et al.*, 2012; Round *et al.*, 2011).

1.2.5 Antioxidantes

Além de vias pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio (ERO) também estão envolvidas na polarização e função de células T regulatórias (Kraaij *et al.*, 2010).

Compreender melhor o papel das ERO nas células e tecidos é fundamental no estudo das variantes das DII (Khor *et al.*, 2011).

O estado redox (redução e oxidação) do intestino depende do equilíbrio entre agentes oxidantes (radicais livres e ERO), e mecanismos antioxidantes (enzimas glutaciona S-transferase e glutaciona peroxidase, GSH-Px). Este estado redox afeta muitas vias de transdução de sinal, como a sinalização do NF- κ B (Schroeder *et al.*, 2011). A importância dos antioxidantes nas DII foi demonstrada em estudo onde camundongos deficientes (*knock-out*) para os genes GPX1 e GPX2 desenvolviam colite espontaneamente (Esworthy *et al.*, 2011). Estudos genéticos têm apontado *loci* contendo GPX1 e GPX4, ressaltando a importância desses mecanismos na DII (Esworthy *et al.*, 2012).

Entre os agentes oxidantes, ERO representam classe importante de moléculas efetoras (ânion superóxido - $\bullet\text{O}_2^-$, peróxido de hidrogênio - $\bullet\text{H}_2\text{O}_2$, radical hidroxila - $\bullet\text{OH}$, principalmente) geradas por fontes mitocondriais e não-mitocondriais. ERO não são tóxicos em níveis basais e ainda são necessários para manter o nicho de células-tronco intestinais. Na imunidade inata, ERO têm atividade antimicrobiana importante, contribuindo para a sinalização intracelular, promovendo produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a geração de ERO por células epiteliais após infecção pode, de forma parácrina, transmitir sinais para as células adjacentes permitindo coordenação local de produção de quimiocinas (Dolowschiak *et al.*, 2010).

1.3 Plantas medicinais

Na atualidade, plantas medicinais continuam recebendo atenção como alternativa às drogas sintéticas, com cerca de 80% da população mundial dependendo de plantas para cuidados primários de saúde, de acordo com estimativa da OMS (Fang *et al.*, 2005). A dependência passada e presente de plantas como fonte de medicamentos impulsiona os estudos etnofarmacológicos visando aproximar eficácia, segurança e descoberta de novas drogas (Ningthoujam *et al.*, 2012).

A pesquisa com plantas medicinais envolve critérios adequados na seleção de espécies para investigação farmacológica. A escolha de uma planta com base em seu uso na terapêutica tradicional (etnofarmacologia) aumentaria a possibilidade de descobrir novos compostos; porém, quando a seleção baseia-se nos constituintes químicos encontrados num dado gênero ou família (quimiosistemática) é também atrativa pela mesma razão (Gurib-Fakim, 2006).

A fitoterapia inclui práticas e terapias muito utilizadas fora da medicina ocidental convencional. No entanto, há evidências controladas limitadas que indicam a eficácia de tratamentos utilizados na medicina tradicional chinesa, como o gel de *Aloe vera*, suco de gérmen de trigo, *Boswellia serrata* e colostro bovino no tratamento da DII. Os benefícios potenciais da fitoterapia começam por alta aceitação pelos pacientes, eficácia, relativa segurança e baixo custo. Pacientes, em todo o mundo, parecem ter adotado plantas medicinais como forma importante de tratamento. Plantas medicinais têm sido testadas em centenas de estudos clínicos para o tratamento das DII. As evidências sobre as plantas medicinais são incompletas, complexas e, algumas vezes, confusas, além de estarem associadas a riscos e

benefícios. Assim estudos clínicos controlados sobre eficácia das plantas medicinais no tratamento das DII, juntamente com melhorias na respectiva legislação, tenderiam a maximizar qualidade e segurança dos fitomedicamentos (Ke *et al.*, 2012).

1.3.1 Polifenóis

Dentre os diversos compostos químicos presentes nas plantas medicinais encontram-se os polifenóis. Historicamente, a importância dos taninos está ligada às suas propriedades de transformar a pele animal em couro, ou tanar, através de ligações entre as fibras de colágeno e esses compostos. Taninos são substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular de até 3000 Dalton, as quais apresentam habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas. A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades como fatores de controle de insetos, fungos e bactérias tanto quanto para suas atividades farmacológicas (Quideau *et al.*, 2011).

As atividades farmacológicas dos taninos são (ao menos em parte) atribuídas a três características gerais comuns: i) complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, dentre outros); ii) atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; iii) habilidade de complexar-se com macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos. Foi sugerido que os possíveis modos de ação dos taninos no tratamento de doenças estejam intimamente ligados a essas três propriedades (Haslam, 1996).

Com diferentes estruturas químicas, taninos ocorrem em todo o planeta nas plantas medicinais e alimentares; apresentam diversas atividades biológicas e

farmacológicas, as quais são, muitas vezes, específicas para determinadas estruturas, além de significativas para a saúde humana (Okuda, 2005).

1.3.2 *Rhizophora mangle*

Espécies do gênero *Rhizophora* são conhecidas pelas várias propriedades medicinais de seus taninos; por exemplo, *R. apiculata* (Rahim *et al.*, 2008; Vijayavel *et al.*, 2006) e *R. stylosa* (Li *et al.*, 2007; Takara *et al.*, 2008) possuem atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres. *R. mangle* (Figura 2) é conhecida popularmente como “Mangue-Vermelho”, “Candapuva”, “Guaraparaíba”, “Mangue Garobeira”, “Mangue de Espeto”, “Mangue de Pendão”, “Mangue Preto”, “Mangue Sapateiro”, “Paxiubarana” e “Mangue Verdadeiro”, principalmente no nordeste do Brasil. Também tem denominação popular como “Mangle Rojo” e “Mangle Colorado”



Figura 2 *R. mangle* em manguezal de Santos/SP; cascas secas; cascas secas moídas. (Fotos por Felipe Meira de Faria).

no idioma espanhol e “Red Mangrove” no inglês. A espécie é encontrada em todo litoral do Brasil e de outros países como México e África do Sul, nas Antilhas e Ilhas do Pacífico (países caribenhos); possui importância econômica como fornecedora de taninos (que compreendem 15 a 36% da massa seca) extraídos das cascas sendo a planta um dos mais importantes adstringentes de uso industrial (Sousa *et al.*, 2003).

A espécie é utilizada na medicina popular de países caribenhos; suas cascas têm sido utilizadas como adstringente, antisséptico, hemostático, além de apresentar propriedades antifúngica e antiulcerogênica (de-Faria *et al.*, 2012a). Alguns trabalhos, relatam propriedades medicinais de *R. mangle*, tais como antioxidante (Berenguer *et al.*, 2006), antibacteriana (Melchor *et al.*, 2001), antiulcerogênica (Perera *et al.*, 2001), cicatrizante (de Armas *et al.*, 2005), anti-inflamatória (Marrero *et al.*, 2006) e anti-diabética (Alarcon-Aguilara *et al.*, 1998). Recentemente nosso grupo de pesquisa determinou mecanismos de ação envolvidos nas atividades antioxidante (de-Faria *et al.*, 2012b) e antiulcerogênica (de-Faria *et al.*, 2012a) de *R. mangle*, além de ter verificado sua eficácia na colite experimental (de Faria *et al.*, 2012).

2 Objetivos

Foram objetivos desse trabalho:

- Identificar substâncias presentes nas cascas de *R. mangle*;
- Avaliar o efeito da administração oral das frações orgânicas (aquosa – Aq, butanólica – BuOH e acetato de etila – EtOAc) das cascas de *R. mangle* em ratos e camundongos submetidos a modelos experimentais de colite aguda e crônica;
- Verificar a influência das frações ativas sobre os mediadores envolvidos no sistema antioxidante e nas respostas inflamatória e imune.

3 Materiais e métodos

3.1 Obtenção e preparação do material vegetal

3.1.1 Coleta do material vegetal

A coleta do material biológico foi realizada na área continental do sistema estuarino de Santos/SP (coordenadas UTM 365.000 E, 367.000 E, 7.353.000 N, e 7.355.500 N), aproveitando-se de uma supressão de vegetação autorizada pelo IBAMA (autorização número: 116/2006) e realizada pela EMBRAPORT, sob os cuidados do taxonomista vegetal Msc. Paulo de Salles Penteado Sampaio, responsável também pela identificação da espécie.

3.1.2 Preparação dos extratos e frações vegetais

As cascas de *R. mangle* foram secas em estufa a 40°C durante sete dias e moídas em moinho de facas. A extração foi realizada utilizando acetona:água (7:3, v:v) pelo método de maceração por setes dias. O extrato acetona:água de *R. mangle* foi submetido à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, obtendo assim frações semi-purificadas. Aproximadamente 20 g do extrato foram dissolvidos em 150 mL de água em funil de separação; 50 mL de acetato de etila foram adicionados ao funil de separação e particionados por três vezes. Em seguida, a fase aquosa foi particionada também com 50 mL de *n*-butanol (por 3 vezes), conforme resumido na Figura 3.

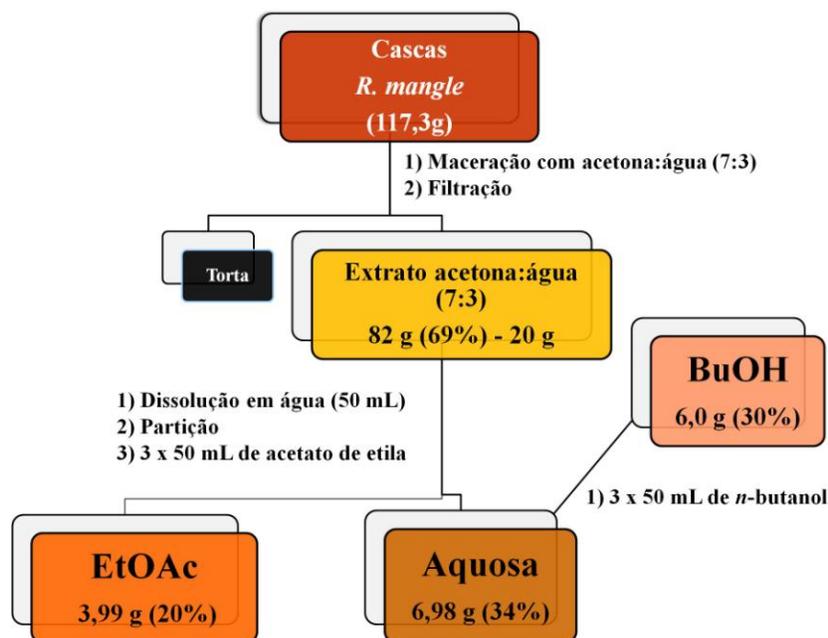


Figura 3 Diagrama da metodologia empregada para extração e fracionamento das cascas de *R. mangle*.

3.2 Análise fitoquímica

3.2.1 Preparo das amostras para ESIMS/MS

O extrato e as frações foram pesados em balança (Marte®, AL 200) com capacidade para 200g e precisão de 0,001 g, e produzidos na proporção de 10% (m/v). Para cada extrato filtrado, 500 µL foram diluídos com MeOH para volume final de 1 mL e a solução filtrada em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) com poro de 0,45 µm. A solução final foi introduzida diretamente na fonte de ESI usando seringa de vidro impulsionada por sistema de bombeamento em fluxo de 10 µL.min⁻¹.

3.2.2 FIA-ESI-IT-MS

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Analítica, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via

análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi analisada no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS², MS³) realizadas em uma interface do tipo ion-trap (IT). O modo negativo foi escolhido para geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MSⁿ), sob as seguintes condições: voltagem do capilar -4 V, voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 280 °C, gás de arraste (N₂) fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi *m/z* 50-1200, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa *m/z* estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MSⁿ realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados, com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento. O software Xcalibur versão 1.0 (Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

3.3 Drogas e reagentes

Todas as drogas e tratamentos foram preparadas imediatamente antes de serem administrados aos animais, sempre em dose-volume de 10 mL.Kg⁻¹. Para indução da inflamação intestinal em ratos foi utilizada uma solução a 30% de ácido 2,4,6-tri-nitro-benzeno sulfônico (TNBS) (Sigma-Aldrich) em etanol (Merck) a 50%. Na indução da inflamação intestinal em camundongos foi utilizada uma solução a 3% de dextrana sal sódico (DSS) (MP Biomedicals) em água potável e filtrada; também foi

utilizada solução a 0,9% de NaCl (Synth, Diadema) para diluição e tratamento dos grupos experimentais.

3.4 Animais de experimentação

Foram utilizados ratos machos HanUnib:WH (180 - 250 g) e camundongos machos Unib:SW (30 - 40 g), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB-UNICAMP), aclimatados às condições do biotério por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, com temperatura ($23 \pm 2^\circ$ C) e ciclos claro/ escuro (12 h/12h) controlados. Os animais foram alimentados com ração nuvital (Nuvilab) e água *ad libitum*. A manipulação dos animais ocorreu em conformidade com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e os procedimentos experimentais adotados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob o número de protocolo 1919-1.

3.5 Ensaios *in vivo*

3.5.1 Colite aguda induzida por DSS em camundongos

Os camundongos Unib-SW (30 - 40 g) foram distribuídos ao acaso nos grupos experimentais (n=8): normal (salina), colítico (DSS, controle), Aq (0,5, 1,5 e 3,0 mg), Et (0,5, 1,5 e 3,0 mg) e Bu (0,5, 1,5 e 3,0 mg). O modelo consiste na administração de DSS (dissolvido na água para beber) aos animais por 7 dias (Wirtz *et al.*, 2007) concomitante aos tratamentos experimentais; no 8º dia de experimento, os animais

são mortos e os colóns removidos para tomada de tamanho e peso, sendo em seguida armazenados para avaliações posteriores.

A avaliação dos danos no modelo experimental, bem como dos efeitos dos tratamentos nesse modelo se dá por meio de critérios estabelecidos em pontuação (Tabela 2), denominados índice de atividade da doença (DAI), pela relação peso/comprimento (mg/cm) do cólon dos animais e pela avaliação microscópica, que também obedece a critérios preconizados em Tabela de pontuação de danos teciduais (Tabela 3).

Tabela 2 DAI, critérios para pontuação de parâmetros de avaliação dos danos causados ao cólon pela administração de DSS.

Score	Perda de peso (%)	Consistência das fezes	Sangue nas fezes
0	0	Normal	Ausente
1	1 – 5		
2	5 – 10	Perda de consistência	Sangue oculto*
3	10 – 20		
4	>20	Diarréia	Sangramento

(Bailon *et al.*, 2008; Vicario *et al.*, 2005).

*O sangue oculto é verificado adicionando uma solução corante em papel reativo, onde a coloração azulada indica a presença de sangue.

Tabela 3 Critérios de pontuação para avaliação de cortes histológicos do cólon de animais submetidos à colite induzida por DSS.

<u>Epitélio da mucosa</u>
Ulceração: (0) ausente; (1) leve; (2) moderada; (3) extensa/profunda
<u>Criptas</u>
Atividade mitótica: (0) porção inferior; (1) porção média baixa; (2) porção média alta; (3) porção superior
<u>Lâmina própria</u>
Infiltrado mononuclear: (0) ausente; (1) leve; (2) moderado; (3) severo
Infiltrado granulócito: (0) ausente; (1) leve; (2) moderado; (3) severo
Vascularização: (0) ausente; (1) leve; (2) moderado; (3) severa
Deposição de fibrina: (0) ausente; (1) leve; (2) moderado; (3) severa
<u>Submucosa</u>
Infiltrado mononuclear: (0) ausente; (1) leve; (2) moderado; (3) severo
Infiltrado granulócito: (0) ausente; (1) leve; (2) moderado; (3) severo
Edema: (0) ausente; (1) leve; (2) moderado; (3) severo

Pontuação máxima – 27. (Bailon et al., 2008).

3.5.2 Colite aguda induzida por TNBS em ratos

Neste modelo foram avaliadas as frações que apresentaram resposta no modelo de colite aguda induzida por DSS, ou seja, as frações BuOH e EtOAc. Ratos permaneceram 24 horas de jejum e, sob anestesia com halotano, receberam 10 mg de TNBS dissolvidos em 0,25 mL de etanol 50% (v/v) por meio de uma cânula de teflon inserida 8 cm através do ânus (Morris *et al.*, 1989). Durante e após a administração do TNBS, os ratos permaneceram de cabeça para baixo até a recuperação da anestesia. Os ratos foram separados em oito grupos, sendo dois controles, não-colítico (n=8) e colítico (n=8) e os tratamentos (n=8) BuOH 0,5, 1,5 e 3,0 mg.Kg⁻¹ e EtOAc 0,5, 1,5 e 3,0 mg.Kg⁻¹. Ratos do grupo normal receberam intracolicamente 0,25 mL de solução salina. Os animais receberam seus respectivos tratamentos 24, 48 e 72h após a indução da inflamação intestinal. Todos os animais tiveram parâmetros

comportamentais, peso corpóreo e consistência das fezes verificados diariamente; sendo mortos 96h após a indução da colite.

3.5.3 Colite sub-crônica induzida por TNBS em ratos

No modelo sub-crônico foram avaliadas as doses efetivas no modelo agudo de colite induzida por TNBS. Ratos foram separados em quatro grupos, sendo dois controles, normal (n=6) e colítico (n=12) e os tratamentos (n=12) BuOH 0.5 mg.Kg⁻¹ e EtOAc 1.5 mg.Kg⁻¹ por 3 semanas. Duas semanas após iniciar os tratamentos, os ratos permaneceram 24 horas de jejum e sob anestesia com halotano, receberam 10 mg de TNBS dissolvidos em 0,25 mL de etanol 50% (v/v) por meio de uma cânula de teflon inserida 8 cm através do ânus (Morris *et al.*, 1989). Durante e após a administração do TNBS, os ratos permaneceram de cabeça para baixo até a recuperação da anestesia. Ratos do grupo normal receberam por via retal 0,25 mL de solução salina. Todos os animais tiveram parâmetros comportamentais, peso corpóreo e consistência das fezes verificados diariamente e foram sacrificados uma semana após indução da colite.

A avaliação dos danos causados pela administração de TNBS encontra-se resumida na Tabela 4, segundo critérios estabelecidos na literatura (Bobin-Dubigeon *et al.*, 2001).

Tabela 4 Critérios para avaliação das lesões do cólon de ratos submetidos ao modelo de inflamação intestinal induzido por TNBS.

Score	Critérios
Ulceração	
0	Cólon
1	Hiperemia localizada sem úlceras
2	Ulceração sem hiperemia nem espessamento da parede intestinal
3	Ulceração com ponto de inflamação
4	Dois ou mais locais com ulceração e inflamação
5	Zonas grandes de dano tecidual, inflamação e ulceração com extensão > 1 cm.
6-10	Zonas grandes de dano tecidual com extensão > 2 cm, somando um ponto (até 10) a cada cm adicional
Adesão*	
0	Sem adesão
1	Pouca adesão
2	Muita adesão
Diarreia	
0	Ausência
1	Presença

*Adesão indica perfuração do intestino.

3.6 Ensaios *ex vivo* para avaliação da atividade antioxidante

Para análise dos mecanismos antioxidantes, segmentos do intestino dos animais submetidos à colite foram homogeneizados em tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,4) adicionado de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich® P8340) a 10%, em seguida as amostras foram congeladas a -70°C até a realização dos ensaios bioquímicos. A atividade enzimática foi espectrofotometricamente determinada e os resultados expressos em nmol/min/mg de proteína ou U/mg de proteína. A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina bovina como padrão.

3.6.1 Níveis de glutathiona (GSH)

As amostras foram centrifugadas (12000 G, a 4°C, por 15 minutos) e o sobrenadante diluído (1:10) em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH=7,4). Em seguida, foi feita a leitura da absorbância de 100 µL da amostra, acrescidos de 100 µL de solução de Tris (1,0 mM) e EDTA (0,02 mM), a 412 nm (A1). Após esta leitura adicionou-se 20 µL de ácido 5,5 ditiobis (2-nitrobenzóico) diluído em metanol (DTNB – 0,01 mM) e então foi feita uma nova leitura (A2), a 412 nm, após 15 min de reação. A concentração de GSH foi calculada por interpolação na curva padrão obtida com GSH e os resultados foram expressos como µmol de GSH/mg de proteína (Anderson, 1985).

3.6.2 Atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px)

Às amostras intestinais foram adicionados 25 mM de H₂O₂, 10 mM de glutathiona reduzida, 0,8 mM de NADPH e 1 U de enzima glutathiona redutase em PBS (0,1 M), pH 7,4. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 365 nm, dentro de 0 a 10 minutos (Yoshikawa *et al.*, 1993). Os resultados foram expressos em nmol/min por mg de proteína.

3.6.3 Atividade da catalase (CAT)

As amostras foram diluídas na proporção de 1:200 em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) e Triton X-100 (9:1), em seguida centrifugadas (7000 G, a 4°C, por 25 minutos); e à 200 µL do homogenato foram adicionados 100 µL de H₂O₂ 30 mM (30%). A absorbância foi medida em leitor de ELISA, microplaca de 96 poços, com

comprimento de onda de 240 nm em intervalos de 30 segundos por 2 minutos (Aebi, 1984).

3.6.4 Peroxidação lipídica (TBARS)

O homogenato do intestino foi diluído em KCl 0,15 M (relação 1:10). Em seguida, a 0,5 mL deste homogenato foram adicionados 0,2 mL de dodecil sulfato de sódio (8.1%), 1,5 mL de ácido acético (20%, solução ajustada com NaOH a pH 3,5), 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,8% p/v) e 0,3 mL de água destilada. Todas as amostras foram deixadas em banho-maria, com termostato ajustado para 95°C, por 1 hora. Após este período, as amostras foram resfriadas e acrescidas de 1 mL de água destilada e 5 mL da mistura *n*-butanol + piridina (15:1, v/v), agitadas por 1 min em vórtex e centrifugadas a 1400 G, por 10 minutos. A absorbância da capa orgânica foi determinada a 532 nm. Como padrão foi utilizado tetraetoxipropano (TEPP), diluído em etanol. Os resultados foram expressos como μmol de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) por mg de proteínas (μmol TBARS/mg de proteínas) (Ohkawa *et al.*, 1979).

3.7 Ensaios *ex vivo* para avaliação da atividade anti-inflamatória

Para avaliação dos mediadores anti-inflamatórios, pedaços de intestino dos animais submetidos à colite foram homogeneizados em 2 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) e as amostras congeladas a -70°C até a realização dos ensaios bioquímicos e moleculares. A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina bovina como curva padrão. Para os

ensaios em ELISA, seguiu-se o protocolo preconizado nos kits de imuno-ensaio para citocinas R&D Systems® e Bioeleven®. Nos ensaios de *western blotting* utilizou-se a concentração proteica, determinada com o método de Bradford para normalizar a quantidade de proteína (70 µg) aplicada nos pocinhos do gel.

3.7.1 Atividade da mieloperoxidase (MPO)

As amostras foram homogeneizadas em brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) a 0,5% (p/v) em tampão fosfato salina (50 mM, pH 6,0) com diluição final de 1:20 (p/v), até que obtivessem aspecto uniforme. O HTAB atua como detergente facilitando a liberação da enzima MPO dos grânulos de azurófilos dos neutrófilos, onde se encontra armazenada. O homogenato foi submetido a banho ultrassônico por 10 segundos, seguido de triplo processo de congelamento e descongelamento, que facilita a ruptura das estruturas celulares e, em consequência, a liberação da enzima. A amostra foi centrifugada a 7000 G, durante 10 minutos a 4°C. O próximo passo foi a determinação da atividade da MPO seguindo a cinética da reação na presença de H₂O₂. Numa placa de ELISA, foram colocados 50 µL do sobrenadante e 150 µL de reativo de coloração composto por cloridrato de o-dianisidina (0,167 mg/mL) e peróxido de hidrogênio (0,066%), em tampão fosfato (50mM, pH 6,0); a absorbância foi determinada a 450 nm. A atividade da enzima foi calculada por interpolação em curva padrão, realizada com MPO procedente de neutrófilos humanos. Uma unidade de MPO é definida como a quantidade necessária para degradar 1 mmol/minuto de peróxido de hidrogênio 25°C. Os resultados foram expressos como U/g de proteína (Krawisz *et al.*, 1984).

3.7.2 Expressão de COX-1 e COX-2

Alíquotas (70 µg) de proteínas coradas em tampão de Laemmli (tampão fosfato 0,5 M, pH 6,8; Glicerol 25%; SDS 0,5%; azul de bromofenol 0,01% e β-mercapoetanol 5%) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 8% (SDS-PAGE) e submetidos à eletroforese, com solução tampão adequado (Trisma base 25 mM, glicina 1,92 mM, SDS 1%). O SDS-PAGE foi submetido a uma corrente de 80 V até que as amostras tivessem percorrido todo gel. A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em equipamento de eletrotransferência, com as membranas embebidas em solução tampão de transferência (Trizma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%), mantidas em voltagem constante de 350 mV, por 2 horas, em geladeira. Após a transferência das proteínas, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau a 3% para verificar a eficiência da transferência e documentar (fotodocumentador Syngen®) as bandas de proteínas a serem utilizadas como controle interno (amostras de colite induzida por TNBS com tratamento sub-crônico) da expressão de cada proteína alvo (Romero-Calvo *et al.*, 2010).

As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora (tampão PBS 0,05 M, pH 7,7, Tween 20 a 0,05%, leite em pó desnatado a 5%) por uma hora, a fim de diminuir a ligação inespecífica de proteínas. Em seguida, as membranas foram submetidas a lavagens (tampão PBS 0,05 M, pH 7,4 Tween 20 a 0,05%), em intervalos de 10 minutos. A membrana foi incubada a 4°C, durante uma noite, usando anticorpos específicos contra β-actina (Sigma-Aldrich®, A1978), usada como controle interno das amostras do modelo de colite

aguda induzida por DSS, COX-1 (1:1000, código 160109) e COX-2 (1:500, código M160160) (Cayman Chemical®, USA). Na manhã seguinte, a membrana de nitrocelulose foi lavada em tampão básico por 40 minutos e, em seguida, incubada à temperatura ambiente, por 2h, com anticorpo secundário anti-mouse (código 62-6520, Zymed®, Carlsbad, CA, USA) e anti-rabbit (código 61950, Invitrogen® Corporation, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, as membranas foram novamente submetidas a lavagens com PBS para então serem incubadas durante 5 minutos com Super Signal Blot, após esse período, as membranas foram colocadas em fotodocumentador G-BOX, Syngene® para detecção das bandas fluorescentes e posterior análise densiométrica com auxílio do software GeneSys®.

3.7.3 Níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-10

Os níveis cólicos de IL-1 β (rat - DY501 R&D®, mouse - 432606 BioLegend®), IL-6 (rat - DY506 R&D®, mouse - 431306 BioLegend®), IL-12 p70 (mouse - DY419 R&D®, mouse - 433606 BioLegend®), IFN- γ (mouse - 430806, BioLegend®), TNF- α (rat - DY510 R&D®, mouse - 430906 BioLegend®) e IL-10 (rat - DY522 R&D®) foram determinadas através de kits de enzimo-imunoensaio. O princípio do desenvolvimento da técnica é baseado na reação do tipo antígeno-anticorpo. Inicialmente foram preparados todos os reagentes e cada poço foi incubado com 100 μ L de anticorpo de captura, em temperatura ambiente, overnight. Após esse período, foram pipetados 300 μ L do diluente, um reagente composto de uma proteína básica com função preservativa da reação, por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 100 μ L das amostras e da curva-padrão, ficando as mesmas incubadas por 2 horas. Em

seguida, todos os poços foram incubados por 2 horas com o anticorpo de detecção para que a interleucina presente nas amostras pudesse se ligar ao anticorpo durante esse período. Após incubação de 2 horas, todos os poços foram lavados e aspirados 4 vezes, a fim de remover qualquer substância não ligada que pudesse interferir na reação, pipetando-se em cada um deles 100 µL de estreptavidina-HRP e deixando incubado por 20 minutos. O próximo passo consistiu na adição de 200 µL de uma solução substrato, previamente com mistura de dois reagentes, responsável pelo desenvolvimento da coloração da reação. Após período de incubação de 20 minutos, protegido da luz, cada um dos poços recebeu 50 µL da solução *stop* (ácido sulfúrico 2 N). Durante esse período ocorre desenvolvimento de uma coloração na mesma proporção e intensidade das concentrações de interleucinas que reagem na fase inicial do processo bioquímico. O desenvolvimento da cor é uniformemente interrompido pela solução *stop*. A leitura da absorbância foi realizada em ELISA Apollo LB 912 (Berthold Technologies GmbH & Co, Bad Wildbad, Germany), a 450 nm com correção para 540 nm.

3.8 Preparo do material histológico

O cólon dos animais foi removido, lavado e embebido em formol 4%; 24 horas depois o material foi embebido em álcool 70% para armazenagem. A preparação do material para histologia procedeu às sucessivas lavagens de 30 minutos em etanol em concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 100% I, 100% II e 100% III). Foram preparados materiais histológicos em histo-resina e paraplast. Para histo-resina: o material foi colocado em solução etanol 100% : historresina pura (1:1) por uma noite

em agitação constante, após esse processo o material ficou novamente em solução por um noite, porém em histo-resina pura. No dia seguinte o material foi incluído em histo-resina com agente endurecedor em formas de silicone que foram acomodadas em estufa a 60°C durante 24 horas. O material foi cortado (3µm) utilizando-se um micrótomo (Leica Microsystems Heidelberg Germany); foram obtidos cortes transversais e longitudinais dos grupos experimentais e as lâminas foram coradas com hematoxilina e floxina (HF) seguindo a metodologia empregada (Consonni *et al.*, 2012) no Laboratório de Citologia do Depto de Embriologia e Histologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob supervisão do Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro. A análise histopatológica realizada nas lâminas obtidas neste processo foram realizadas em duplo cego pelos Mestres Ricardo José Dunder e Silvio Roberto Consonni. Lâminas histológicas em paraplast foram preparadas nos Laboratórios de Histologia do Depto de Morfologia, IBB UNESP/Botucatu sob orientação da Prof^a Dr^a Claudia Helena Pellizzon. Os blocos de paraplast foram cortados (7µm) em micrótomo, de maneira seriada. As amostras foram submetidas à coloração por hematoxilina-eosina (HE) para observação geral da estrutura e celularidade em microscopia de luz.

3.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (d.p.), submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) seguidos de teste *a posteriori* de Dunnett, com *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001.

4 Resultados

4.1 Análise fitoquímica

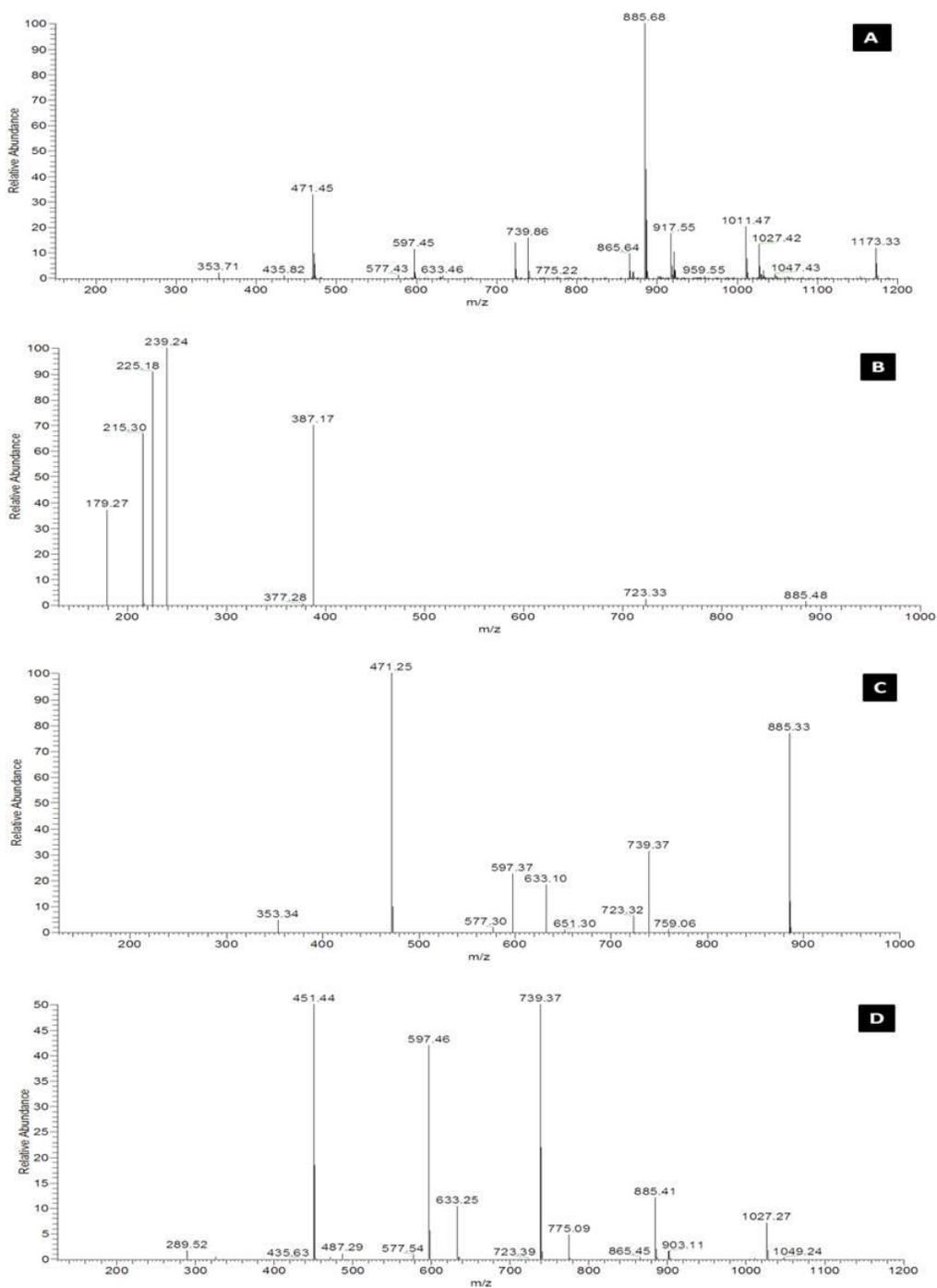


Figura 4 Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan* de: A) extrato acetona:água (7:3,v/v) ; B) fração aquosa; C) fração butanólica; D) fração acetato de etila de das cascas de *R. mangle*. Para condições espectrométricas, ver: 3.2 Análise fitoquímica.

Averiguação dos espectros de massas em *full-scan* (Figura 4) revelou a presença de várias substâncias, as quais são representadas pelos íons precursores das moléculas desprotonadas $[M-H]^-$ para o extrato e as frações de *R. mangle*. Todos os *fingerprints* da Figura 4(A-D) apresentaram íons menos intensos de m/z 885, 723. Com exceção da fração aquosa (Figura 4B), os demais *fingerprints* ESI-MS apresentaram íons característicos em m/z 597, 471 (maior intensidade). Numa primeira classe de metabólitos secundários, o íon precursor de catequina ou [epi]catequina formada pela ligação interflavonoídica entre unidades da catequina de m/z 577 (dímero), $[M-H]^-$ (Figura 5), foi encontrado no espectro de massas em *full-scan* da Figura 4A.

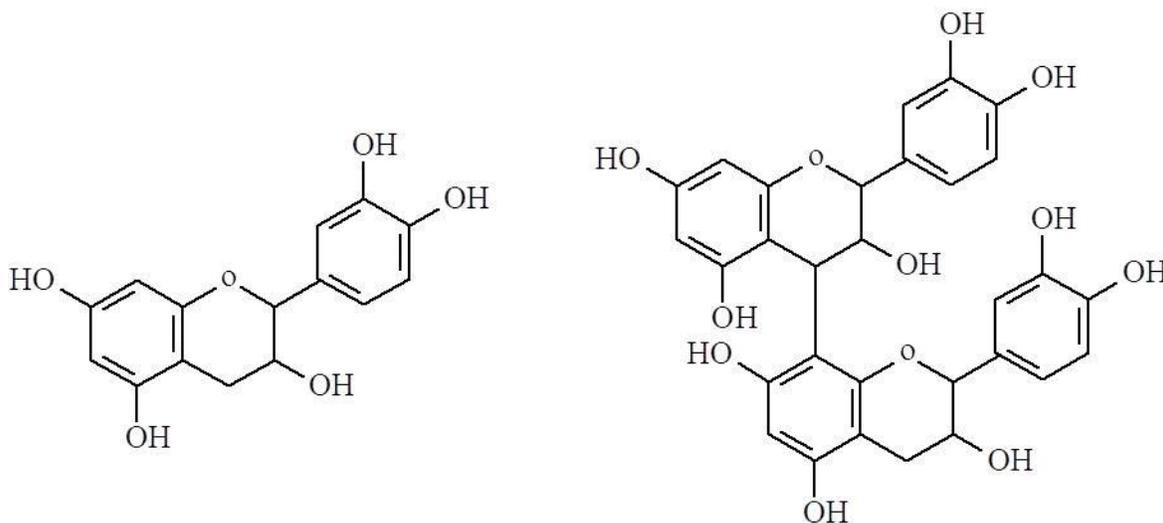


Figura 5 Estruturas do monômero (m/z 289) e do dímero da catequina ou [epi]catequina (m/z 577).

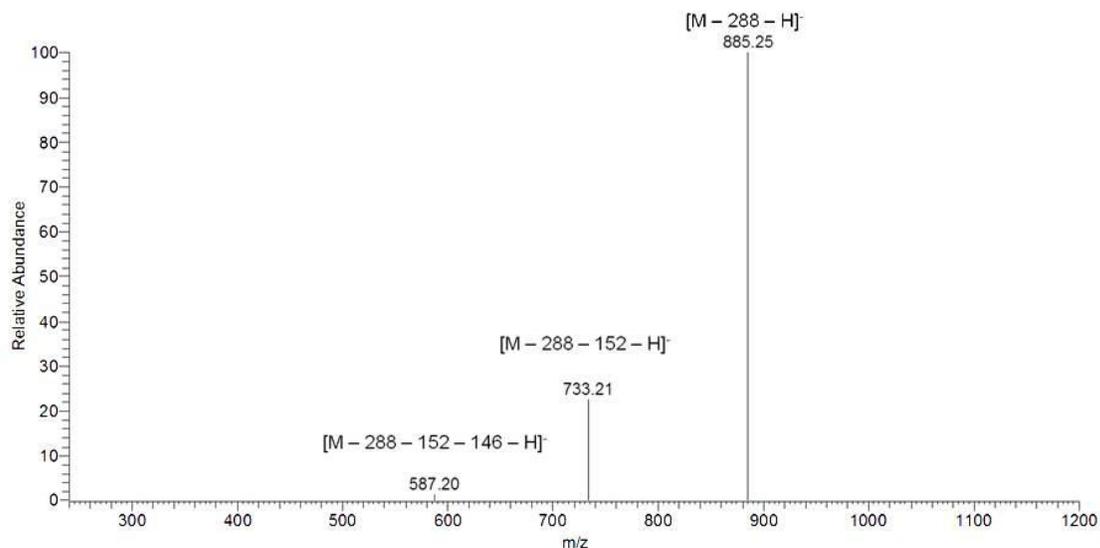


Figura 6 Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 885, obtido em modo negativo com energia de colisão de 20%. Para condições espectrométricas ver item 3.2 Análise fitoquímica.

Fragmentação MS/MS do íon precursor de m/z 1173 (Figura 4A) produziu o pico base de m/z 885; esse íon foi gerado pela eliminação de uma unidade da [epi] catequina [M-288-H]⁻ (Figura 6) da unidade da [epi] catequina deste trímero (Figura 7). A fragmentação de terceira-ordem (MS³) do íon produto em m/z 733 refere-se à perda de uma unidade galoil (Figura 6) [M-288-152-H]⁻. Outra proposta consistente foi usada para explicar a presença do íon produto de m/z 587, gerado pelo mecanismo de fragmentação, quinona metídeo (QM), ocorrida no anel D da unidade superior com perda do resíduo 1,3,5-triidroxibenzeno glucosilado e na seqüência, eliminação do fragmento resultante da RDA (Retro-Diels-Alder) no anel C da unidade central [M-288-152-H]⁻. No mecanismo de fragmentação envolvendo a clivagem QM, a localização do açúcar na unidade superior da molécula desprotonada foi postulada com base na clivagem da ligação interflavonoídica entre o anel C da unidade superior e o anel D da unidade central (Figura 8). A evidência de que o açúcar se encontra na unidade

superior do trímero é fornecida pelo íon de m/z 885. Esse íon é o resultado da eliminação da unidade inferior de catequina (anéis G-I), com conseqüente formação de um fragmento cuja unidade superior é uma catequina diglucosilada (anéis A,B,C) e a unidade inferior contém um sistema QM (anéis D,E,F). Tal fragmento não é possível de ser formado se o açúcar estiver na unidade inferior do trímero.

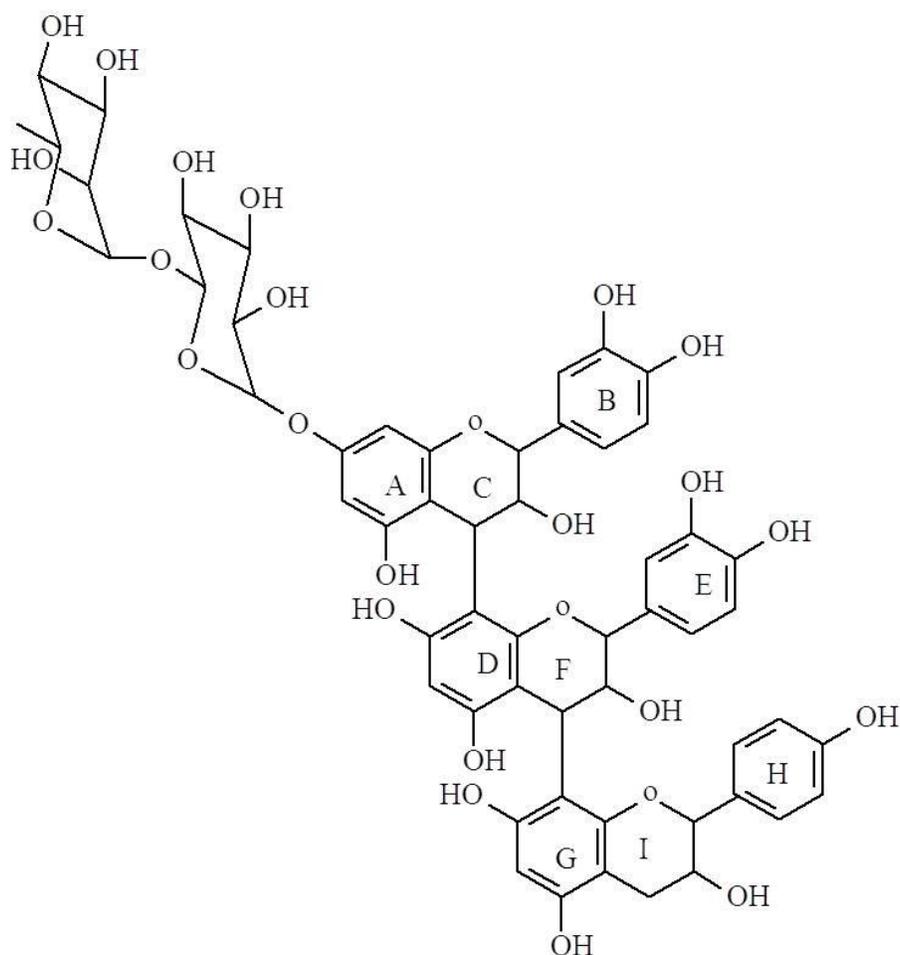


Figura 7 Estrutura proposta para o íon precursor de m/z 1173.

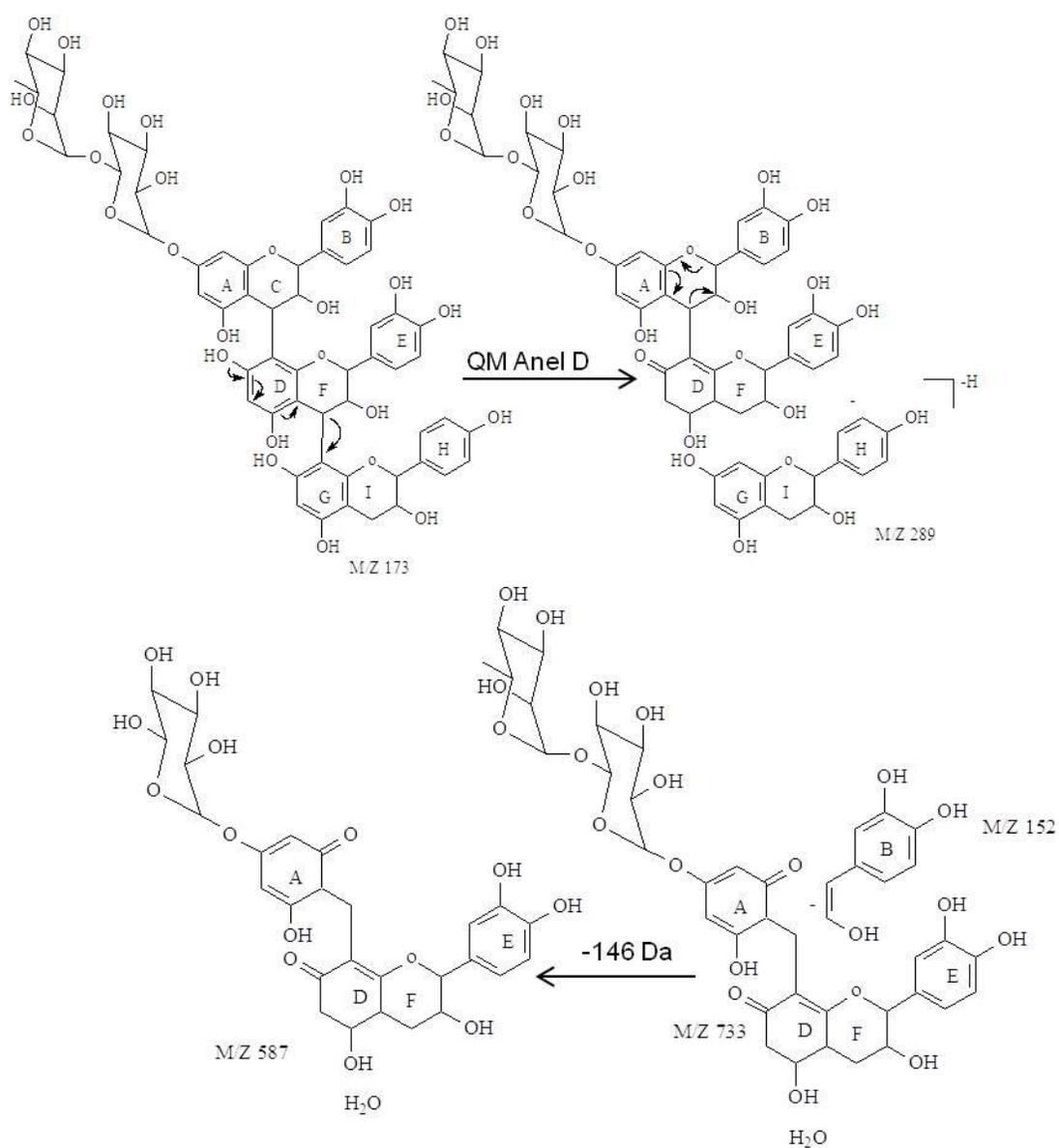


Figura 8 Proposta de fragmentação de uma possível proantocianidina trimérica identificada no extrato das cascas de *R. mangle*. Os principais mecanismos de fragmentação envolvidos são: RDA (Retro-Diels-Alder), e QM (Quinona Metéido).

As proantocianidinas constituídas exclusivamente de unidades equivalentes de [epi]catequinas e que apresentam uma ligação interflavonoídica são denominadas de

procianidinas do tipo-B. Assim, os íons precursores de m/z 577, m/z 885, m/z 1173, são indicativos de procianidinas do tipo-B (Rodrigues *et al.*, 2007). Porém, como ocorre em todas as técnicas de MS, nenhuma diferenciação entre estereoisômeros foi realizada, bem como nenhuma informação sobre a posição e estereoquímica da ligação interflavonoídica.

Outro derivado da catequina contendo duas hexoses foi identificado em m/z 597. O espectro MS² evidenciou a perda de 146 u.m.a. (unidade de massa arbitrária) provavelmente devido a perda de uma raminose terminal, fornecendo o íon produto em m/z 451 (Figura 9), estrutura proposta na Figura 10.

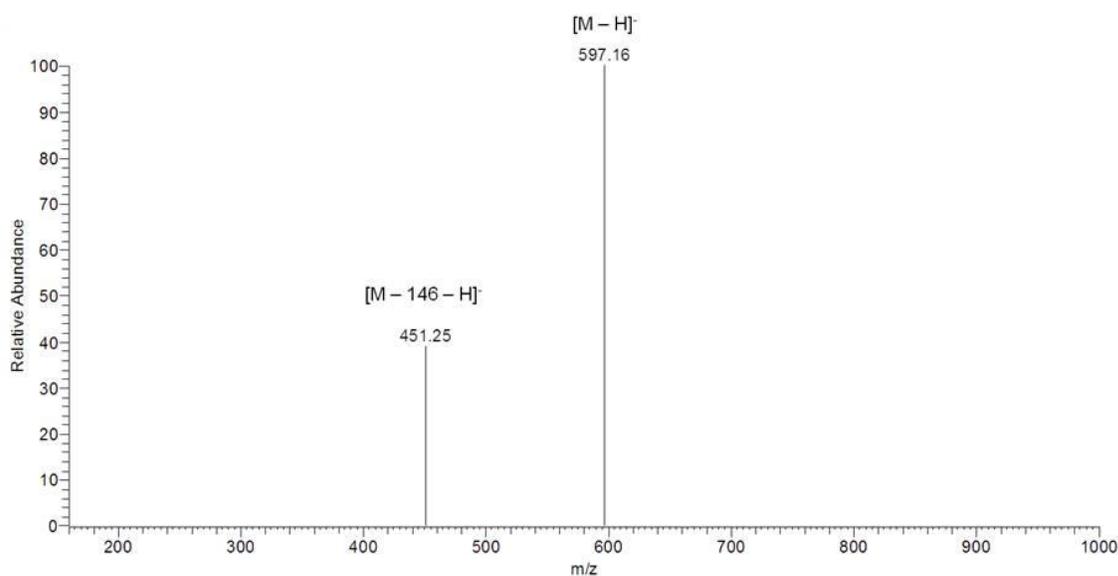


Figura 9 Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 597, obtido em modo negativo com energia de colisão de 20%. Para condições espectrométricas ver item 3.2 Análise fitoquímica.

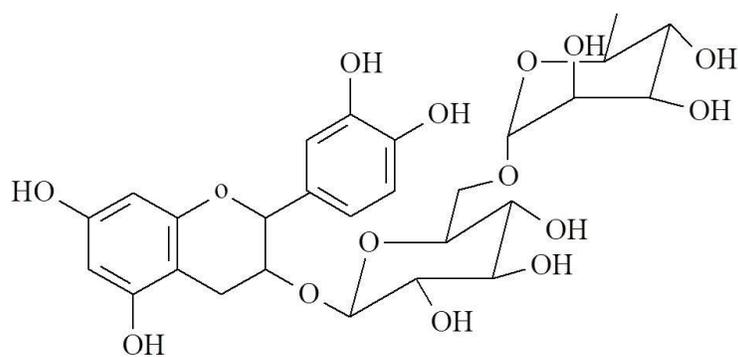


Figura 10 Estrutura proposta para o íon precursor de m/z 597.

4.2 Colite aguda induzida por DSS em camundongos

As Figuras de 11 a 17 e Tabelas de 5 a 7 reúnem os resultados obtidos no modelo experimental de colite aguda induzida por DSS em camundongos. Este modelo serviu à avaliação de um processo inflamatório intestinal limitado à mucosa cólica, o qual está bastante relacionado à colite ulcerativa humana (a RCUI). Um dos parâmetros na avaliação da colite induzida por DSS é o comprimento dos intestinos (ceco e cólon); este é o indicativo primário da atividade da doença e cada imagem é representativa dos valores médios obtidos para aquele grupo experimental (Figura 11). Nota-se que os intestinos dos tratamentos com BuOH e EtOAc apresentam tamanho médio acima de 10 cm, enquanto aqueles animais colícticos mostram redução no comprimento intestinal (aproximadamente 7 cm) quando comparados ao intestino de animais não-colícticos – grupo normal (12 cm em média).



Figura 11 Intestino de cada grupo experimental do modelo de colite induzida por DSS.

Na Figura 12 observa-se que a integridade da organização da mucosa intestinal (A e B) é claramente perdida após os danos causados pelo DSS à mucosa intestinal (C e D), destacando-se perda das células caliciformes, criptas e epitélio de revestimento, além de presença de ulcerações e grande infiltrado inflamatório.

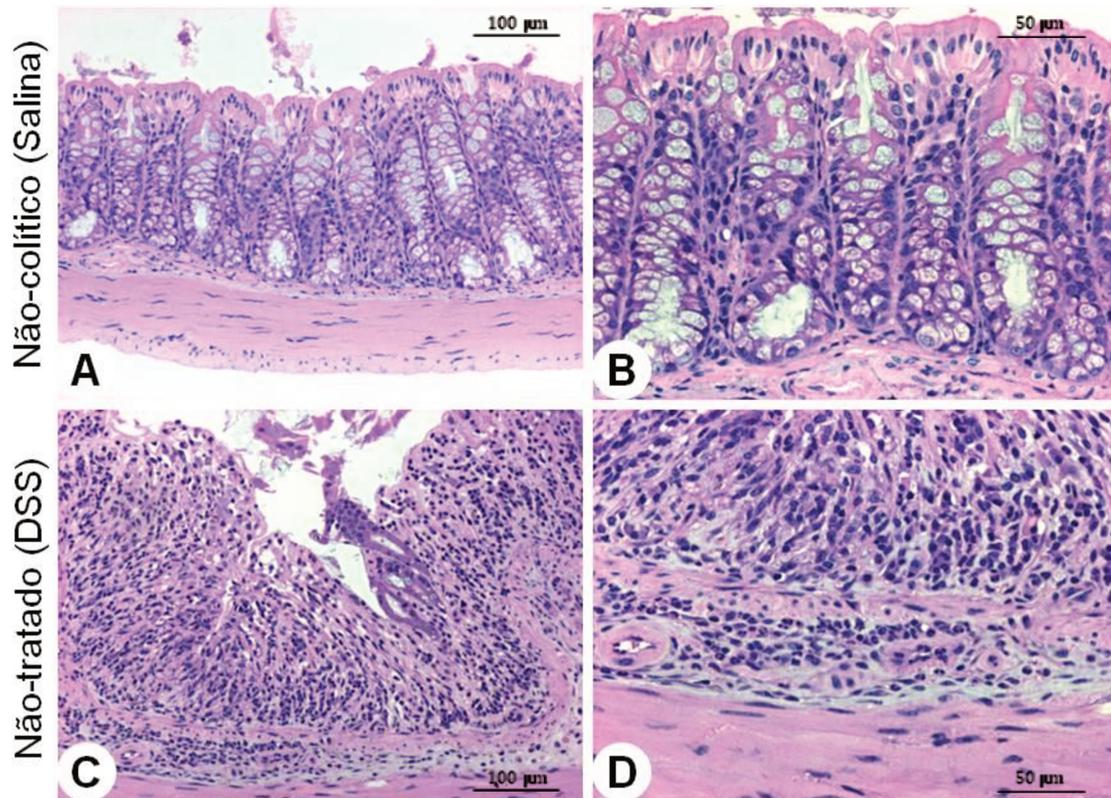


Figura 12 Fotomicrografias em, corte transversal, de intestinos de camundongos submetidos ao modelo agudo de colite induzida por DSS, mostrando grupo normal (não-colítico ou salina – A e B) e grupo colítico (não-tratado ou DSS controle – C e D). Imagens A, C e E mostram as túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa em aumento de 100x; Figuras B, D e F mostram detalhes da túnica mucosa no em aumento de 200x.

Dentre as doses testadas da Aq, a de 0.5 mg (Figura 13) destacou-se na análise morfológica, mostrando-se capaz de manter a mucosa saudável em sua estrutura característica; nota-se que apenas o epitélio de revestimento foi perdido (A e B); no entanto, com as demais doses (C e E) observam-se ulcerações e perda das células caliciformes, criptas e epitélio de revestimento e significativo infiltrado inflamatório (D e F).

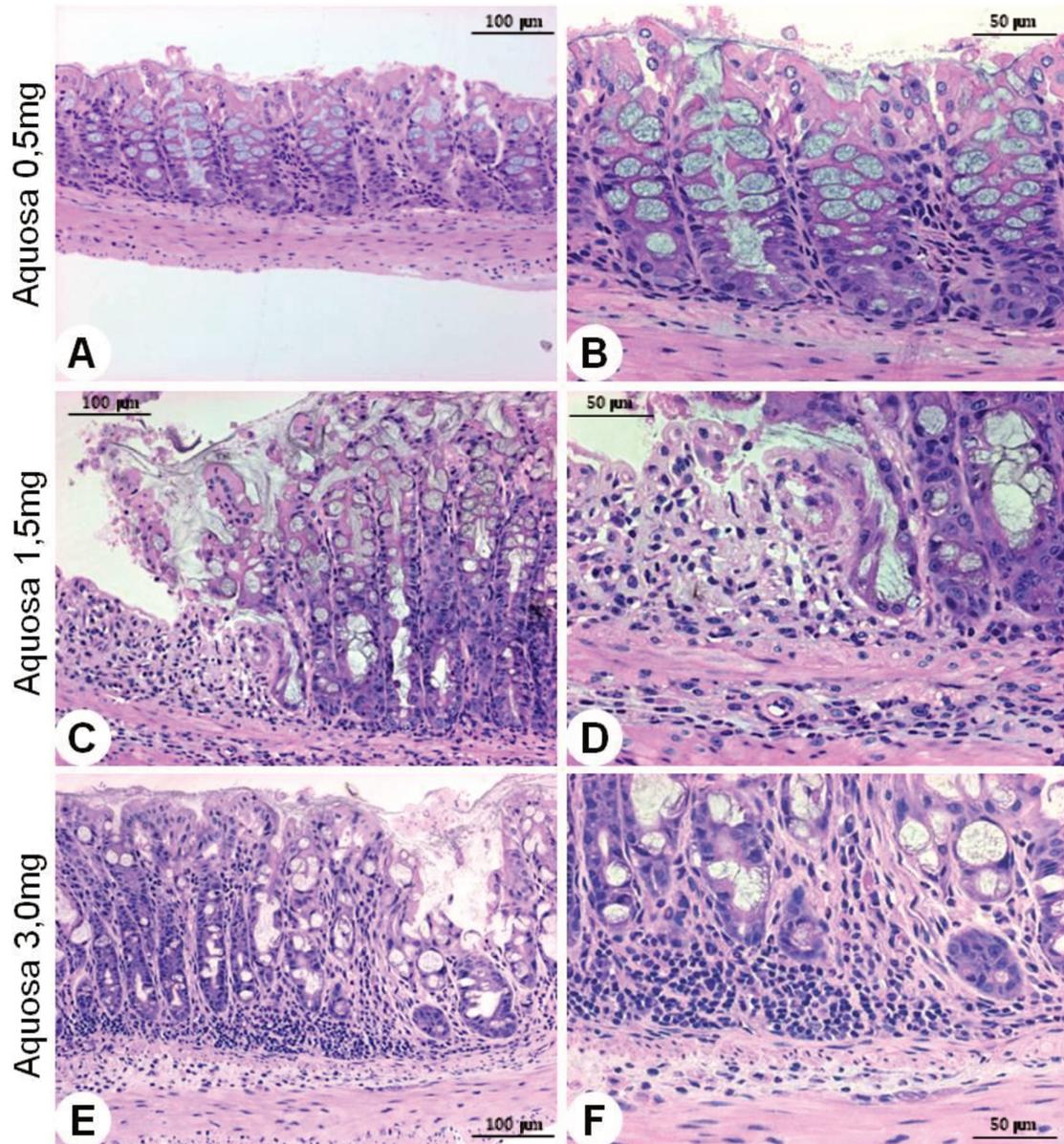


Figura 13 Fotomicrografias, em corte transversal, de intestinos de camundongos submetidos ao modelo agudo de colite induzida por DSS: grupos tratados com Aq 0.5 mg (A e B), Aq 1.5 mg (C e D) e Aq 3.0 mg (E e F). Imagens A, C e E mostram as túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa em aumento de 100x; Figuras B, D e F mostram detalhes da túnica mucosa no em aumento de 200x.

Quando os animais com colite induzida por DSS foram tratados com BuOH, nota-se preservação das criptas intestinais, células caliciformes e epitélio de revestimento nas doses de 0.5 e 1.5 mg (A a D); já a dose de 3.0 mg (E e F) mostrou-se

eficaz na pontuação total, porém a mucosa mostrou a descaracterização parcial de sua organização, com perda de epitélio de revestimento, formação de úlceras e grande infiltrado inflamatório.

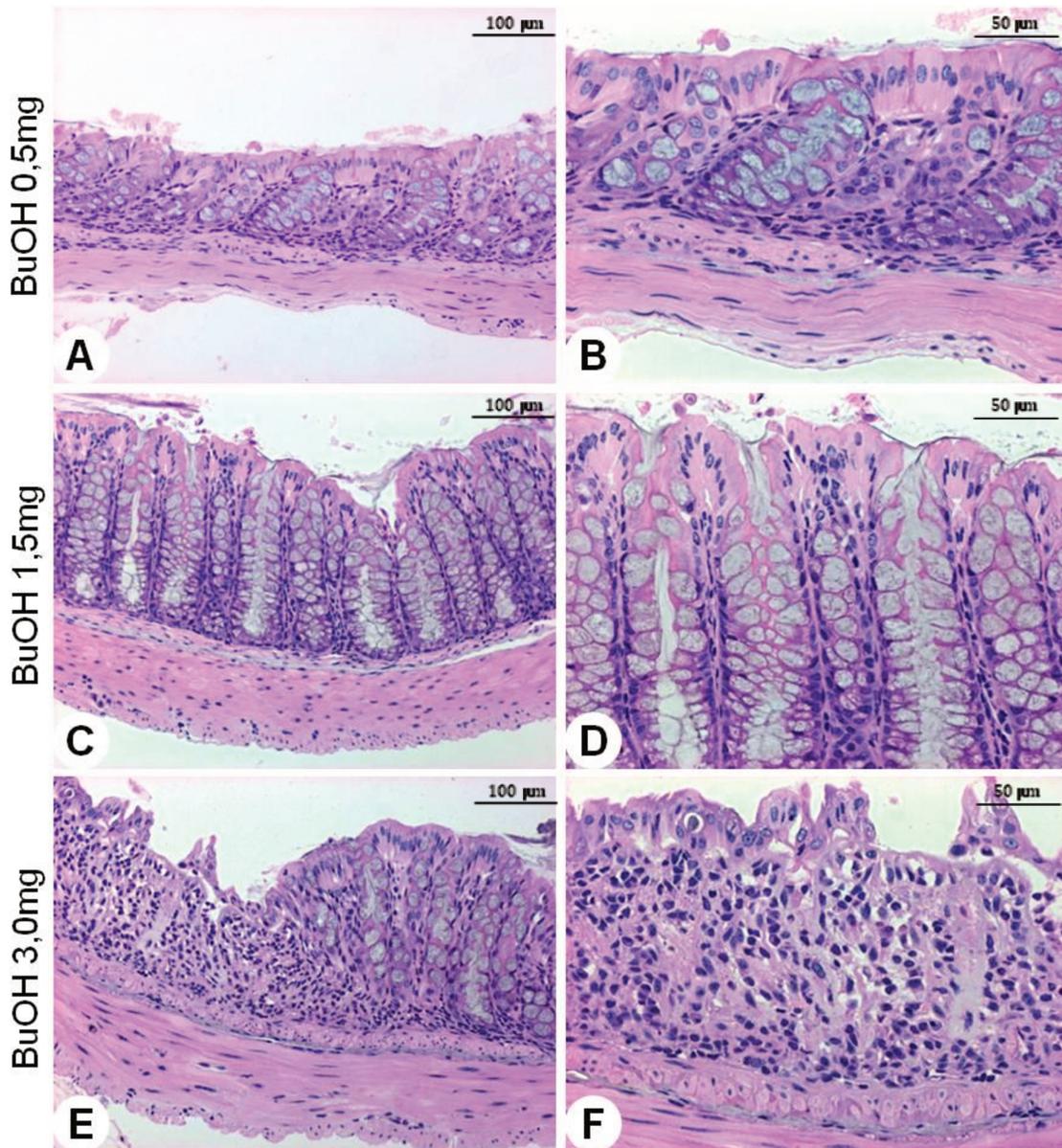


Figura 14 Fotomicrografias em corte transversal de intestinos de camundongos submetidos ao modelo agudo de colite induzida por DSS: grupos tratados com BuOH 0.5 mg (A e B), BuOH 1.5 mg (C e D) e BuOH 3.0 mg (E e F). Imagens A, C e E mostram as túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa em aumento de 100x; Figuras B, D e F mostram detalhes da túnica mucosa no em aumento de 200x.

Na Figura 15 nota-se que as doses de 0.5 e 1.5 mg foram capazes de manter a estrutura da mucosa parcialmente íntegra em camundongos com colite induzida por DSS; verifica-se manutenção das criptas e de parte do epitélio de revestimento, mas ficou evidente também a presença de pequenas ulcerações e determinadas porções da mucosa. A dose de 3.0 mg de EtOAc (E e F) não reverteu ou não protegeu a dano à mucosa causado por DSS.

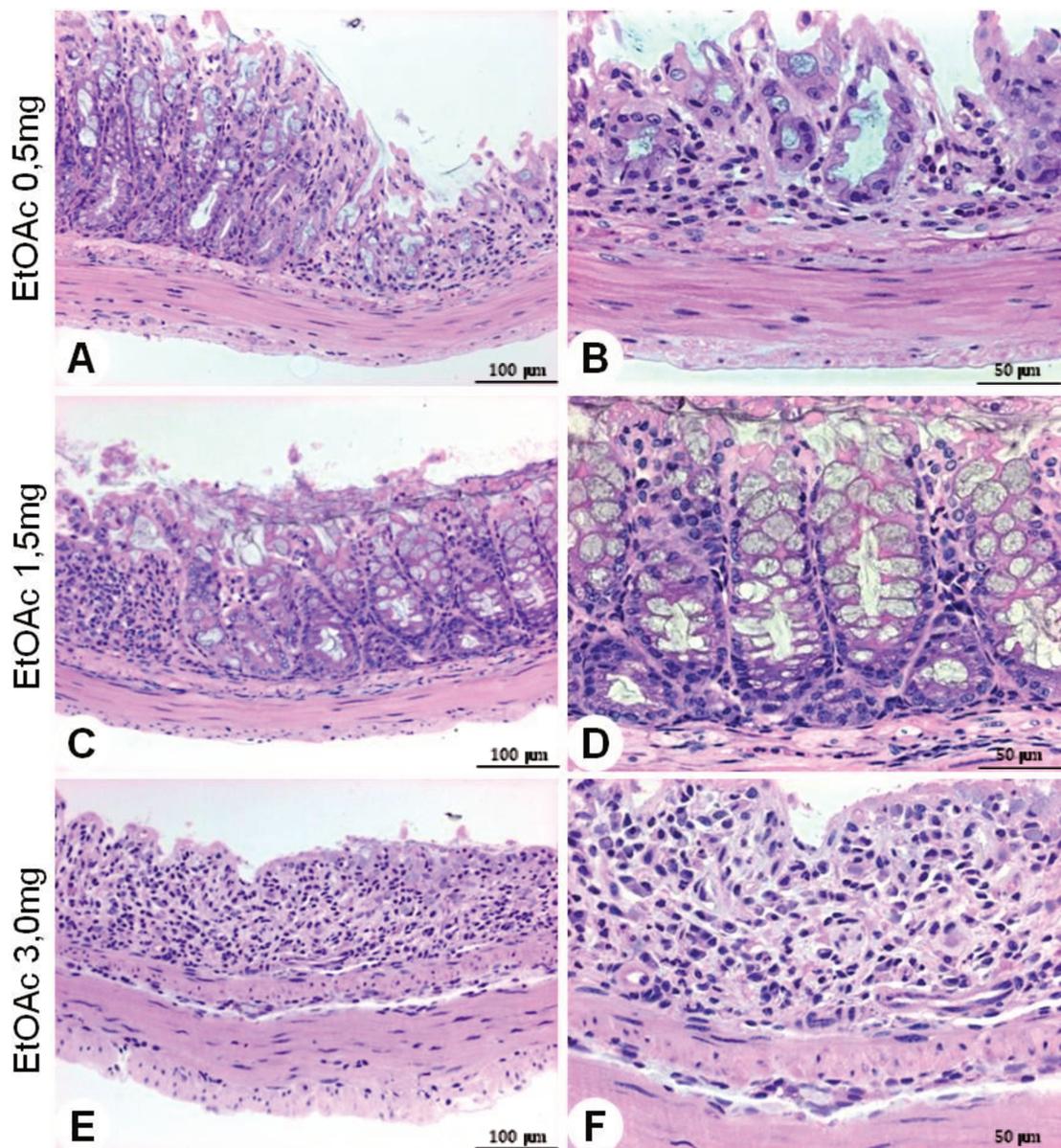


Figura 15 Fotomicrografias, em corte transversal, de intestinos de camundongos submetidos ao modelo agudo de colite induzida por DSS, mostrando grupos tratados com EtOAc 0,5 mg (A e B), EtOAc 1,5 mg (C e D) e EtOAc 3,0 mg (E e F). Imagens A, C

e E mostram as tûnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa em aumento de 100x; Figuras B, D e F mostram detalhes da tûnica mucosa no em aumento de 200x.

A eficácia dos tratamentos experimentais no modelo de DSS pode ser mensurada através de índices de pontuação de danos teciduais macroscópicos e microscópicos, além da relação peso/comprimento do intestino; o que está expresso na Tabela 5.

Tabela 5 Efeito dos tratamentos Aq, BuOH e EtOAc nas doses de 0.5, 1.5 e 3.0 mg.Kg⁻¹ em camundongos submetidos ao modelo de colite aguda induzida pela administração de DSS.

Grupos	Peso/comprimento (mg/cm)	Score dos danos teciduais	Índice de atividade da doença (DAI)
Normal	32.96 ± 1.75*	3.25 ± 0.25***	0.00 ± 0.00**
Colítico	43.33 ± 2.60	25,50 ± 0.86	2.83 ± 0.84
Aq 0.5 mg	39.50 ± 7.50	9.00 ± 0.70***	2.62 ± 1.11
Aq 1.5 mg	37.14 ± 4.34	19.75 ± 2.25	3.22 ± 0.50
Aq 3.0 mg	39.25 ± 5.72	13.00 ± 1.47***	3.17 ± 1.17
BuOH 0.5 mg	33.10 ± 6.30*	8.75 ± 0.94***	0.85 ± 1.35*
BuOH 1.5 mg	34.25 ± 7.04*	3.50 ± 0.64***	0.67 ± 1.12**
BuOH 3.0 mg	35.99 ± 4.41	11.00 ± 0.12***	1.87 ± 1.70
EtOAc 0.5 mg	39.69 ± 7.68	19.25 ± 2.01	1.04 ± 1.38*
EtOAc 1.5 mg	33.39 ± 2.48*	14.50 ± 1.84**	0.75 ± 1.36**
EtOAc 3.0 mg	35.81 ± 6.48	23.25 ± 1.88	2.58 ± 1.29

Dados expressos como média ± d.p. (n = 8), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de t de Dunnett, **p*<0.05, ***p*<0.01 e ****p*<0.001 quando comparados com o grupo colítico (DSS).

Os parâmetros acima descritos foram considerados para validar a eficácia ou não de cada um dos tratamentos. Neste modelo, a BuOH nas doses de 0.5 e 1.5 mg e a EtOAc 1.5 mg demonstraram redução significativa nos três parâmetros verificados. Estes dados foram os que determinaram que só os tratamentos significativos seriam utilizados nos ensaios *ex vivo* de determinação de atividades antioxidante e anti-

inflamatória. A Figura 16, a seguir, mostra a evolução ponderal dos animais ao longo do protocolo experimental.

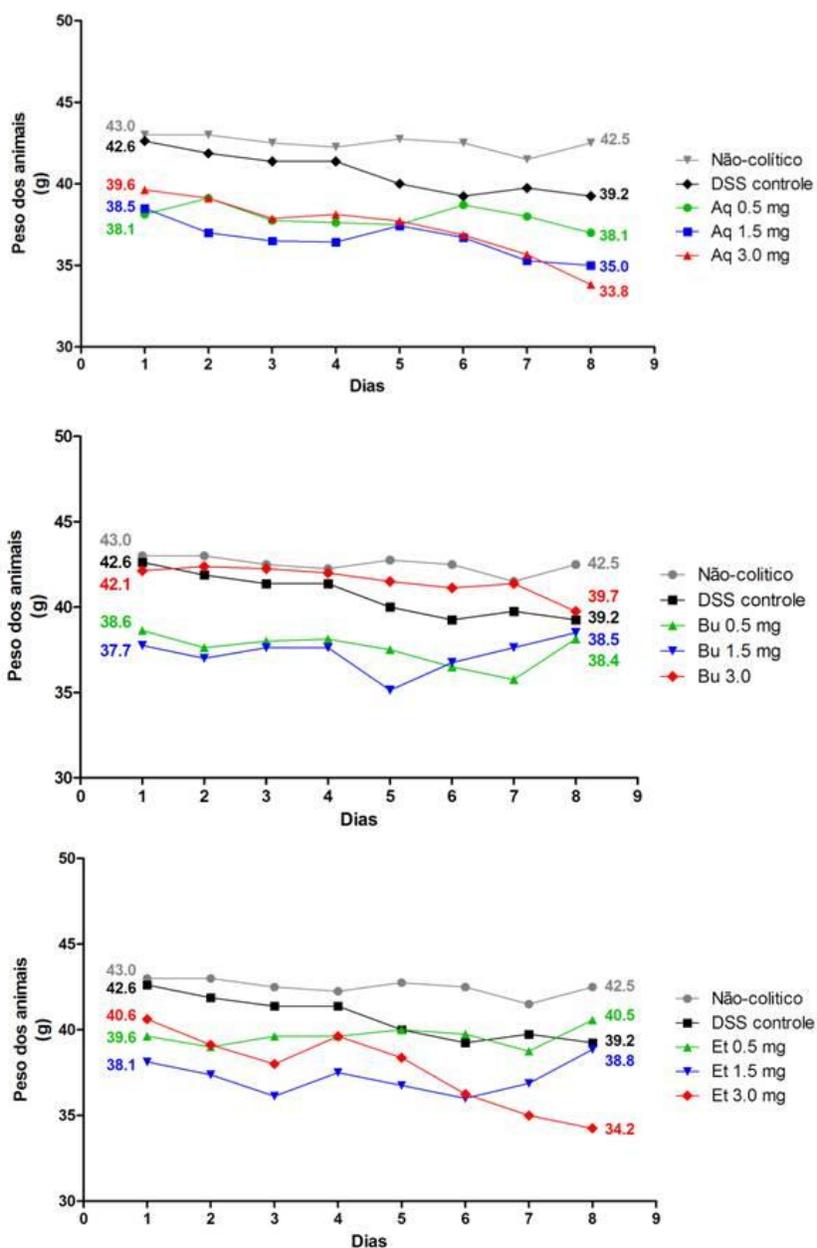


Figura 16 Evolução ponderal dos camundongos submetidos ao modelo de colite aguda induzida pela administração de DSS e tratados com Aq, BuOH e EtOAc (0.5, 1.5, 3.0 mg.Kg⁻¹).

Foi possível verificar que os grupos tratados com BuOH e EtOAc nas doses consideradas efetivas, apresentaram aumento ou manutenção do peso corporal ao

final do experimento. É característica da colite induzida por DSS a perda de peso dos animais devido à diarreia.

A avaliação dos tratamentos no modelo de DSS encontram-se na Tabela 6, onde estão expressos os níveis de GSH, além da atividade das enzimas GSH-Px e MPO.

Tabela 6 Efeito dos tratamentos BuOH e EtOAc sobre os níveis cólicos de GSH e atividade das enzimas GSH-Px e MPO na mucosa cólica de camundongos submetidos ao modelo agudo de colite induzida pela administração de DSS.

Grupos	GSH ($\mu\text{mol/mg}$ de proteína)	GSH-Px (nmol/min/mg de proteína)	MPO (U/mg de proteína)
Normal	5.23 \pm 0.16*	53.98 \pm 1.99***	0.035 \pm 0.003**
Colítico	4.09 \pm 0.19	26.29 \pm 2.28	0.116 \pm 0.024
BuOH 0.5 mg.Kg ⁻¹	4.50 \pm 0.22	40.96 \pm 4.78**	0.0418 \pm 0.006*
BuOH 1.5 mg.Kg ⁻¹	5.23 \pm 0.35*	39.77 \pm 2.45*	0.0675 \pm 0.024
EtOAc 1.5 mg.Kg ⁻¹	4.97 \pm 0.22	52.87 \pm 0.71***	0.043 \pm 0.002*

Dados expressos como média \pm d.p. (n = 8), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de t de Dunnett, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ quando comparados com o grupo colítico (DSS).

Verificou-se que os tratamentos mantiveram a atividade da GSH-Px mais próxima daqueles valores considerados normais, ao passo que a inflamação do cólon reduziu sua atividade. No entanto, apenas BuOH 1.5 mg manteve os níveis de GSH, de modo estatisticamente significativo idênticos aos níveis dos animais não colíticos (normal). A atividade da MPO foi reduzida apenas nos grupos tratados com BuOH 0.5 mg e EtOAc 1.5 mg. MPO está bastante aumentada (mais que o triplo da atividade encontrada em animais não colíticos) na colite induzida por DSS.

Animais com inflamação intestinal induzida por DSS, apresentam os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-1 e IL-6 bastante aumentados em relação aqueles não colíticos. Esses dados, além daqueles obtidos com as frações de *R. mangle* encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 Efeito dos tratamentos BuOH e EtOAc sobre os níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-1 β e IL-6 na mucosa cólica de camundongos submetidos ao modelo agudo de colite induzida pela administração de DSS.

Grupos	TNF-α (pg/mg de proteína)	IFN-γ (pg/mg de proteína)	IL-12 (pg/mg de proteína)	IL-1β (pg/mg de proteína)	IL-6 (pg/mg de proteína)
Normal	4.63 \pm 0.38***	17.47 \pm 2.43***	2.69 \pm 0.36***	7.31 \pm 0.39***	2.57 \pm 0.25***
Colítico	13.12 \pm 2.17	115.00 \pm 7.67	16.95 \pm 4.01	12.57 \pm 0.63	69.62 \pm 17.33
BuOH 0.5 mg.Kg ⁻¹	7.62 \pm 0.97*	55.53 \pm 8.93***	5.05 \pm 2.10**	8.25 \pm 0.76**	32.22 \pm 7.04*
BuOH 1.5 mg.Kg ⁻¹	7.87 \pm 1.12*	59.41 \pm 6.79***	6.55 \pm 1.99*	8.20 \pm 0.48**	32.91 \pm 6.04*
EtOAc 1.5 mg.Kg ⁻¹	6.63 \pm 0.86**	59.39 \pm 6.89***	5.64 \pm 1.78**	9.36 \pm 1.22*	17.13 \pm 6.51**

Dados expressos como média \pm d.p. (n = 8), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, * p <0.05, ** p <0.01 e *** p <0.001 quando comparados com o grupo colítico (DSS).

A avaliação dos níveis cólicos de citocinas pró-inflamatórias mostrou que todos tratamentos levaram à redução dos mesmos, embora em alguns casos, a redução não tenha sido exatamente para os valores obtidos no grupo não colítico, como são os casos de IFN- γ e IL-6.

A Figura 17 mostra que a expressão de COX-2 foi reduzida pelos tratamentos experimentais aplicados a animais submetidos à inflamação cólica por DSS.

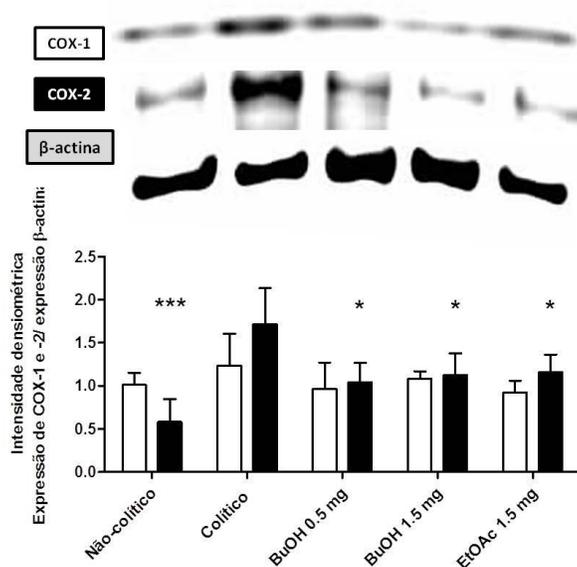


Figura 17 Efeito da administração oral de BuOH (0.5 e 1.5 mg) e EtOAc (1.5mg) por 7 dias sobre a expressão de COX-1 e COX-2 na mucosa cólica de camundongos submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida pela administração de DSS. Dados expressos como média \pm d.p. (n = 5), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ quando comparados com o grupo colítico (DSS).

As isoenzimas COX-1 e COX-2 são importantes mediadores envolvidos na inflamação. Não houve diferença significativamente estatística para o aumento da expressão de COX-1 observado no grupo colítico. COX-2 mostrou-se bastante aumentada nesses animais.

A Tabela 8 resume os resultados obtidos no modelo agudo de colite induzida por DSS.

Tabela 8 Resumo dos efeitos dos tratamentos experimentais sobre os itens medidos no modelo de colite aguda induzida por DSS em camundongos.

Modelo experimental	Medida	Tratamentos experimentais								
		BuOH			EtOAc			Aq		
		0.5	1.5	3.0	0.5	1.5	3.0	0.5	1.5	3.0
DSS	Score	X	X	X	0	X	0	X	0	X
	DAI	X	X	0	X	X	0	0	0	0
	mg/cm	X	X	0	0	X	0	0	0	0
	GSH	0	X	-	-	0	-	-	-	-
	GSH-Px	X	X	-	-	X	-	-	-	-
	MPO	X	0	-	-	X	-	-	-	-
	TNF- α	X	X	-	-	X	-	-	-	-
	IFN- γ	X	X	-	-	X	-	-	-	-
	IL-12	X	X	-	-	X	-	-	-	-
	IL-1 β	X	X	-	-	X	-	-	-	-
	IL-6	X	X	-	-	X	-	-	-	-
	COX-1	0	0	-	-	0	-	-	-	-
	COX-2	X	X	-	-	X	-	-	-	-

“X” – tem efeito; “0” – não tem efeito e “-” – não foi avaliado.

4.3 Colite aguda induzida por TNBS em ratos

As Figuras 18 a 20 mostram os resultados obtidos no modelo agudo de colite induzida por TNBS em ratos. Foram testadas, neste modelo, somente as frações ativas (BuOH e EtOAc) a fim de determinar a melhor dose a ser utilizada no modelo de colite induzida por TNBS com tratamento sub-crônico, já que Aq não mostrou atividade no modelo de colite induzida por DSS.

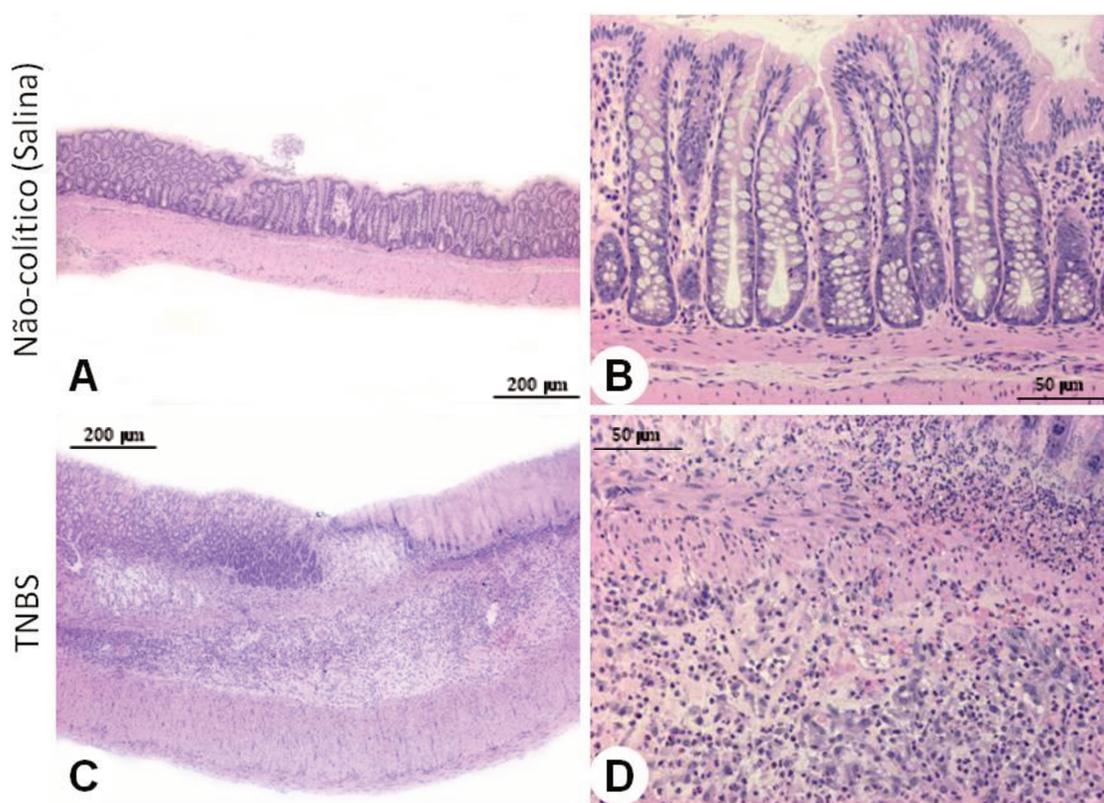


Figura 18 Fotomicrografias em corte longitudinal de intestinos de ratos submetidos ao modelo agudo de colite induzida por TNBS, mostrando grupos normal (A e B) e colítico (C e D). Imagens A e C mostram corte em aumento de 20x; imagens B e D mostram corte em aumento de 100x.

As imagens agrupadas na Figura 18 mostram cortes histológicos onde é possível verificar os danos causados pelo TNBS em todas estruturas do cólon. Destaca-se, na Figura 18D, o infiltrado inflamatório nas camadas mucosa, sub-mucosa e

muscular, enquanto a Figura 18B mostra mucosa saudável com epitélio de revestimento íntegro. A Figura 19, a seguir, mostra os danos causados pelo TNBS, na presença de tratamento com a fração BuOH nas doses de 0.5, 1.5 e 3.0 mg.

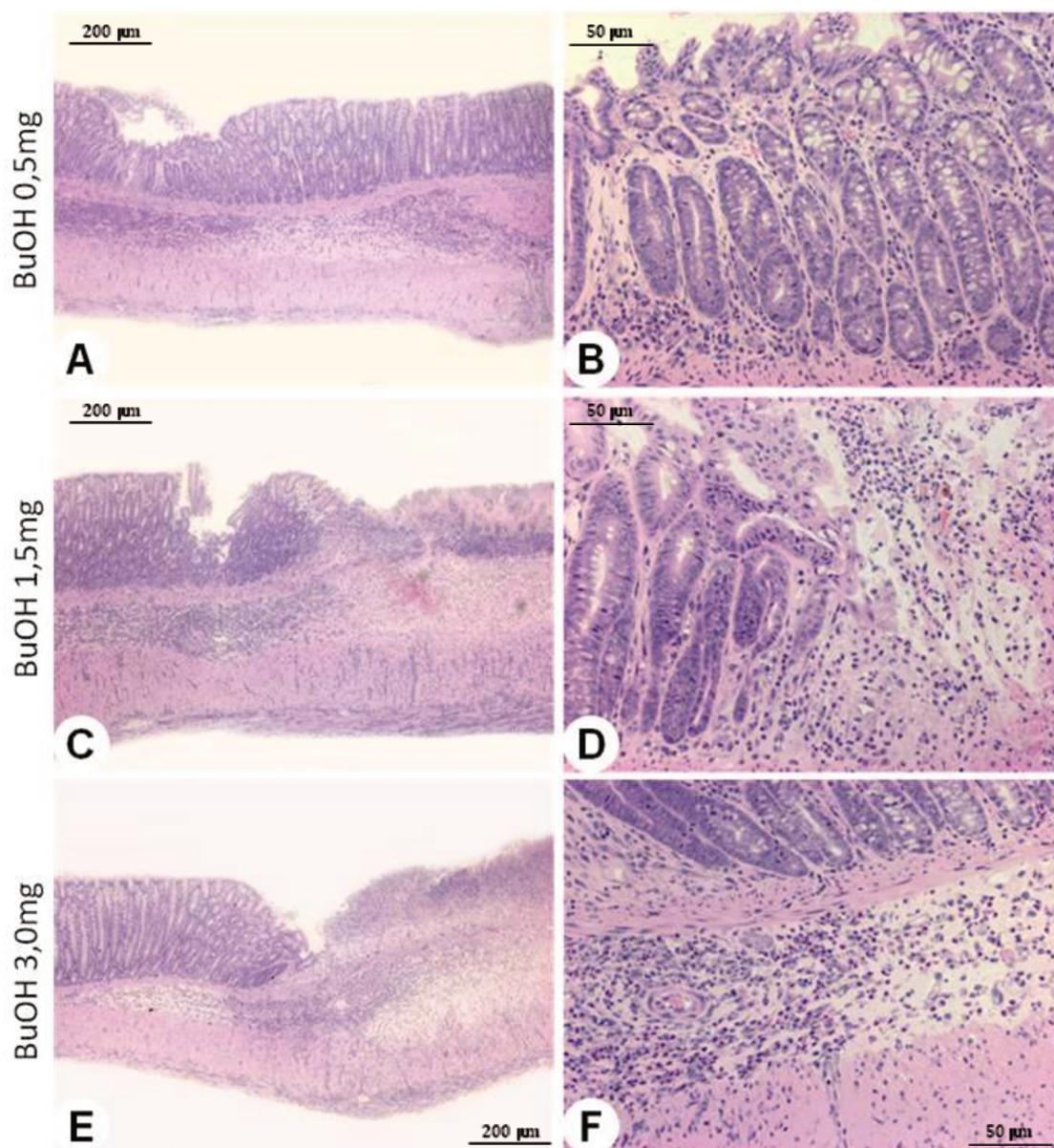


Figura 19 Fotomicrografias em corte longitudinal de intestinos de ratos submetidos ao modelo agudo de colite induzida por TNBS, mostrando grupos BuOH 0,5 mg (A e B), BuOH 1,5 mg (C e D), BuOH 3,0 mg (E e F). Imagens A, C e E mostram corte em aumento de 20x; imagens B, D e F mostram corte em aumento de 100x.

Apesar dos danos causados pelo TNBS à mucosa cólica, nota-se que na Figura 19A BuOH, na dose de 0.5 mg, reduziu os danos, especialmente sobre a mucosa, ao passo que o infiltrado inflamatório ainda pode ser visto. Com doses de 1.5 e 3.0 mg, houve reorganização das camadas superficiais dos intestinos, mesmo erodidos e com infiltrado neutrofilico intenso. No entanto, os parâmetros danos não se mostraram estatisticamente significativos. A Figura 20 mostra os dados histológicos na colite induzida agudamente por TNBS de animais tratados com EtOAc de *R. mangle*.

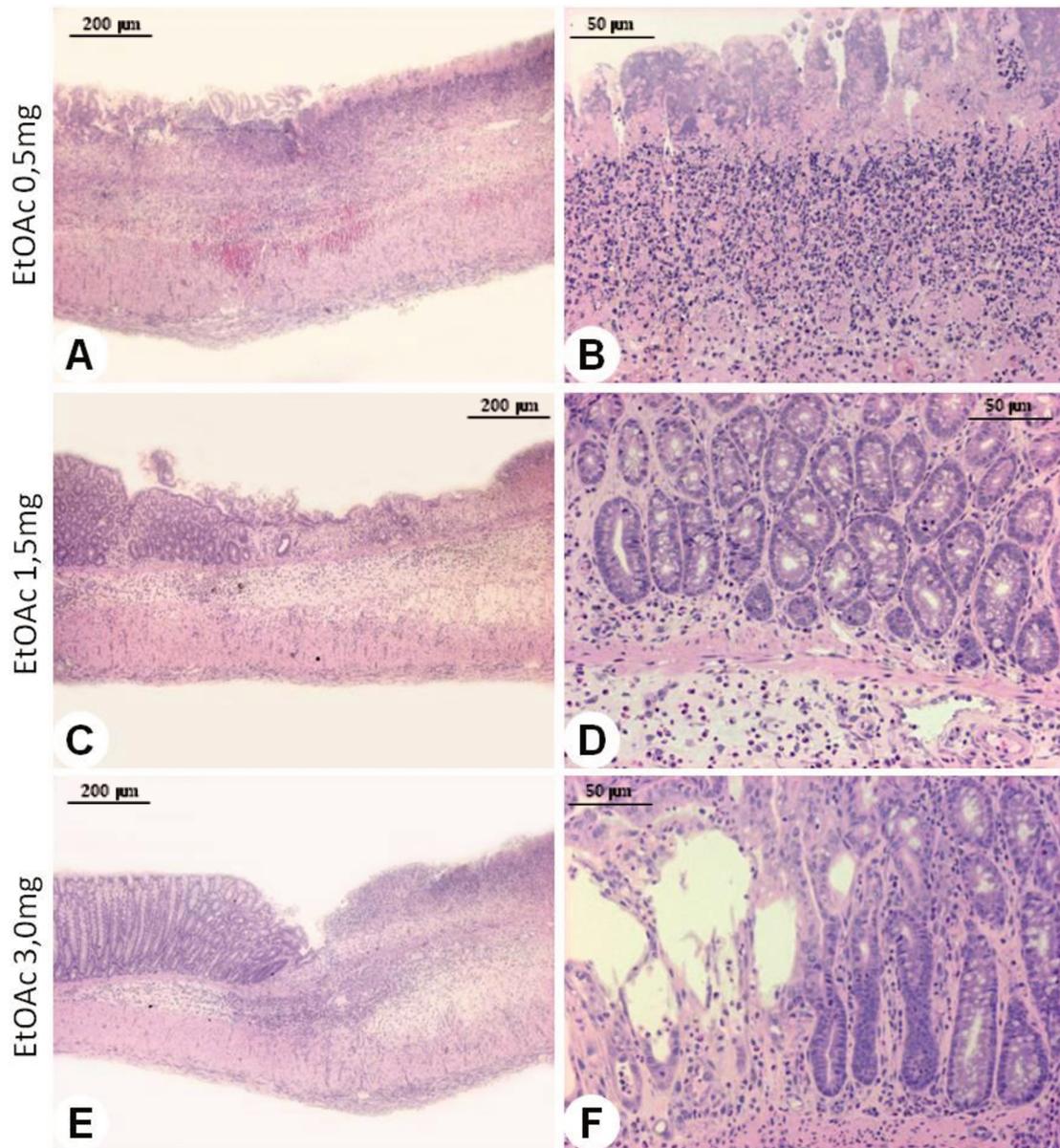


Figura 20 Fotomicrografias em corte longitudinal de intestinos de ratos submetidos ao modelo agudo de colite induzida por TNBS, mostrando grupos EtOAc 0,5 mg (A e B), EtOAc 1,5 mg (C e D), EtOAc 3,0 mg (E e F). Imagens A, C e E mostram corte em aumento de 20x; imagens B, D e F mostram corte em aumento de 100x.

Na Figura 20 vê-se os resultados do tratamento dos animais com EtOAc sobre as lesões induzidas pelo TNBS nas doses de 0,5, 1,5 e 3,0 mg. A dose do 0,5 mg da EtOAc não produz resultado algum sobre o intensa desorganização e infiltrado celular inflamatório da mucosa cólica danificada pelo TNBS. Já as doses de 1,5 e 3,0 mg

modificaram estes parâmetros, porém, só a dose de 1.5 mg de EtOAc produziu resultados estatisticamente significantes, como pode ser melhor evidenciado na Tabela 8.

As Tabelas 9 e 10, apresentadas a seguir, mostram os resultados de danos ao tecido e de atividade enzimática, respectivamente, obtidos no modelo de colite aguda induzida por TNBS em ratos cujos parâmetros macroscópicos foram avaliados durante o protocolo experimental e ao fim dele.

Tabela 9 Avaliação macroscópica dos danos causados pela administração intra-retal de TNBS em modelo experimental de colite aguda.

Grupos	Score	Adesão (0-2)	Diarréia (0-1)	Cólon peso/comprimento (g/cm)
Salina	0***	0**	0**	0.10 ± 0.0005***
Colítico	9,00 ± 0.8944	1.42 ± 0.78	1.00 ± 0	0.18 ± 0.0301
Bu 0.5 mg.Kg ⁻¹	5.87 ± 2.4160**	0.42 ± 0.53*	0.42 ± 0.53	0.15 ± 0.0124*
Bu 1.5 mg.Kg ⁻¹	7.44 ± 1.1300	0.57 ± 0.53	0.57 ± 0.53	0.17 ± 0.0195
Bu 3.0 mg.Kg ⁻¹	7.50 ± 2.2680	0.71 ± 0.75	0.71 ± 0.48	0.16 ± 0.0247
Et 0.5 mg.Kg ⁻¹	7.11 ± 0.9280	0.57 ± 0.78	0.57 ± 0.53	0.16 ± 0.0138
Et 1.5 mg.Kg ⁻¹	6.11 ± 1.4530**	0.42 ± 0.53*	0.42 ± 0.53	0.15 ± 0.0318*
Et 3.0 mg.Kg ⁻¹	6.55 ± 0.7265*	0.57 ± 0.78	0.57 ± 0.53	0.16 ± 0.0150

Dados expressos como média ± d.p. (n = 8), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, **p*<0.05, ***p*<0.01 e ****p*<0.001 quando comparados com o grupo colítico (TNBS).

Os dados, assim expressos mostram que houve redução significativa dos danos à mucosa cólica pelo TNBS somente nos grupos tratados com as frações BuOH (0.5) e EtOAc (1.5 mg). Embora a dose de 3.0 mg de EtOAc tenha reduzido, significativamente, o *score* de lesões, o mesmo não ocorreu com os demais parâmetros avaliados.

A Tabela 10, a seguir, resume os efeitos sobre enzimas antioxidante e anti-inflamatória das frações BuOH e EtOAc na mucosa cólica de ratos submetidos ao modelo de colite aguda induzida pela administração de TNBS.

Tabela 10 Efeito dos tratamentos BuOH e EtOAc sobre os níveis de GSH e atividade das enzimas GSH-Px e MPO na mucosa cólica de ratos submetidos ao modelo agudo de colite induzida pela administração TNBS.

Grupos	GSH	GSH-Px	MPO
	($\mu\text{mol/mg}$ de proteína)	(nmol/min/mg de proteína)	(U/mg de proteína)
Salina	8.42 \pm 0.16*	8.42 \pm 0.25***	0.138 \pm 0.005***
Colítico	6.59 \pm 0.32	3.06 \pm 0.27	0.229 \pm 0.014
BuOH 0.5 mg.Kg ⁻¹	8.00 \pm 0.50	4.90 \pm 0.44*	0.190 \pm 0.006*
EtOAc 1.5 mg.Kg ⁻¹	7.96 \pm 0.45	4.61 \pm 0.32	0.166 \pm 0.011**

Dados expressos como média \pm d.p. (n = 8), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, * p <0.05, ** p <0.01 e *** p <0.001 quando comparados com o grupo colítico (TNBS).

Um avaliação da atividade enzimática da GSH-Px e MPO, mostrou que tanto BuOH, na dose de 0.5 mg, quanto a EtOAc, na dose de 1.5 mg, foram capazes de reduzir a atividade da MPO; no entanto, apenas BuOH evitou a redução na atividade da GSH-Px, enquanto nenhum dos tratamentos foi eficaz em manter os níveis de GSH.

A Tabela 11 resume os resultados encontrados no modelo agudo de colite induzida por TNBS em ratos.

Tabela 11 Resumo dos efeitos dos tratamentos experimentais sobre os itens medidos no modelo de colite aguda induzida por TNBS em ratos.

Modelo	Medida	Tratamentos					
		BuOH			EtOAc		
		0.5	1.5	3.0	0.5	1.5	3.0
TNBS agudo	Score	X	0	0	0	X	X
	g/cm	X	0	0	0	X	0
	Adesão	X	0	0	0	X	0
	Diarreia	0	0	0	0	0	0
	GSH	0	-	-	-	0	-
	GSH-Px	X	-	-	-	0	-
	MPO	X	-	-	-	X	-

“X” – tem efeito; “0” – não tem efeito e “-” – não foi avaliado.

4.4 Colite induzida por TNBS com tratamento sub-crônico em ratos

O modelo de colite crônica induzida por TNBS tem por objetivo avaliar se o tratamento preventivo pode atenuar a injúria provocada pela administração do TNBS aos ratos. As frações BuOH e EtOAc, testadas nas doses de 0.5 mg e 1.5 mg, respectivamente, demonstraram eficácia tanto no modelo agudo de colite induzida por TNBS quanto no modelo de colite induzida por DSS. Assim, foram testadas também nessas doses na colite crônica. Os resultados obtidos estão representados pela Figura 21, 22 e 23.

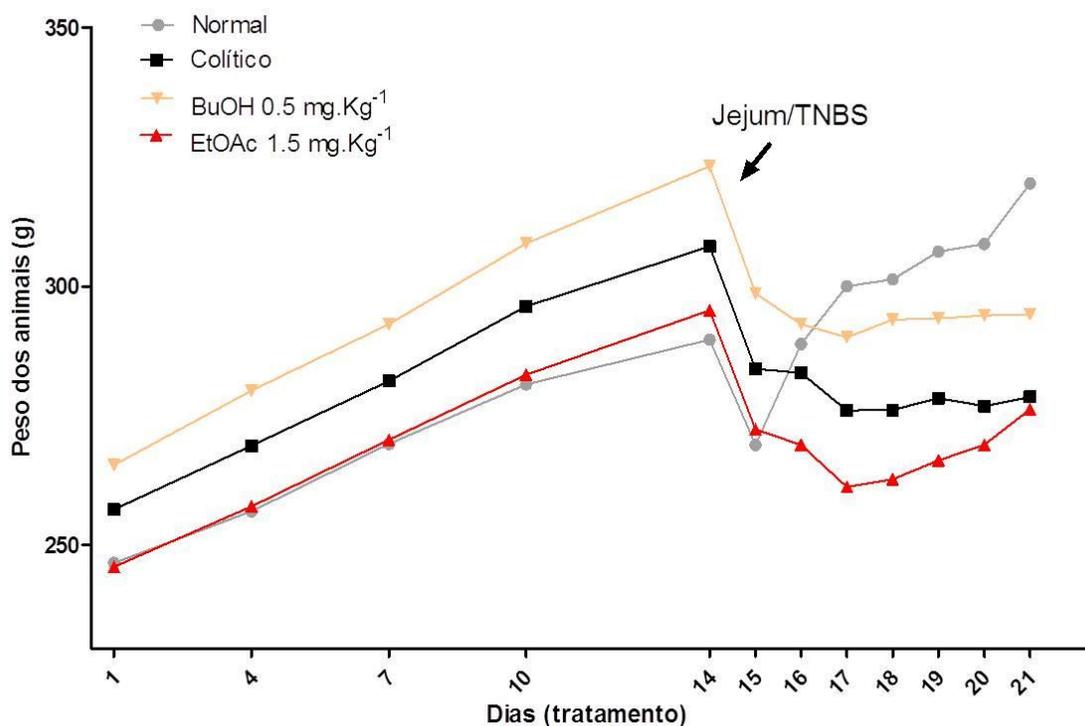


Figura 21 Evolução ponderal dos ratos submetidos ao modelo de colite crônica induzida pela administração de TNBS e tratados com BuOH 0.5mg.Kg⁻¹ e EtOAc 1.5mg.Kg⁻¹.

A Figura 21 mostra a evolução do peso dos animais ao longo do protocolo experimental; após o período de jejum e indução da colite os animais apresentam

grande perda de peso, sendo este processo revertido com o retorno da alimentação. Nos animais não colícticos, o ganho é visivelmente maior que naqueles que recebem os tratamentos experimentais, ou seja, os grupos colícticos demonstram dificuldade em recuperar peso em função do processo inflamatório instalado no cólon; porém, nota-se ganho de peso nos grupos BuOH e EtOAc em relação aos animais do grupo colíctico (não-tratados).

Na Figura 22, estão resumidos os resultados histológicos obtidos na ausência e presença dos tratamentos com as frações BuOH e EtOAc no cólon de animais submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS com tratamento sub-crônico.

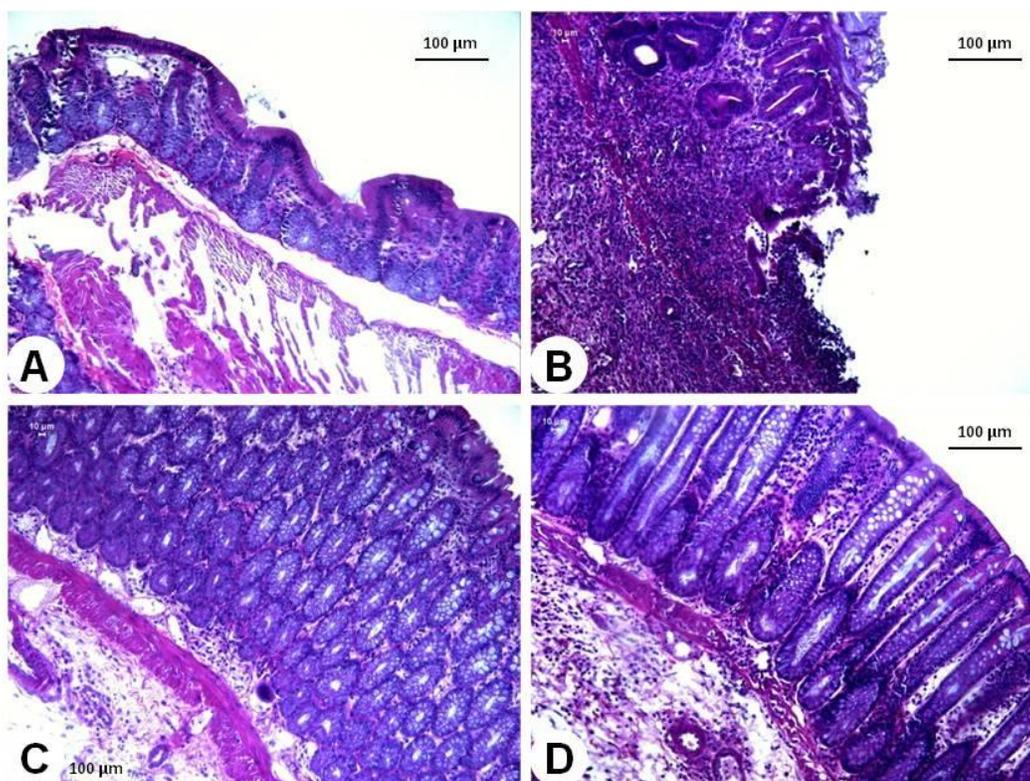


Figura 22 Fotomicrografias em corte longitudinal de intestinos de ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS com tratamento sub-crônico, mostrando grupos (A) normal, (B) colíctico, (C) BuOH e (D) EtOAc. Imagens mostram as tûnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa.

Uma observação da Figura 22 permite verificar que BuOH (Figura 22C) reduziu o infiltrado inflamatório, bem como manteve parte da mucosa íntegra ou pouco lesada numa comparação com o grupo colítico (Figura 22B, não-tratados). Na mucosa bastante organizada dos animais tratados com EtOAc apenas a extensão da lesão mostrou-se estatisticamente significativa (Tabela 12).

As Tabelas 11 a 14 mostram os resultados obtidos com o tratamento sub-crônico preventivo de frações de *R. mangle* (BuOH e EtOAc, nas doses de 0.5 e 1.5 mg, respectivamente) na colite induzida por TNBS em ratos.

A Tabela 12, a seguir, mostra os parâmetros de danos à mucosa cólica avaliados neste protocolo experimental.

Tabela 12 Avaliação dos danos causados pela administração intra-retal de TNBS em ratos tratados por 21 dias com BuOH 0.5 mg.Kg⁻¹ e EtOAc 1.5mg.Kg⁻¹.

Grupos	Score (0-10)	Lesão (cm)	Peso/comprimento (mg/cm)	Adesão (0-2)	Diarreia (0-1)
Normal	0***	0***	91,6 ± 2,5***	0***	0***
Colítico	9,2 ± 0,6	5,5 ± 0,8	225,6 ± 56,7	1,5 ± 0,5	1,0 ± 0,0
BuOH 0.5mg.Kg ⁻¹	8,1 ± 0,8*	4,3 ± 0,8*	217,8 ± 18,0	0,4 ± 0,6**	0,7 ± 0,4
EtOAc 1.5mg.Kg ⁻¹	8,3 ± 1,0	4,4 ± 1,3*	227,3 ± 40,2	1,0 ± 0,7	0,7 ± 0,4

Dados expressos como média ± d.p. (n = 6 a 12), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, **p*<0.05, ***p*<0.01 e ****p*<0.001 quando comparados com o grupo colítico (TNBS).

Ambas as frações, BuOH e EtOAc, foram eficientes em reduzir as lesões inflamatórias causadas pelo TNBS, mas somente BuOH reduziu o “score” e a adesão advindos da inflamação. Nenhum dos tratamentos e reduziu a relação peso/comprimento do cólon e a diarreia produzida por esse tipo de agressão à mucosa cólica.

A Tabela 13, apresentada a seguir, resume os resultados obtidos com os tratamentos BuOH e EtOAc sobre os níveis de GSH e atividade das enzimas GSH-Px, e CAT no modelo estudado.

Tabela 13 Efeito dos tratamentos BuOH e EtOAc sobre os níveis de GSH e atividade das enzimas GSH-Px e CAT na mucosa cólica de ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS com tratamento sub-crônico.

Grupos	GSH	GSH-Px	CAT
	($\mu\text{mol/mg}$ de proteína)	(nmol/min/mg de proteína)	(U/mg de proteína)
Normal	8,320 \pm 1,720**	11,070 \pm 0,638*	17,510 \pm 3,198**
Colítico	1,028 \pm 1,026	4,472 \pm 0,409	1,459 \pm 1,082
BuOH 0.5mg.Kg ⁻¹	6,548 \pm 0,935*	11,620 \pm 0,869**	15,910 \pm 2,409**
EtOAc 1.5mg.Kg ⁻¹	6,706 \pm 1,969*	14,850 \pm 1,573***	15,660 \pm 3,380**

Dados expressos como média \pm d.p. (n = 6 a 12), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ quando comparados com o grupo colítico (TNBS).

Tanto BuOH quanto EtOAc preveniram a queda dos níveis de GSH e da atividade das enzimas GSH-Px e CAT (Tabela 13), o que significa importante atividade antioxidante dessas duas frações.

Na Tabela 14 estão apresentados os resultados de agentes importantes no processo inflamatório induzido por TNBS em animais tratados e não tratados cronicamente com as frações de *R. mangle*.

Tabela 14 Efeito dos tratamentos BuOH e EtOAc sobre os níveis de TBARS e atividade da MPO na mucosa cólica de ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS com tratamento sub-crônico.

Grupos	MPO (U/mg de proteína)	TBARS (μ mol/mg de proteína)
Normal	0,642 \pm 0,061**	4,294 \pm 0,707**
Colítico	2,891 \pm 0,740	5,737 \pm 0,139
BuOH 0.5mg.Kg ⁻¹	0,896 \pm 0,102**	4,171 \pm 0,106***
EtOAc 1.5mg.Kg ⁻¹	2,264 \pm 0,429	7,218 \pm 0,776

Dados expressos como média \pm d.p. (n = 6 a 12), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ quando comparados com o grupo colítico (TNBS).

Tanto MPO quanto TBARS aumentaram na indução de colite por TNBS com tratamento sub-crônico. Os resultados mostraram, no entanto, que apenas BuOH reduziu os níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e a atividade da MPO na mucosa cólica das ratos submetidos a este modelo colite.

A Tabela 15 mostra uma avaliação feita sobre os níveis de importantes citocinas envolvidas no processo inflamatório após indução de colite por TNBS em ratos na ausência e presença dos tratamentos crônicos com as frações BuOH e EtOAc.

Tabela 15 Efeito dos tratamentos BuOH e EtOAc sobre os níveis de TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-10 na mucosa cólica de ratos submetidos ao modelo de colite induzida pela por de TNBS com tratamento sub-crônico.

Grupos	TNF-α (pg/mg de proteína)	IL-6 (pg/mg de protena)	IL-12 (pg/mg de proteína)	IL-10 (pg/mg de proteína)
Normal	357,3 \pm 20,7***	209,1 \pm 24,3***	12,7 \pm 1,9***	295,0 \pm 37,7***
Colítico	1381,0 \pm 227,5	807,3 \pm 45,5	28,5 \pm 2,4	120,4 \pm 4,3
BuOH 0.5mg.Kg ⁻¹	469,5 \pm 21,5***	719,1 \pm 17,4	16,72 \pm 1,0***	152,5 \pm 11,6
EtOAc 1.5mg.Kg ⁻¹	567,9 \pm 21,8***	615,4 \pm 54,4**	19,09 \pm 1,7**	252,1 \pm 19,3**

Dados expressos como média \pm d.p. (n = 6 a 12), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, ** p <0.01 e *** p <0.001 quando comparados com o grupo colítico (TNBS).

Esta avaliação revelou que ambas, BuOH e EtOAc reduziram (ou não permitiram) o aumento dos níveis de TNF- α e IL-12, enquanto apenas EtOAc apresentou efeito semelhante sobre IL-6, todas elas citocinas pró-inflamatórias. Ademais, apenas EtOAc aumentou os níveis de IL-10, considerada importante citocina anti-inflamatória.

A expressão de ciclo-oxigenases é importante na avaliação de respostas inflamatórias. A Figura 23 resume os resultados da análise da expressão de COX-1 e COX-2 na ausência e presença dos tratamentos crônicos com as frações.

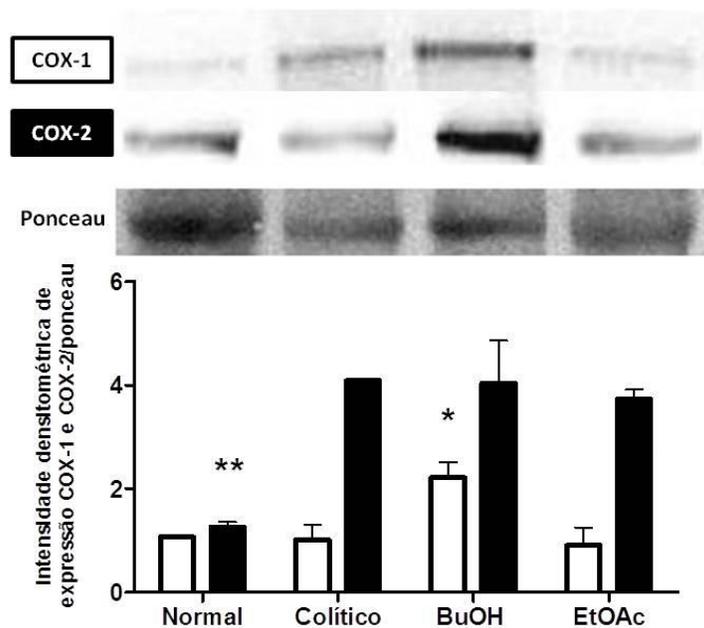


Figura 23 Efeito da administração oral de BuOH (0.5 mg.Kg⁻¹) e EtOAc (1.5 mg.Kg⁻¹) por 21 dias sobre a expressão de COX-1 e COX-2 na mucosa cólica de camundongos submetidos ao modelo sub-crônico de colite induzida pela administração de TNBS. Dados expressos como média ± d.p. (n = 5), ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Dunnett, **p*<0.05 e ***p*<0.01 quando comparados com o grupo colítico (TNBS).

A expressão da isoenzima COX-2, mas não de COX-1, no cólon de ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS com tratamento sub-crônico foi distinta, o que é esperado, já que COX-1 é constitutiva e COX-2 induzível por estímulos inflamatórios. Nenhum tratamento evitou o aumento da expressão da forma induzível (COX-2), mas a expressão COX-1 foi significativamente aumentada no grupo tratado com BuOH.

A Tabela 16 resume os resultados obtidos no modelo de colite induzida por TNBS com tratamentos crônico em ratos.

Tabela 16 Resumo dos efeitos dos tratamentos experimentais sobre os itens medidos no modelo de colite aguda induzida por TNBS com tratamento sub-crônico em ratos.

Modelo experimental	Medida	BuOH	EtOAc
		0.5	1.5
TNBS com tratamento sub-crônico	Score	X	0
	Lesão g/cm	X	X
	Adesão	0	0
	Diarreia	X	0
	GSH	0	0
	GSH-Px	X	X
	CAT	X	X
	TBARS	X	0
	MPO	X	0
	TNF- α	X	X
	IL-6	0	X
	IL-12	X	X
	IL-10	0	X
	COX-1	X	0
	COX-2	0	0

“X” – tem efeito; “0” – não tem efeito e “-” – não foi avaliado.

5 Discussão

A técnica de ESI-MS, com injeção direta de amostra, tem se mostrado como ferramenta rápida, eficiente e bastante sensível na detecção de substâncias presentes em frações e extratos. Ela é capaz de gerar informações específicas sobre a composição química de matrizes complexas, as quais apresentam substâncias de ampla faixa de peso molecular, bem como substâncias de média e alta polaridade, tais como ácidos fenólicos, proantocianidinas, catequinas e flavonóides, comumente encontrados em extratos polares de espécies vegetais (Sawaya *et al.*, 2004). Tendo em vista estas características, foram realizados experimentos de FIA-ESI-IT-MS para obtenção e comparação dos perfis, em modo negativo, do extrato acetona:água (7:3, v/v) e das frações Aq, BuOH e EtOAc (Figura 4) provenientes da partição do extrato acetona:água das cascas de *R. mangle*, o que permitiu estabelecer e confirmar a similaridade (ou não) da composição química dos extratos e frações da espécie investigada.

Os perfis químicos por FIA-ESI-IT-MS reforçam a proposta inicial da presença de taninos condensados provenientes da polimerização de catequinas. As fragmentações sugeridas (Figuras 6, 8, e 9) para os íons de algumas moléculas identificadas (Figuras 5 e 7) revelam a presença de procianidinas oligoméricas e de seus possíveis derivados O-glucosilados. Uma discussão mais detalhada para outros íons precursores foi proposta por nosso grupo para a espécie *Hancornia speciosa* (Rodrigues *et al.*, 2007), na qual a análise por FIA-ESI-IT-MS auxiliou a esclarecer a composição química de uma fitopreparação bastante complexa. Com este *fingerprint* (Figura 4) do extrato e das frações também foi possível verificar a semelhança entre o

extrato e as frações EtOAc e a BuOH, consideradas frações ativas, possivelmente devido à presença das procianidinas.

Compostos polifenólicos são metabólitos secundários de plantas e têm atraído a atenção como mediadores dos efeitos preventivos da dieta rica em vegetais em doenças inflamatórias (Dryden *et al.*, 2006). Polifenóis têm sido cada vez mais reconhecidos como agentes benéficos à saúde (Kroon *et al.*, 2004), uma vez que: (1) atenuam o processo inflamatório em muitos modelos animais de doenças humanas (Scalbert *et al.*, 2005), (2) seu consumo, por seres humanos, numa dieta saudável baseada em vegetais é de aproximadamente 1 g por dia, quantidade consideravelmente mais elevada do que a de vitaminas C e E e do β -caroteno (Bravo, 1998), (3) têm propriedades anti-inflamatória e antioxidante (Shapiro *et al.*, 2007), efeitos de sensibilização à insulina (Grassi *et al.*, 2005) e apresentam melhora na função endotelial em ensaios clínicos (Lekakis *et al.*, 2005), e (4) tem mostrado redução no risco de doença cardiovascular em estudos epidemiológicos (Ruano *et al.*, 2005). Poderosos sequestradores de radicais livres *in vitro*, defende-se a ideia de que o efeito anti-inflamatório *in vivo* dos polifenóis resulta da interação com proteínas envolvidas na transdução de sinal e expressão gênica (Shapiro *et al.*, 2007).

Estudos em modelos animais indicam que a administração de compostos polifenólicos é efetiva na prevenção e no tratamento da inflamação intestinal e seus danos. Tanto estudos agudos quanto crônicos de DII têm sido realizados com indução por administração intrarretal de TNBS ou por adição de DSS à água para beber. Compostos como resveratrol, curcumina, epigalo-catequina-galato (chá verde), entre

outros, têm fornecido evidências dos benefícios associados aos polifenóis nas DII (Shapiro *et al.*, 2007).

O modelo de colite induzida por DSS é caracterizado pela instalação de um processo inflamatório intestinal limitado à mucosa cólica, sendo bastante relacionado à colite ulcerativa encontrada em humanos, a RCUI (Wirtz *et al.*, 2007). A colite induzida por DSS leva à ativação de células da imunidade inata, incluindo macrófagos e neutrófilos, mas DSS é tóxico às células cólicas epiteliais das criptas basais (Bailon *et al.*, 2008). Assim, a partir deste modelo é possível estabelecer mecanismos de reparo do epitélio intestinal (Fournier & Parkos, 2012).

Entre os danos causados pela administração do DSS está o encurtamento do intestino quando comparados ao grupo normal (Figura 11). Nesse modelo, os tratamentos experimentais BuOH e EtOAc apresentaram melhora nos índices de danos (Tabela 5), além das alterações na evolução ponderal dos animais (Figura 16). Com esses dados, foi possível verificar que os tratamentos que responderam melhor ao modelo adotado, foram BuOH (0,5 e 1,5 mg) e (EtOAc 1,5 mg).

Algumas observações tornam-se pertinentes na análise das lâminas de histopatologia existentes nas Figuras 12 a 15. Ocorreu redução no infiltrado inflamatório nas doses efetivas das frações de *R. mangle*, bem como presença de muco nas células caliciformes (a quantidade de muco nessas células nos grupos tratados com as frações é similar àquela encontrada em animais não colíticos); além disso, a investigação sobre os mediadores envolvidos no processo inflamatório do intestino forneceu evidências a favor dessas observações.

Os dados obtidos para os compostos presentes nos tratamentos experimentais possibilitam fazer ao menos uma associação entre composição química das frações orgânicas e efeitos observados. A comparação dos espectros e dos fragmentos obtidos nos mesmos indica a presença de procianidinas oligoméricas nas frações mais ativas (BuOH e EtOAc), o que sugeriu que a atividade farmacológica está, muito provavelmente, relacionada a essas substâncias.

Um estudo já havia demonstrado que procianidinas oligoméricas, presentes em maçãs, apresentaram atividade imunossupressora e anti-inflamatória intestinal, atenuando os danos causados pelo DSS em camundongos (Yoshioka *et al.*, 2008). Outros estudos também demonstraram ação de compostos desta classe, como a epigalo-catequina-galato, na colite induzida por TNBS em camundongos (Abboud *et al.*, 2008) e em ratos (Mochizuki & Hasegawa, 2010).

O modelo de colite induzida por TNBS é usado para estudar dano crônico e agudo do cólon e fenômenos associados às ERO (Nieto *et al.*, 2000). Já havia sido demonstrado em um estudo antigo (Yoshikawa *et al.*, 1992) que etanol 30% age somente quebrando a barreira para facilitar a entrada do TNBS dentro da mucosa, mas que o mesmo não intensifica o dano no cólon. O TNBS pode ser metabolizado, enzimaticamente ou não-enzimaticamente pelo ascobarto gerando peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o que sugere que a colite induzida, neste modelo, pode ser parcialmente mediada por ERO geradas pelo metabolismo oxidativo do TNBS (Grisham *et al.*, 1991).

No modelo agudo de colite induzida por TNBS foram testadas aquelas frações ativas no modelo de indução por DSS. Os resultados obtidos mostraram efetividade da

fração BuOH 0.5 mg e da EtOAc 1.5 mg em reduzir os índices macroscópicos da doença (Tabela 9); as análises histológicas também mostram que houve melhora nos danos causados à mucosa após os tratamentos com as frações (Figuras 18, 19 e 20).

Dentre as descobertas associadas às DII, danos mediados pelo aumento na liberação de agentes oxidantes tem um papel importante (Araki *et al.*, 2006; Head & Jurenka, 2003). O tecido inflamado de paciente acometido por DII é rico em macrófagos e neutrófilos, que geram excesso de ERO com consequente aumento do estresse oxidativo (Grisham & Granger, 1988). O aumento na geração de ERO, altamente tóxicas, excede o limite do sistema de defesa intestinal e, deste modo, contribui para o dano oxidativo em DII (Babbs, 1992).

Em humanos com DII, os níveis de GSH são baixos; este tripeptídeo é o mais abundante antioxidante não-enzimático sintetizado pelas células animais e apresenta papel essencial na biologia celular, modulando a resposta nas mudanças redox associadas às ERO, além de ser importante para integridade funcional e estrutural do intestino (Oz *et al.*, 2005). A GSH pode ser depletada durante a DII e, animais deficientes em GSH apresentaram severa degradação da mucosa cólica, perda de peso e diarreia (Martensson *et al.*, 1990). A administração de N-acetilcisteína, um doador de grupo tiol a animais submetidos à colite experimental atenuou os danos produzidos na mucosa cólica (Ardite *et al.*, 2000), sugerindo que precursores de GSH podem ser benéficos no tratamento das DII.

Tanto na colite por DSS quanto por TNBS (tratamento agudo e sub-crônico) encontram-se significativamente reduzidos os níveis de GSH (Tabelas 6, 10 e 13, respectivamente). Os grupos tratados com BuOH (0.5 mg) e EtOAc (1.5 mg)

mantiveram a concentração de GSH semelhante ao grupo normal (não colíticos) apenas no modelo de colite induzida por TNBS com tratamento sub-crônico (Tabela 13), o que indica menor estresse oxidativo, já que a depleção dos níveis de GSH está associada à ação de ERO (Chu *et al.*, 2004), apesar de outros mediadores também estarem envolvidos nesse controle.

O cólon de pacientes com DII produz mais ERO quando comparado com o de indivíduos controles. Estudos em humanos (Thomas *et al.*, 1994) e em modelos animais com DII (Tham *et al.*, 2002) mostraram alteração na atividade da GSH-Px e CAT. É descrito que o cólon humano possui pequenas quantidades de enzimas antioxidantes como CAT, superóxido dismutase (SOD) e GSH-Px. Desta maneira, o balanço entre produção de ERO e sequestradores ou “scavengers” de radicais livres pode estar prejudicado, causando danos ao tecido (Nieto *et al.*, 2000).

Foi observada redução na atividade da GSH-Px, enzima que reduz peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos, utilizando GSH como substrato (Esworthy *et al.*, 2012), em ratos com colite induzida por TNBS e camundongos com colite induzida por DSS. Uma hipótese para a redução da atividade da GSH-Px é que a depleção de GSH impediria a ação desta enzima. Sabe-se que o TNBS leva à formação de altos níveis de peróxidos, incluindo H₂O₂; este dado reforça aqueles encontrados para os níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e atividade da MPO no modelo de colite por TNBS com tratamento sub-crônico (Tabela 14), pois com GSH-Px deficiente o acúmulo nos níveis de peróxidos leva à peroxidação da mucosa cólica (Nieto *et al.*, 2000; Schrenk, 2009).

A atividade da GSH-Px também foi verificada nos três modelos estudados, sendo mantida em níveis normais por todos os tratamentos avaliados no modelo de indução por DSS (Tabela 6) e no modelo de colite por TNBS com tratamento sub-crônico (Tabela 13), exceção feita ao modelo agudo de indução por TNBS (Tabela 10) onde EtOAc não foi eficaz na manutenção da GSH-Px. A avaliação da atividade da CAT no modelo de colite induzida por TNBS com tratamento sub-crônico (Tabela 13) mostrou que ambas as frações BuOH e EtOAc, mantiveram a atividade desta enzima em níveis normais, justificando os dados encontrados para GSH e GSH-Px.

Um dos principais aspectos patológicos das DII é a infiltração de neutrófilos e de células mononucleares dentro do tecido cólico; leucócitos entram na mucosa durante a inflamação gastrointestinal, levando à produção exacerbada de ERO (Cho & Brant, 2011). Infiltração neutrofilica tem papel crucial na destruição de antígenos e na reconstrução do tecido inflamado; uma medida da infiltração de neutrófilos é a atividade da MPO cólica, que está relacionada à severidade das lesões na colite induzida por TNBS (Fournier & Parkos, 2012; Schrenk, 2009).

Os resultados encontrados para atividade da MPO mostraram que BuOH (0.5 mg) e EtOAc (1.5 mg) levaram à redução de sua atividade nos modelos experimentais agudos (Tabelas 6 e 10), embora apenas BuOH tenha reduzido a atividade dessa enzima no modelo com tratamento sub-crônico (Tabela 14). O tratamento com a fração BuOH reduziu também os níveis de TBARS, aumentando as evidências dos resultados até então encontrados; no entanto, EtOAc não reduziu os níveis de TBARS e nem da atividade da MPO (Tabela 14), em concordância com aqueles resultados de danos teciduais observados neste grupo (Tabela 12). Já a manutenção dos níveis de

GSH e elevação da GSH-Px pela administração de EtOAc, sugere que as substâncias presentes nessa fração estimulam a produção de GSH e, conseqüentemente a atividade da GSH-Px.

Mediadores inflamatórios, incluindo ERO e citocinas, contribuem para a cascata inflamatória, modulando a resposta imune nas DII. TNF- α pode ativar genes responsáveis pelo estresse oxidativo que amplificam e prolongam a inflamação (Bartsch & Nair, 2006). Vários estudos têm demonstrado que ERO desempenham um papel importante na patogênese das DII; produção excessiva de ERO, nas células da mucosa, induz resposta inflamatória imune imediata que, direta ou indiretamente, aumenta os danos às células epiteliais intestinais, o que prejudica, na seqüência, a integridade da mucosa, agravando a lesão no intestino (Chiurchiu & Maccarrone, 2011; Wang *et al.*, 2011).

O sistema imune da mucosa gastrintestinal tem papel central na patogênese das DII que, em condições normais, garante o equilíbrio entre os mediadores pró e anti-inflamatórios. Tal equilíbrio permite defesa efetiva contra patógenos presentes no lúmen, mas, ao mesmo tempo, previne uma reação imune exacerbada contra diversos antígenos “inofensivos” presentes no lúmen. Tanto na RCUI, quanto na DC, o equilíbrio está rompido, resultando numa hiperativação de células efectoras do sistema imune. Com isso, surgem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IFN- γ , as quais danificam o tecido cólico (Atreya *et al.*, 2008).

O NF- κ B foi identificado como elemento chave na regulação imunológica da DII; sua ativação está sempre relacionada ao aumento da expressão de vários genes pró-inflamatórios, o que influencia fortemente o curso da inflamação na mucosa cólica

(Atreya et al., 2008). Macrófagos e células epiteliais são importantes por sua atuação como fonte de mediadores pró-inflamatórios via NF- κ B (Gelbmann *et al.*, 2003). Além do TNF- α , as citocinas IL-1 β e IL-6, além do NF- κ B também são capazes de regular a expressão da IL-12 (Becker *et al.*, 2001) e IL-23 (Becker *et al.*, 2003).

A produção exagerada de IL-12, uma citocina derivada de macrófagos, desloca a resposta imune para Th1, uma resposta caracterizada pelo aumento da produção de TNF- α e IL-6, o que resulta num ciclo de retroalimentação (Hanauer, 2006). A IL-6 tem papel crucial sobre inflamação, regulação imune, hematopoiese e oncogênese; há evidências de que a via de sinalização da IL-6 desempenha um papel fundamental no processo inflamatório descontrolado das DII (Mitsuyama *et al.*, 2006). A avaliação desta citocina revelou que as frações BuOH e EtOAc diminuíram seus níveis no modelo agudo (Tabela 7); todavia, apenas EtOAc reduziu-os no modelo de colite induzida por TNBS com tratamento sub-crônico (Tabela 15), sugerindo que parte da atividade anti-inflamatória dos compostos presentes nessas frações pode estar relacionado com a redução dos níveis dessa citocina.

Citocinas induzidas por NF- κ B são responsáveis pela perpetuação dos estímulos, ativação e diferenciação de células imunes da lâmina própria, resultando em cronicidade da inflamação da mucosa (Neurath *et al.*, 2002). TNF- α é importante como mediador inflamatório no intestino, sendo capaz de induzir expressão de vários genes, além de apresentar múltiplos efeitos biológicos, tais como aumento do recrutamento de leucócitos, modulação da produção de óxido nítrico, indução da secreção de citocinas pró-inflamatórias e proliferação e diferenciação de células do sistema imunológico (Danese & Fiocchi, 2011). Os resultados obtidos mostram que

ambos os tratamentos com as frações BuOH e EtOAc, reduziram os níveis de TNF- α nos modelos agudo (Tabela 7) e crônico (Tabela 15), sugerindo que as substâncias presentes nessas frações podem atuar sobre a ativação desta citocina. Curiosamente, BuOH e EtOAc também diminuíram os níveis de IL-12 (ligada à supressão de TNF- α) e de IFN- γ no modelo de colite induzida por DSS (Tabela 7). Em conjunto, esses resultados podem explicar como ambas as frações, BuOH e EtOAc, diminuem o processo inflamatório no cólon. Anticorpos específicos, anti-IL-12 ou IFN- γ , antagonizam o desenvolvimento de DII espontânea em camundongos deficientes em IL-10, mas apenas a neutralização de IL-12 leva à melhora da doença (Xavier & Podolsky, 2007). Inibição de IL-12 reduz a resposta Th1, diminuindo assim a produção de citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-12).

Citocinas pró-inflamatórias agem sobre populações de células locais para promover apoptose, além de melhorar o recrutamento de outras células inflamatórias e aumentar a secreção de quimiocinas ao promover danos ao tecido (Mayer, 2010). Sabe-se que as células dendríticas são responsáveis pela tolerância no intestino; estas células, residentes da lâmina própria ou placas de Peyer, do intestino parecem produzir preferencialmente IL-10, ao invés de IL-12 (Arnett & Viney, 2010). IL-10 têm efeito pleiotrópico sobre várias células; possui atividade anti-inflamatória sobre as células T, macrófagos e células dendríticas nos seres humanos, bem como em modelos animais de doenças inflamatórias. Apesar da IL-10 ter eficácia no tratamento da colite em modelos animais e suprimir a produção de citocinas inflamatórias *in vivo* em células intestinais de pacientes com DII (Danese & Fiocchi, 2011) e, em doenças com deficiência absoluta ou relativa de IL-10, a ativação imune ainda existe (Sabat, 2010).

Quanto à avaliação dos níveis IL-10 (Tabela 15), os tratamentos com as frações de *R. mangle* apresentaram respostas diferentes novamente no modelo com tratamento sub-crônico, enquanto a fração EtOAc levou ao aumento dos níveis de IL-10, a fração BuOH não mostrou qualquer efeito sobre esta citocina.

Genes inflamatórios, como os da COX-2, TNF- α e IL-1 β , são os alvos farmacológicos mais comuns na terapêutica por serem ativadores do NF- κ B nas DII. Além dos mediadores já mencionados, alguns autores sugerem que IL-1 β desempenha papel importante na colite induzida por DSS, e sua supressão pode levar à melhora da doença (Okada *et al.*, 2011; Yoshida *et al.*, 2010). A Tabela 7 mostra que os tratamentos experimentais com as frações BuOH e EtOAc levaram à redução dos níveis de IL-1 β na mucosa intestinal de camundongos submetidos ao modelo de colite induzida por DSS.

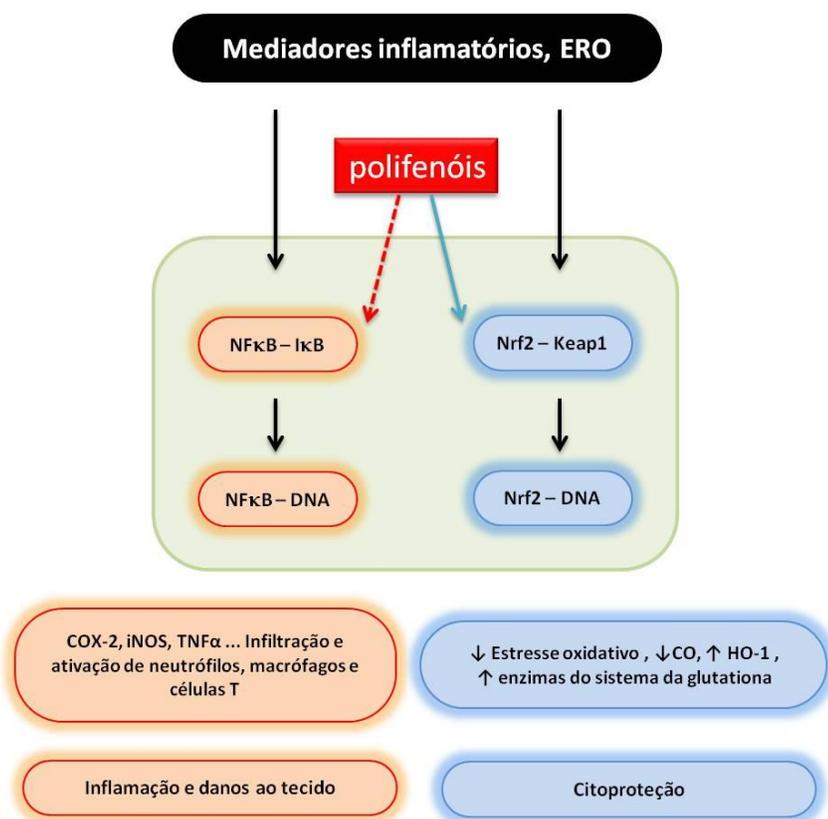
Estudos anteriores mostraram que a expressão de COX-2, mas não a de COX-1, é estimulada após indução de colite com TNBS ou DSS (Camacho-Barquero *et al.*, 2007); todavia, outro estudo (Hyun *et al.*, 2008) mostrou que em camundongos *knockout* para PAR₂, tanto COX-1 quanto COX-2 tiveram expressão aumentada após indução de colite por TNBS, e que isto estava associado à redução da inflamação. Assim, as duas isoformas de COX podem exercer, conjuntamente, efeito anti-inflamatório durante o desenvolvimento da colite. Outro estudo mostrou que COX-1 e COX-2 tem papel ativo na modulação da inflamação intestinal em diferentes modelos de colite, uma vez que a administração de inibidores seletivos de COX-1 ou COX-2, em modelos da colite induzida por TNBS, intensificava a severidade da colite e prejudicava a cicatrização.

Os resultados obtidos na avaliação da expressão de COX-1 e COX-2 demonstraram que o tratamento com BuOH levou ao aumento da expressão de COX-1; já a expressão de COX-2 foi aumentada em todos os grupos colíticos no modelo de colite induzida por TNBS com tratamento sub-crônico (Figura 23). Porém, no modelo de colite induzida por DSS, ambas as frações, BuOH e EtOAc, levaram à redução da expressão de COX-2, enquanto a expressão de COX-1 foi mantida no mesmo nível em todos os grupos (Figura 17).

Assim, os dados relativos aos mediadores envolvidos no processo inflamatório do cólon, quando contrapostos aos índices de avaliação dos modelos experimentais (Tabelas 5, 9 e 12), bem como aqueles das lâminas de histopatologia (Figuras 12-15, 18-20 e 22), convergem para a eficácia dos tratamentos experimentais (BuOH e EtOAc) em reduzir os danos causados pelos agentes indutores da inflamação intestinal nos modelos experimentais. A análise destes dados indica que os tratamentos atuam de forma semelhante, onde o componente antioxidante está sempre presente auxiliando as demais atividades demonstradas por ambos, seja na modulação de citocinas, seja naquela de enzimas como a COX e MPO.

Um estudo de revisão (Shapiro *et al.*, 2007) reuniu informações importantes sobre os possíveis mecanismos de ação de polifenóis na inflamação intestinal (Figura 24). Substâncias como resveratrol, epigalo-catequina-galato, quercetina e curcumina podem inibir a fosforilação de I κ B e/ou inibir a degradação proteossomal de I κ B atenuando a ativação de NF- κ B num processo inflamatório. Essa ação leva também à ativação da transcrição de fatores de defesa antioxidantes e de moléculas detoxificantes de fase II, tais como heme-oxigenase e enzimas relacionadas à

glutaciona. A transcrição dessa linha de defesa é provocada pela translocação do fator nuclear relacionado a E2 (Nrf2) através de sua liberação pela proteína Keap1. Curiosamente, essa via também é ativada fisiologicamente por mediadores inflamatórios como ERO, provavelmente como um mecanismo contrarregulatório de proteção aos danos secundários ao tecido durante a inflamação. Assim, concluindo a revisão, polifenóis inibiriam os danos causados por ERO na inflamação, e fortalecem respostas citoprotetoras por modulação diferencial da expressão gênica.



Shapiro, H. *et al.* 2007. Gut 56, 426-435.

Figura 24 Esquema do possível mecanismo de ação de compostos polifenólicos. Adaptado de Shapiro *et al.*, 2007.

6 Conclusões

Os resultados desse trabalho permitiram concluir que:

- As frações BuOH e EtOAc, obtidas a partir das cascas de *R. mangle*, concentram procianidinas oligoméricas, sugerindo que estes sejam os compostos responsáveis pelos efeitos observados;
- BuOH e EtOAc foram eficazes em reduzir os danos causados pela DII nos modelos experimentais abordados neste trabalho;
- Ambas as frações atuaram no fortalecimento das linhas de defesa antioxidantes e na redução da concentração de citocinas pró-inflamatórias, destacando-se maior potencial antioxidante da fração BuOH e efeito imunomodulatório da fração EtOAc, particularmente, pelo aumento dos níveis de IL-10. Tanto a fração BuOH quanto a EtOAc reduziram ainda a expressão de COX-2 em modelo agudo de colite induzida por DSS, enquanto a administração crônica por 21 dias, da fração BuOH aumentou a expressão de COX-1, sendo este evento associado, provavelmente, à melhor recuperação da mucosa inflamada no modelo de colite induzida por TNBS com tratamento sub-crônico.

7 Perspectivas

Sobre a elucidação estrutural dos compostos presentes nas cascas de *R. mangle*, nosso grupo de pesquisa ainda irá realizar outros trabalhos envolvendo extratos e frações mais promissoras, além de novos métodos de separação e detecção de substâncias químicas.

Os compostos encontrados nas cascas de *R. mangle* tem se mostrado promissoras do ponto de vista da terapêutica; sua composição química merece, portanto, ainda mais atenção, uma vez que sua eficácia vem sendo comprovada em nossos recentes trabalhos (de-Faria et al., 2012a; de-Faria et al., 2012b; de Faria et al., 2012). Ademais, a elucidação completa dos mecanismos envolvidos nessas ações farmacológicas obtidas abre novas de possibilidades tanto para estudos farmacológicos quanto naqueles de química de produtos naturais.

Tendo em vista que aproximadamente metade dos produtos farmacêuticos introduzidos no mercado nos últimos 20 anos foi desenvolvida a partir de produtos naturais (Vuorelaa *et al.*, 2004), o depósito de patente sobre os compostos encontrados em *R. mangle* e seu uso, junto ao INPI fornece subsídios para prosseguir com o trabalho, tratando agora de investigação clínica quanto ao uso desses compostos em pacientes com DII.

8 Publicações referentes à tese

Artigo publicado

Título: Effects of *Rhizophora mangle* bark extracts on experimental colitis induced by TNBS in rats

Periódico: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine – ECAM

Artigo submetido

Título: Procyanidin-enriched extracts from red mangrove ameliorates DSS-induced colitis in mice.

Periódico: GUT

Research Article

Effects of *Rhizophora mangle* on Experimental Colitis Induced by TNBS in Rats

Felipe Meira de Faria,¹ Anderson Luiz-Ferreira,¹
Eduardo Augusto Rabelo Socca,¹ Ana Cristina Alves de Almeida,²
Ricardo José Dunder,¹ Luis Paulo Manzo,¹ Marcelo Aparecido da Silva,³ Wagner Vilegas,³
Ariane Leite Rozza,⁴ Cláudia Helena Pellizzon,⁴ Lourdes Campaner dos Santos,³
and Alba Regina Monteiro Souza Brito²

¹ Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas, SP, Brazil

² Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

³ Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UNESP, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

⁴ Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, 18618-970 Botucatu, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Felipe Meira de Faria, defaria.felipe@gmail.com

Received 11 July 2012; Accepted 23 August 2012

Academic Editor: Vassya Bankova

Copyright © 2012 Felipe Meira de Faria et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Male Unib-WH rats were pretreated for two weeks with butanolic (BuOH) and ethyl acetate (EtOAc) fractions. Colitis was induced by rectal administration of TNBS, the treatment continued, and animals were sacrificed on day 7 after the TNBS administration. Phytochemical studies were performed in order to provide the characterization of the tannins present in the bark of *R. mangle*. Results showed that EtOAc fraction increased the levels of IL-10 (** $P < 0.01$) and diminished the levels of TNF- α (** $P < 0.001$) and IL-6 (** $P < 0.01$). BuOH fraction reduced the MPO activity (** $P < 0.01$) and levels of TBARS (** $P < 0.001$); it also increased COX-1 expression, diminished the levels of TNF- α (** $P < 0.001$), and increased the levels of IL-12 (** $P < 0.001$). Besides, both treatments augmented the levels of GSH (* $P < 0.05$), the activity of GSH-Px (** $P < 0.01$ for BuOH fraction and ** $P < 0.001$ for EtOAc fraction), and CAT (** $P < 0.01$). In conclusion, both treatments ameliorated the injury induced by TNBS through different mechanisms, probably by their chemical composition which directed its activity into an antioxidant or anti-inflammatory response, leading to an immune modulation.

1. Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBDs) such as ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) have complex etiologies but are simply characterized by chronic active intestinal inflammation that waxes and wanes. The main features of these diseases are a robust inflammatory response of unknown origin associated with mucosal injury and increased epithelial permeability, invasion of commensal bacteria into the subepithelial space or lamina propria, and massive recruitment of neutrophils [1].

The UC primarily affects the mucosal lining of the colon and rectum, whereas CD usually affects the whole

intestinal wall and potentially may extend to any part of the gastrointestinal tract [2]. Intestinal homeostasis requires a controlled innate immune response to the microbiota, which is recognized by toll-like receptors (TLRs) and nucleotide-binding oligomerization domain- (NOD-) like receptors on the epithelial and immune cells. This recognition process contributes to tolerance, but when the process is dysregulated, inflammation ensues. In CD, abnormalities of innate immunity are linked to variants of receptor genes, the products of which normally mediate microbial recognition [3].

Various proinflammatory mediators such as cyclooxygenases (COX-1 and COX-2), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-12 (IL-12),

the presence of highly activated inflammatory cells such as neutrophils, dendritic cells, macrophages, and excessive production of reactive oxygen species (ROS) have been implicated in the pathogenesis of this disease [4].

Many polyphenolic compounds have been studied for their intestinal anti-inflammatory activity, whereas the main effect of these compounds on inflammatory conditions is due to the inhibition of proinflammatory markers [5, 6]. In this context, medicinal plants which accumulate polyphenolic compounds have an important role in the investigation of novel therapeutics agents.

Rhizophora mangle is a mangrove plant which is a rich source of phenolic compounds, especially condensed and hydrolysable tannins; its bark is known as a traditional medicine in Brazil and Caribbean countries [7]. In recent years, various authors have described some activities such as antioxidant [8], anti-inflammatory [9], wound healing [10] and antiulcer [7, 11]. The present work aimed at evaluating the effects of *Rhizophora mangle* extracts on the experimental TNBS-induced colitis in rats.

2. Material and Methods

2.1. Animals. Unib-WH male rats (180–250 g) obtained from the breeding of the Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP) were used. Animals were fed with a certified Nuvilab CR-diet, with free access to tap water, and were housed on a 12 h light/dark cycle at $60 \pm 1\%$ humidity and a temperature of $21 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.2. Plant Material and Preparation of the Extracts. The barks of *Rhizophora mangle* L. were collected in "Estuário de Santos," Santos, SP, Brazil. Professor Msc. Paulo Salles Penteado Sampaio authenticated the botanical identity of the plants, and a voucher specimen (HUSC-P.S.P. Sampaio et al., 800) was deposited to the (Herbário da Universidade Santa Cecília HUSC). The preparation of the extracts of the bark of *Rhizophora mangle* as well as their phytochemical analysis was performed according to de-Faria et al. [11].

2.3. FIA-ESI-IT-MS. The fingerprints were obtained in a mass spectrometer LCQ Fleet (Thermo Analytica), equipped with a direct injection dispositive via continuous flow injection analysis (FIA). ESI fingerprints in the negative ion mode of *R. mangle* extract and fractions were acquired and accumulated over 60 s and spectra were scanned in a range between m/z 50 and 1200, and multiple fragments (MS^2 , MS^3) were performed in an ion-trap interface (IT). Capillary and spray voltages were set at -4 V and -5 kV , respectively, with a desolvation temperature of 280°C , carrier gas (N_2) flow rate 60 (arbitrary units). Firstly, a full-scan fingerprint was obtained, after that, MS^n experiments were made from the first scan of the preselected precursor ions with collision energy between 25% and 30% of total energy of the equipment.

The Xcalibur software version 1.0 (Thermo Scientific) was used during the acquisition and spectrometric data processing.

2.4. Experimental Colitis. Male Unib-WH rats were randomly assigned to four groups ($n = 8$); two of them (noncolitic and control groups) received no treatment, and the others received, orally, daily for 3 weeks, 0.5 mg/Kg of BuOH fraction, 1.5 mg/Kg of EtOAc fraction (suspended in saline 10 mL/kg). Both noncolitic and control groups (colitic nontreated) were given daily 10 mL/kg of saline. Two weeks after the treatment started, the rats were fasted overnight and those from the control and treated groups were rendered colitis by the method originally described by Morris et al. [12]. Briefly, they were anaesthetized with halothane and given 10 mg of TNBS dissolved in 0.25 mL of 50% ethanol (v/v) through a Teflon cannula inserted 8 cm through the anus. Rats from the noncolitic group were administered intracolonicly with 0.25 mL of phosphate-buffered saline instead of TNBS. Behavior, body weight, and stool consistency were recorded daily throughout the experiment. All rats were killed with an overdose of halothane 1 week after induction of colitis, and the colon was removed aseptically and placed on an ice cold plate and longitudinally opened.

2.5. Assessment of Colonic Damage. For each animal, the distal 10 cm portion of the colon was removed, slightly cleaned in physiological saline for faecal residues removal, and weighed. Macroscopic inflammation scores were assigned based on clinical features of the colon (score 0–10: 0 (no damage), 1 (focal hyperaemia), 2 (ulceration without hyperaemia or bowel wall thickening), 3 (ulceration with inflammation at 1 site), 4 (≥ 2 sites of ulceration and inflammation), 5 (major sites of inflammation >1 cm along the organ), 6–10 (major sites of inflammation >2 cm along the organ)). Stool consistency (score 0–1) was evaluated according to the criteria of Bailón et al. [13] and Vicario et al. [14]. Pieces of inflamed colon were collected and subsequently divided into longitudinal segments and frozen in liquid nitrogen for further measurement of biochemical parameters.

2.5.1. Antioxidant Assay

(1) **Levels of Glutathione (GSH).** GSH levels of colonic tissue of animals were determined by Ellman's reaction using 5'5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) as described by Anderson [15]. The intensity of the yellow colour was read at 412 nm.

(2) **Glutathione Peroxidase Activity (GSH-Px).** GSH-Px activity was quantified by following the decrease in absorbance at 365 nm induced by 0.25 mM H_2O_2 in the presence of reduced glutathione (10 mM), NADPH, (4 mM), and 1 U enzymatic activity of GSH-Px [16].

(3) **Catalase (CAT).** Catalase activity was performed according to the method described by Aebi [17]. The samples were homogenized (1 : 200) in phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) and triton x-100 (9 : 1). Then, samples were centrifuged (7000 g, 4°C , 15 minutes); for 200 μL of the homogenate were added 100 μL of H_2O_2 (30 mM). Absorbance was measured at 240 nm for 2 minutes. The catalase activity was expressed

as U/mg of protein, and U of enzyme activity is defined as the amount of enzyme required to degrade 1 μ mol of H₂O₂/mg of protein.

(4) *Myeloperoxidase Activity (MPO)*. MPO activity in the colonic mucosa was measured by the method proposed by Krawisz et al. [18] to evaluate neutrophil accumulation. The tissue was minced with hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) buffer on ice and homogenized for three times (3 s) on ice; the homogenizer was rinsed twice with 1 mL of HTAB, the homogenate and washes were sonicated for 10 s, freeze-thawed three times, then, aliquots of homogenate were mixed with a reaction buffer of 50 mM phosphate buffer, pH 6.8, containing 0.005% H₂O₂ and 1.25 mg/mL o-dianisidine dihydrochloride and then measured at 460 nm.

(5) *Estimation of Lipid Peroxidation (TBARS)*. The homogenate of the colon was diluted in 0.15 M KCl (ratio 1 : 10). Then, to 0.5 mL of this homogenate, 0.2 mL of dodecyl sulfate (8.1%), 1.5 mL of acetic acid (20%, adjusted with NaOH solution to pH 3.5), 1.5 mL thiobarbituric acid (0.8% w/v), and 0.3 mL of distilled water were added. All samples were left in water bath set at 95°C for 1 hour. After this period, the samples were cooled and added to 1 mL of distilled water and 5 mL of the mixture n-butanol : pyridine (15 : 1, v/v), shaken in vortex for 1 min and centrifuged at 1400 G for 10 minutes. The absorbance of organic layer was determined at 532 nm. TEPP (1,1,3,3-tetraethoxypropane) diluted in ethanol was used as standard. The results were expressed as picomoles of substances that react with thiobarbituric acid (TBARS) per mg of protein (nmol TBARS/mg protein) [19].

2.5.2. *Determination of the Cytokine Levels*. Tissue homogenate was centrifuged, and the supernatant was stored at -70°C. Cytokine detection was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for TNF- α , IL-6 (DY 406), IL-10 (DY 522), and IL-12 (p70) (DY 419) with the Duoset kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

2.5.3. *Western Blotting Analysis*. Frozen colon samples were homogenized in 1 mL of cold buffer containing phosphate buffer-PB 0.1 M, pH 7.4, and protease inhibitor cocktail-1% (Sigma-Aldrich P-8340). Homogenates were centrifuged (12,000 \times g, 15 min, 4°C), and the supernatants were collected and stored at -80°C. Protein concentration of the homogenate was determined following Bradford's colorimetric method [20]. Then, samples were treated with Laemmli buffer (PB 0.5 M, pH 6.8; glycerol, sodium dodecyl sulfate (SDS) 10%, bromophenol 0.1%, β -mercaptoethanol) in a 1 : 1 proportion. Equal amounts of protein from samples (100 μ g) were separated on 10% acrylamide gel by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. In the next step, proteins were electrophoretically transferred onto a nitrocellulose membrane and incubated with specific primary antibodies: COX-1 (160109, Cayman Chemical, USA) and COX-2 (160126, Cayman Chemical, USA) at 1 : 500 dilution. Each membrane was washed three times for 10 min and incubated with HRP-Goat Anti-Rabbit (Invitrogen 656120)

(for COX-1 and COX-2, all diluted at 1 : 5000). To prove equal loading, the blots were analyzed with standard protein dye ponceau [21]. Immunodetection was performed using enhanced chemiluminescence light-detecting kit (SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate, Pierce, IL, USA). Densitometric data were performed with G-BOX, Syngene following normalization to the control (ponceau) by GeneSys software.

3. Histology

The slides were observed after haematoxylin and eosin (HE) staining. Histological analyses were made using a Leica microscope associated with Leica Q-Win Software 3.1 (Leica-England), from the Image Analysis Laboratory of the Department of Morphology, UNESP Botucatu.

4. Statistical Analysis

Results were expressed as mean \pm standard error of means (SEM). The statistical significance of each test group in relation to the control was calculated using ANOVA followed by Dunnet or Tukey's *t*-test.

5. Results

The FIA-ESI-ITMS/MS technique with sample direct injection has been used as a quick, efficient, and sensitive tool. It is capable of generating specific information about the chemical composition of matrix complex, which presents substances with a broad range of molecular weight, as well as medium and high polarity substances, such as phenolic acids, proanthocyanidins, catechins, and flavonoids, commonly found in polar extracts of plants [22].

Regarding these characteristics, FIA-ESI-IT-MS/MS assays were made to obtain and compare the *fingerprints* of the acetone : water 7 : 3 extract and active fractions, Butanolic (BuOH fraction) and Ethyl Acetate (EtOAc fraction), in negative mode, which allows us to establish and confirm the similarity (or not) of the chemical composition of these extracts and fractions.

The investigation of the *full scan* mass spectra reveals the presence of various substances, which are represented by the precursor ions of the deprotonated molecules ([M-H]⁻) (Table 1) for the extract and fractions obtained from the barks of *Rhizophora mangle*.

The ion at *m/z* 289 was assigned to the deprotonated molecule of (epi)catechin whose fragmentation led to the base peak at *m/z* 137, which represents C-ring cleavage through a retro-Diels-Alder (RDA) mechanism [23, 24]. A minor product ion at *m/z* 271 was due to the loss of water with double-bond formation (Table 1). The chirality of the C3 on the flavan-3-ols cannot be differentiated by mass spectrometry. Designations of the epimer configuration are generally based on the relative abundance of the "epi" configuration as polyphenolic components of tea infusions and extracts [25, 26]. In our case, we designated the compounds as [epi] catechins.

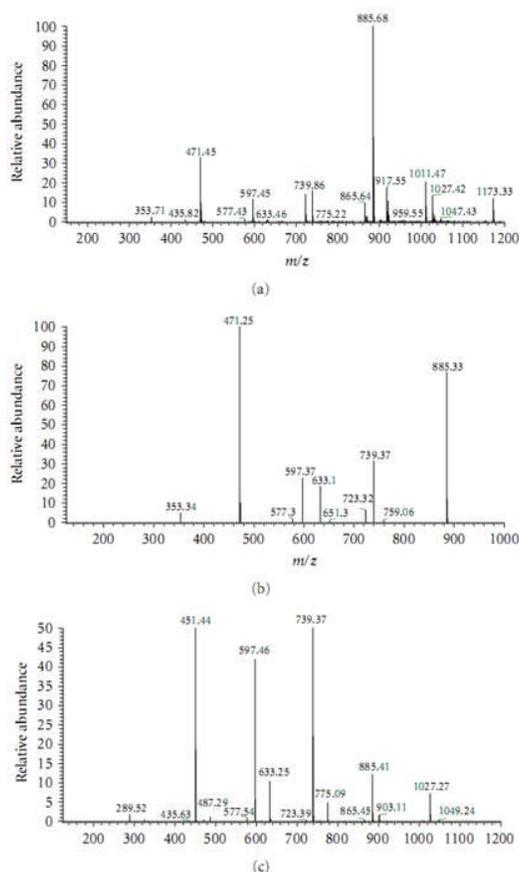


FIGURE 1: Direct flow injection ESI-IT-MS fingerprint spectra in full scan, obtained in negative ion mode. (a) Normal mass scan in the range of m/z 50–1200 of the acetone: water (7 : 3, v/v) extract, (b) normal mass scan in the range of m/z 50–1200 of the BuOH fraction, and (c) normal mass scan in the range of m/z 50–1200 of the EtOAc fraction. For spectrometric conditions, see Section 2.

TABLE 1: ESI-MS and ESI-MSⁿ product ions of proanthocyanidins and procyanidins occurring in the bark of *R. mangle*.

[M-H] ⁻	Product ions
289	137 [M-152-H] ⁻ , 271 [M-18-H] ⁻
577	289 [M-288-H] ⁻ , 137 [M-152-H] ⁻ , 271 [M-18-H] ⁻
597	451 [M-146-H] ⁻
1173	885 [M-288-H] ⁻ , 733 [M-288-152-H] ⁻ , 587 [M-288-152-146-H] ⁻

In a first class of secondary metabolites, the precursor ion of (epi)catechin formed by interflavonoidic ligation between catechin units of m/z 577 (dimer), [M-H]⁻, was found in

the full scan of the extract (Figures 1(a), 1(b), and 1(c), Table 1, Figure 2). Another catechin derivative, comprising two hexoses, was identified on m/z 597. The spectrum MS² provided a loss of 146 Da probably due to the loss of a terminal rhamnose, affording the ion m/z 451 (Table 1, Figure 2).

Fragmentation MS/MS of precursor ion of m/z 1173 (Figure 1(a)) produced base peak of m/z 885; this ion was generated by the elimination of one unit of (epi)catechin [M-288-H]⁻ of the (epi)catechin unit of this trimer (Table 1, Figure 3).

In order to verify the results described above, MS³ experiments for the main observed peaks were performed. The MS³ of ion on m/z 773 refers to a loss of a 152 Da

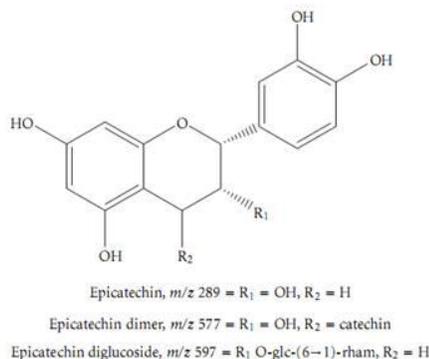


FIGURE 2: Epicatechins identified in the barks from *R. mangle* by FIA-ESI-IT-MS/MS, negative mode.

$[\text{M}-288-152-\text{H}]^-$ formed due to RDA fragmentation (Figure 3). Another consistent proposal was used to explain the presence of the ion on m/z 587, generated by the mechanism of quinone-methide (QM) fragmentation, occurring on D-ring of the superior unit with loss of residuum 1,3,5-trihydroxybenzene glucoside sequence for the elimination of the resultant fragment of retro-Diels-alder (RDA) on the C-ring of the central unit $[\text{M}-288-152-\text{H}]^-$ (Table 1, Figure 3).

On the mechanism of fragmentation involving the QM cleavage, the localization of diglucoside on the superior unit of the deprotonated molecule was postulated based on a cleavage of the interflavonoidic ligation between the C-ring of the superior unit and the D-ring of the central unit (Figure 3). The evidence that the glucose is in the superior unit of the trimer is given by the ion m/z 885. This ion is the result of an elimination of the lower unit of catechin (G-I-rings), with consequent formation of the fragment in which superior unit is a diglucoside catechin (A, B and C-rings) and the lower unit containing a QM system (D-, E-, and F-rings). Such fragment is impossible to be released if the glucose is in the lower unit of the trimer.

Proanthocyanidins are exclusively constituted by equivalent units of (epi)catechins that present one interflavonoidic ligation, which are called procyanidins type B. Thus, the precursor ions of m/z 577, m/z 885, and m/z 1173 are indicative of the procyanidins type-B [27]. However, as in MS techniques, any differentiation was realized, as well as any information about the position and stereochemistry of the interflavonoidic ligation.

The oral administration of BuOH fraction and EtOAc fraction for 21 days attenuates the macroscopic colon injury caused by the TNBS. Both treatments were capable of diminishing the extension of the lesions, although only BuOH fraction provided significant changes in adhesion, extension of lesions, and score.

BuOH fraction and EtOAc fraction maintained the levels of GSH at physiological patterns, as well as the activity of

GSH-Px and Catalase; moreover, the GSH-Px activity was found increased in both treatments.

Only BuOH fraction exerts effects on the MPO activity and on lipid peroxidation in colonic tissue, reducing the MPO activity and TBARS levels.

The treatments were capable of modulating the levels of cytokines in inflamed colon, EtOAc fraction diminished the levels of proinflammatory cytokines TNF- α , IL6, and IL-12, and it also augmented IL-10 levels, an anti-inflammatory cytokine; BuOH fraction decreased the levels of TNF- α and IL12.

The treatments (BuOH fraction and EtOAc fraction) were not capable of decreasing the expression of COX-2 (Figure 4). COX-1 expression was found at physiological levels in all groups, except BuOH fraction treatment which showed an increased expression (Figure 4).

The representative histological evaluation shows normal colonic mucosa (Figure 5(a)) compared with colitic animals: nontreated (Figure 5(b)), BuOH fraction (Figure 5(c)), and EtOAc fraction (Figure 5(d)). Despite a nonquantitative analysis, it is remarkable that BuOH fraction presents the mucosa without marked reduction of inflammatory infiltrate.

6. Discussion

This study focused on the beneficial effects of the BuOH fraction and EtOAc fraction of the bark of *Rhizophora mangle* in TNBS-induced chronic colitis in rats. *R. mangle* has been studied in our laboratory in the recent years, and we have demonstrated its antiulcer [11] and antioxidant [8] effects in previous works. In the present work, we continued *R. mangle* study based on its benefits to treat gastrointestinal diseases; thus, we selected both fractions and the respective active doses (0.5 mg/Kg—BuOH fraction and 1.5 mg/Kg—EtOAc fraction) found in the previous studies cited.

Here, we showed the protective effects of both fractions in an experimental model of colitis, where the treatment with fractions of *R. mangle* results in the amelioration of the colonic mucosa injury (Table 2), the improvement of antioxidant contents (GSH) and enzymes (GSH-Px, catalase) as well as the modulation of inflammatory markers (MPO, TBARS, COX-1, and COX-2) and cytokines (TNF- α , IL-6, IL-12, and IL-12).

The fingerprint of the *R. mangle* acetone : water (7 : 3, v/v) extract and BuOH fraction and EtOAc fraction obtained by FIA-ESI-ITMS/MS corroborate with the first proposal of the presence of tannins from the polymerization of catechins.

The suggested fragmentations for ions of some identified molecules reveal the presence of proanthocyanidin and its possible derivatives O-glucoside. A more comprehensive discussion for another precursor ions was recently reported by our group [27] where the FIA-ESI-IT-MS analysis helped to solve the chemical composition of the phytopreparation complex. With this fingerprint of *R. mangle*, it is also possible to verify the similarity between the extract and the active fractions, probably by the presence of procyanidins.

The TNBS model of colitis induces a transmural lesion with pathological characteristics resembling human Crohn's

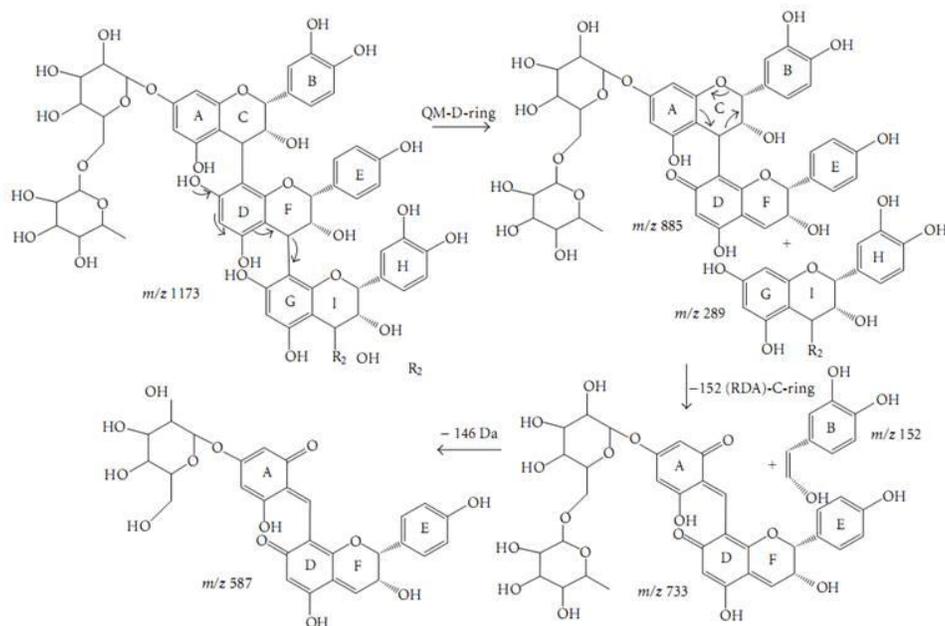


FIGURE 3: Main fragmentation pathways proposed of a trimer proanthocyanidin identified in the extract acetone: water (7 : 3, v/v) and BuOH fraction and EtOAc fraction from the barks of *R. mangle*. The mechanisms principal: RDA (retro-Diels-alder) and QM (quinone methide).

TABLE 2: Effects of BuOH fraction and EtOAc fraction on parameters observed in colon of rats submitted to colitis induced by TNBS.

Group	n	Score	Lesion (cm)	Weigh/length (mg/cm)	Adhesion	Diarrhea
Noncolitic	6	0***	0***	91.6 ± 2.5***	0***	0***
Colitic nontreated	10	9.2 ± 0.6	5.5 ± 0.8	225.6 ± 56.7	1.5 ± 0.5	1.0 ± 0.0
BuOH fraction 0.5 mg/Kg	10	8.1 ± 0.8*	4.3 ± 0.8*	217.8 ± 18.0	0.4 ± 0.6**	0.7 ± 0.4
EtOAc fraction 1.5 mg/Kg	9	8.3 ± 1.0	4.4 ± 1.3*	227.3 ± 40.2	1.0 ± 0.7	0.7 ± 0.4

Results are presented as mean ± SEM ANOVA followed by Dunnett's *t*-test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 significantly different from colitic nontreated.

disease; in this context and in order to evaluate the significance of the therapeutic use of the procyanidins from the bark of *Rhizophora mangle*, the protocol of TNBS-induced colitis in rats was used.

The production of proinflammatory cytokines, such as interleukin-6, interleukin-12, and tumor necrosis factor (TNF- α), is universally increased in patients with inflammatory bowel disease. Abnormalities of adaptive immunity that differentiate ulcerative colitis from Crohn's disease are defined by mucosal CD4+ T cells, which were initially divided in two lineages: Th1 and Th2 T cells. Crohn's disease is a Th1-like condition [3].

The characteristic inflammatory response begins with an infiltration of neutrophils and macrophages, which then

release chemokines and cytokines. Neutrophil infiltration into the inflamed mucosa is one of the most prominent histological features observed in IBD. Activated neutrophils produce reactive oxygen and nitrogen species within intestinal mucosa inducing an oxidative stress, which plays a significant role in the pathogenesis of IBD [28]. Regarding this knowledge, our results show that treatment with BuOH fraction, but not EtOAc fraction, decreased MPO activity (Table 4). This could be related to the lower injury found in this group, although this finding is linked to the evaluation of other ROS mediators, as shown in the following.

Inflammatory mediators, including reactive oxygen species (ROS) and cytokines, contribute to the inflammatory

TABLE 3: Effect of BuOH fraction and EtOAc fraction on colonic GSH level, GSH-Px, and catalase activities in TNBS-induced colitis in rats.

Group	Colon GSH levels ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein)	Colon GSH-Px activity ($\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein)	Colon CAT activity (U/mg of protein)
Noncolitic	8.320 \pm 1.720**	11.070 \pm 0.638*	17.510 \pm 3.198**
Colitic nontreated	1.028 \pm 1.026	4.472 \pm 0.409	1.459 \pm 1.082
BuOH fraction 0.5 mg/Kg	6.548 \pm 0.935*	11.620 \pm 0.869**	15.910 \pm 2.409**
EtOAc fraction 1.5 mg/Kg	6.706 \pm 1.969*	14.850 \pm 1.573***	15.660 \pm 3.380**

Results are presented as mean \pm SEM ANOVA followed by Dunnett's *t*-test, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 significantly different from colitic nontreated.

TABLE 4: Effect of BuOH fraction and EtOAc fraction on colonic MPO activity and TBARS levels in TNBS-induced colitis in rats.

Group	Colon MPO activity (U/mg of protein)	Colon TBARS levels (μmol TBARS/ mg of protein)
Noncolitic	0.642 \pm 0.061**	4.294 \pm 0.707**
Colitic nontreated	2.891 \pm 0.740	5.737 \pm 0.139
BuOH fraction 0.5 mg/Kg	0.896 \pm 0.102**	4.171 \pm 0.106***
EtOAc fraction 1.5 mg/Kg	2.264 \pm 0.429	7.218 \pm 0.776

Results are presented as mean \pm SEM ANOVA followed by Dunnett's *t*-test, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 significantly different from colitic nontreated.

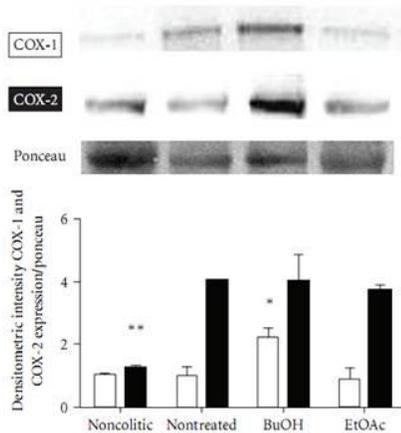


FIGURE 4: Effects of oral administration during 3 weeks of BuOH fraction and EtOAc fraction on COX-1 and COX-2 expression in colonic tissue of rats submitted to TNBS-induced colitis. Densitometry was made following normalization with ponceau. Results are presented as mean \pm SEM ANOVA followed by Dunnett's *t*-test, **P* < 0.05 and ***P* < 0.01 significantly different from nontreated.

cascade, modulating the immune response in IBD; TNF- α can activate oxidative stress-responsive genes which amplify and prolong inflammation [29]. Several studies have shown that ROS play an important role in the pathogenesis of IBD; excessive production of ROS in mucosal cells induces an immediate inflammatory immune response which directly or indirectly enhances the damage to intestinal epithelial cells, subsequently, harming the mucosal integrity, leading to severe injury in the gut [30, 31].

Oxidative stress and its consequent lipid peroxidation could aggravate free radical chain reactions, disrupt the integrity of the intestinal mucosal barrier, and activate inflammatory mediators. It has been shown that colonic CAT and GSH-Px activity and GSH levels are decreased while lipid peroxidation (TBARS levels) is increased in experimental and clinical studies [32, 33].

CAT, GSH-Px, and GSH, as primary defenses, could reduce the oxidative stress and the activation of inflammatory mediators; *R. mangle* acting as free radical scavenger could counteract the function of ROS and directly scavenge hydroxyl radicals and peroxy radical species [31]. In our study, compared with the noncolitic group, the activities of CAT and GSH-Px with GSH levels in colon tissues dwindled remarkably in the colitic nontreated group. Therapy with BuOH fraction or EtOAc fraction for 21 days resulted in a marked increase in CAT and GSH-Px activities (Table 3) in colon tissues; however, only BuOH fraction treatment was capable of reducing TBARS levels (Table 4). In addition, these treatments resulted in colonic GSH levels (Table 4) increase. Our results suggested that both BuOH fraction and EtOAc fraction inhibited oxidative stress induced by TNBS. The beneficial effects of these treatments are due, partly, to the antioxidant capacity of the compounds presented in its composition.

Recently, we published a study on the antioxidant effects of BuOH fraction in experimental models of gastric ulcer [8]; the study shows that BuOH fraction can protect the gastric mucosa through the enhancement of antioxidant mediators and enzymes, such as GSH, GSH-Px, GSH-Rd, SOD as well as diminishing MPO activity and lipid peroxidation. Thus, the previous results are in accordance with the present data regarding the different tissues and pathogenesis between the respective models.

The expression of COX-2, but not COX-1, is stimulated after the induction of colitis by TNBS [34], although Hyun

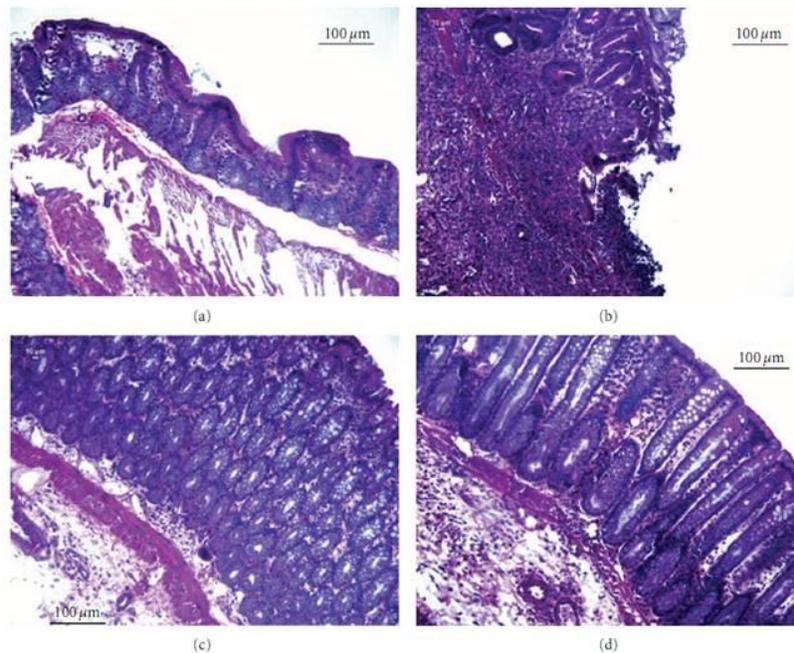


FIGURE 5: Histological slices of the colon from rats submitted to TNBS-induced colitis assay. HE staining shows comparison of the tissue architecture between treatments: (a) noncolitic, (b) colitic nontreated, (c) BuOH fraction, and (d) EtOAc fraction.

et al. [35] showed that in PAR_2 -deficient mice, COX-1 and COX-2 have their expression augmented after the induction of colitis by TNBS, and this was associated with a reduction in inflammation. Thus, during the development of colitis, both isoforms of COX could together exert an anti-inflammatory effect. For Reuter et al. [36], COX-1 and COX-2 have an active role in modulating the inflammatory process in various experimental models of colitis, since the administration of selective inhibitors of COX-1 or COX-2 in models of TNBS and DSS-induced colitis increased the severity of colitis and harmed the healing process. In this context, our results (Figure 4) suggest that BuOH fraction exerts its anti-inflammatory through a similar mechanism since the expression of both COX-1 and COX-2 was increased in this group, while EtOAc fraction presented similar levels of expression of these enzymes found in colitic nontreated group.

Cytokines are essential mediators of the interactions between activated immune cells and nonimmune cells, including epithelial and mesenchymal cells. The clinical efficacy of $TNF-\alpha$ clearly indicates that cytokines are one of the therapeutic targets of chronic inflammatory disorders such as IBD [37].

$TNF-\alpha$ is a major mediator of inflammation in the gut. It is synthesized by several cells including intestinal epithelial

cells but predominantly by cells of the monocytic line and T lymphocytes. $TNF-\alpha$ induces the expression of various genes; it has multiple biological effects such as increasing leukocyte recruitment, modulation of nitric oxide production, induction of proinflammatory cytokine secretion, and the proliferation and differentiation of immune cells [3].

Our results showed that both treatments BuOH fraction and EtOAc fraction provided downregulation of $TNF-\alpha$ levels (Table 5), suggesting that these compounds could act on the activation of this cytokine. Interestingly BuOH fraction and EtOAc fraction also decreased the levels of IL-12 (Table 5), which are linked to the suppression of $TNF-\alpha$; this fact may possibly explain this mechanism by which both treatments ameliorate the inflammation scenario. Anti-IL-12 or interferon- γ -specific antibodies antagonize the development of spontaneous IBD in IL-10-deficient mice, but only neutralization of IL-12 ameliorated the disease [4]. IL-12 blockade inhibits the generation of Th1 response and abrogates the production of the downstream cytokines (T-cell derived $TNF-\alpha$, IFN- γ , and IL-12 itself).

Overproduction of IL-12, a macrophage-derived cytokine, shifts the immune response in a Th-1 direction; this

TABLE 5: Effect of BuOH fraction and EtOAc fraction on colonic TNF- α , IL-6, IL12, and IL-10 levels in TNBS-induced colitis in rats.

Group	Colon TNF- α levels (pg/mg of protein)	Colon IL-6 levels (pg/mg of protein)	Colon IL-12 levels (pg/mg of protein)	Colon IL-10 levels (pg/mg of protein)
Noncolitic	357.3 \pm 20.7***	209.1 \pm 24.3***	12.7 \pm 1.9***	295.0 \pm 37.7***
Colitic nontreated	1381.0 \pm 227.5	807.3 \pm 45.5	28.5 \pm 2.4	120.4 \pm 4.3
BuOH fraction 0.5 mg/Kg	469.5 \pm 21.5***	719.1 \pm 17.4	16.72 \pm 1.0***	152.5 \pm 11.6
EtOAc fraction 1.5 mg/Kg	567.9 \pm 21.8***	615.4 \pm 54.4**	19.09 \pm 1.7**	252.1 \pm 19.3**

Results are presented as mean \pm SEM ANOVA followed by Dunnett's *t*-test, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 significantly different from colitic nontreated.

response is characterized by increased production of TNF- α and IL-6 resulting in a self-sustaining cycle of activation [38]. IL-6 is a pleiotropic cytokine that plays a crucial role in inflammation, immune regulation, hematopoiesis, and oncogenesis; there is growing evidence that an IL-6 signaling pathway plays a crucial part in the uncontrolled intestinal inflammatory process of IBD [39]. The evaluation of this proinflammatory cytokine revealed that EtOAc fraction decreased its level; however, BuOH fraction showed no effects on its levels.

These proinflammatory cytokines act on local cell populations to promote intracellular killing (superoxides, peroxides), enhance recruitment of other inflammatory cells, enhance secretion of chemoattractant cytokines (chemokines), and promote local tissue destruction [40]. Mucosal dendritic cells (DCs), in particular, have long been thought to promote tolerance in the gut. Expanding dendritic cells, including those present in the intestinal tissues, promote the ability to induce oral tolerance. Moreover, mucosal DCs residing in the lamina propria or Peyer's patches of the intestine appear to preferentially produce IL-10, rather than IL-12 [41].

IL-10 is secreted by a wide variety of cells and has pleiotropic effects on T cells, B cells, myeloid cells, and other cell types. IL-10 has suppressive anti-inflammatory activity on T cells, macrophages, and dendritic cells in humans, as well as in animal models of inflammatory diseases. Despite that IL-10 effectively treats colitis in mouse models and suppresses inflammatory cytokine production *in vivo* in intestinal cells from IBD patients [3], in diseases with a relative or absolute IL-10 deficiency, a persistent immune activation still exists [42]. Regarding the evaluation of IL-10 (Table 5), the treatments showed different responses again, while EtOAc fraction increased its level, and BuOH fraction showed no effect on IL-10 level.

This finding suggests that the main effect of the compounds of EtOAc fraction is likely to act on the activation of anti-inflammatory IL-10 and on the downregulation of IL-12, thus resulting in diminished levels of TNF- α and IL-6. On the other hand, the compounds present in BuOH fraction possibly exhibited their anti-inflammatory activity in this model by the regulation of cyclooxygenases as well as the activity and levels of ROS mediators, especially the lipid peroxidation (TBARS) and MPO which are also linked to neutrophil infiltration, thereby promoting healing changes during the inflammation caused by TNBS.

7. Conclusions

The compounds present in BuOH fraction and EtOAc fraction are predominantly proanthocyanidins and procyanidins; these compounds have shown interesting activities as mentioned previously. In this work, we provided, for the first time, the evaluation of these compounds from *R. mangle* barks on intestinal inflammation as a continuous study on the benefits of this medicinal plant regarding the gastrointestinal tract. Here, we showed a promising evaluation on anti-inflammatory and immune response of these compounds, and this study must be used for further studies to help explaining how these compounds lead to these subtle mechanisms such as activation of IL-10, COX-1, and other related cells and molecules.

On the structural elucidation of the compounds present in the bark of *R. mangle*, further studies must be continued by our research group, where the extract and active fractions will be fractionated by classic chromatographic methods for isolation of substances and identification by spectrometric methods, in trying to obtain a chemical marker for the extract.

Acknowledgment

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- [1] B. M. Fournier and C. A. Parkos, "The role of neutrophils during intestinal inflammation," *Mucosal Immunology*, vol. 5, no. 4, pp. 354–366, 2012.
- [2] S. Wirtz, C. Neufert, B. Weigmann, and M. F. Neurath, "Chemically induced mouse models of intestinal inflammation," *Nature Protocols*, vol. 2, no. 3, pp. 541–546, 2007.
- [3] S. Danese and C. Fiocchi, "Ulcerative colitis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 365, pp. 1713–1725, 2011.
- [4] R. J. Xavier and D. K. Podolsky, "Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease," *Nature*, vol. 448, no. 7152, pp. 427–434, 2007.
- [5] R. González, I. Ballester, R. López-Posadas et al., "Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 51, no. 4, pp. 331–362, 2011.
- [6] P. A. Abboud, P. W. Hake, T. J. Burroughs et al., "Therapeutic effect of epigallocatechin-3-gallate in a mouse model of

- colitis," *European Journal of Pharmacology*, vol. 579, no. 1–3, pp. 411–417, 2008.
- [7] L. M. S. Perera, D. Ruedas, and B. C. Gómez, "Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L.," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 77, no. 1, pp. 1–3, 2001.
- [8] F. M. de-Faria, A. C. A. Almeida, A. Luiz-Ferreira et al., "Antioxidant action of mangrove polyphenols against gastric damage induced by absolute ethanol and ischemia-reperfusion in the rat," *The Scientific World Journal*, vol. 2012, Article ID 327071, 9 pages, 2012.
- [9] B. Berenguer, L. M. Sánchez, A. Quílez et al., "Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 103, no. 2, pp. 194–200, 2006.
- [10] E. de Armas, Y. Sarracent, E. Marrero, O. Fernández, and C. Branford-White, "Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract (RMABE) in the treatment of aphthous ulcers: a pilot study," *Current Medical Research and Opinion*, vol. 21, no. 11, article 3057, pp. 1711–1715, 2005.
- [11] F. M. de-Faria, A. C. A. Almeida, A. Luiz-Ferreira et al., "Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L.," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 139, no. 1, pp. 234–243, 2012.
- [12] G. P. Morris, P. L. Beck, M. S. Herridge, W. T. Depew, M. R. Szewczuk, and J. L. Wallace, "Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon," *Gastroenterology*, vol. 96, no. 3, pp. 795–803, 1989.
- [13] E. Bailón, M. Comalada, J. Román et al., "UR-1505, a salicylate able to selectively block T-cell activation, shows intestinal anti-inflammatory activity in the chronic phase of the DSS model of rat colitis," *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 14, no. 7, pp. 888–897, 2008.
- [14] M. Vicario, M. Crespi, A. Franch, C. Amat, C. Pelegri, and M. Moretó, "Induction of colitis in young rats by dextran sulfate sodium," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 50, no. 1, pp. 143–150, 2005.
- [15] M. E. Anderson, "Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples," *Methods in Enzymology*, vol. 113, pp. 548–555, 1985.
- [16] T. Yoshikawa, Y. Naito, A. Kishi et al., "Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats," *Gut*, vol. 34, no. 6, pp. 732–737, 1993.
- [17] H. Aebi, "Catalase in vitro," *Methods in Enzymology*, vol. 105, pp. 121–126, 1984.
- [18] J. E. Krawisz, P. Sharon, and W. F. Stenson, "Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models," *Gastroenterology*, vol. 87, no. 6, pp. 1344–1350, 1984.
- [19] H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction," *Analytical Biochemistry*, vol. 95, no. 2, pp. 351–358, 1979.
- [20] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, 1976.
- [21] I. Romero-Calvo, B. Ocón, P. Martínez-Moya et al., "Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots," *Analytical Biochemistry*, vol. 401, no. 2, pp. 318–320, 2010.
- [22] A. C. H. F. Sawaya, D. M. Tomazela, I. B. S. Cunha et al., "Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis," *The Analyst*, vol. 129, no. 8, pp. 739–744, 2004.
- [23] L. Gu, M. A. Kelm, J. F. Hammerstone et al., "Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 38, no. 12, pp. 1272–1280, 2003.
- [24] W. Friedrich, A. Eberhardt, and R. Galensa, "Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry," *European Food Research and Technology*, vol. 211, no. 1, pp. 56–64, 2000.
- [25] T. Goto, Y. Yoshida, M. Kiso, and H. Nagashima, "Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea," *Journal of Chromatography A*, vol. 749, no. 1–2, pp. 295–299, 1996.
- [26] J. J. Dalluge, B. C. Nelson, J. B. Thomas, and L. C. Sander, "Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 793, no. 2, pp. 265–274, 1998.
- [27] C. M. Rodrigues, D. Rinaldo, L. C. dos Santos et al., "Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*," *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 21, no. 12, pp. 1907–1914, 2007.
- [28] M. S. da Silva, S. Sánchez-Fidalgo, E. Talero et al., "Anti-inflammatory intestinal activity of *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes in TNBS colitis model," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 128, no. 2, pp. 467–475, 2010.
- [29] H. Bartsch and J. Nair, "Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair," *Langenbeck's Archives of Surgery*, vol. 391, no. 5, pp. 499–510, 2006.
- [30] V. Chiurchiù and M. MacCarrone, "Chronic inflammatory disorders and their redox control: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 15, no. 9, pp. 2605–2641, 2011.
- [31] Y. H. Wang, X. L. Yang, L. Wang et al., "Effects of proanthocyanidins from grape seed on treatment of recurrent ulcerative colitis in rats," *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 88, no. 9, pp. 888–898, 2010.
- [32] B. G. Spyropoulos, E. P. Misiakos, C. Fotiadis, and C. N. Stoidis, "Antioxidant properties of probiotics and their protective effects in the pathogenesis of radiation-induced enteritis and colitis," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 56, no. 2, pp. 285–294, 2011.
- [33] F. Isik, T. Tunali Akbay, A. Yarat et al., "Protective effects of black cumin (*Nigella sativa*) oil on TNBS-induced experimental colitis in rats," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 56, no. 3, pp. 721–730, 2011.
- [34] L. Camacho-Barquero, I. Villegas, J. M. Sánchez-Calvo et al., "Curcumin, a *Curcuma longa* constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis," *International Immunopharmacology*, vol. 7, no. 3, pp. 333–342, 2007.
- [35] E. Hyun, P. Andrade-Gordon, M. Steinhoff, and N. Vergnolle, "Protease-activated receptor-2 activation: a major actor in intestinal inflammation," *Gut*, vol. 57, no. 9, pp. 1222–1229, 2008.
- [36] B. K. Reuter, S. Asfaha, A. Buret, K. A. Sharkey, and J. L. Wallace, "Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 98, no. 9, pp. 2076–2085, 1996.
- [37] A. Andoh, Y. Yagi, M. Shioya, A. Nishida, T. Tsujikawa, and Y. Fujiyama, "Mucosal cytokine network in inflammatory bowel

- disease," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 14, no. 33, pp. 5154–5161, 2008.
- [38] S. B. Hanauer, "Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities," *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 12, supplement 1, pp. S3–S9, 2006.
- [39] K. Mitsuyama, M. Sata, and S. Rose-John, "Interleukin-6 trans-signaling in inflammatory bowel disease," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 17, no. 6, pp. 451–461, 2006.
- [40] L. Mayer, "Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD," *Journal of Gastroenterology*, vol. 45, no. 1, pp. 9–16, 2010.
- [41] H. A. Arnett and J. L. Viney, "Gatekeepers of intestinal inflammation," *Inflammation Research*, vol. 59, no. 1, pp. 1–14, 2010.
- [42] R. Sabat, "IL-10 family of cytokines," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 21, no. 5, pp. 315–324, 2010.

9 Bibliografia

Abboud, P.A., Hake, P.W., Burroughs, T.J., Odoms, K., O'Connor, M., Mangeshkar, P., Wong, H.R., Zingarelli, B., 2008. Therapeutic effect of epigallocatechin-3-gallate in a mouse model of colitis. *Eur J Pharmacol* 579, 411-417.

Abraham, C., Cho, J.H., 2009. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 361, 2066-2078.

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121-126.

Ahluwalia, J.P., 2012. Immunotherapy in inflammatory bowel disease. *Med Clin North Am* 96, 525-544, x.

Alarcon-Aguilara, F.J., Roman-Ramos, R., Perez-Gutierrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C.C., Flores-Saenz, J.L., 1998. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *J Ethnopharmacol* 61, 101-110.

Anderson, M.E., 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 113, 548-555.

Andoh, A., Yagi, Y., Shioya, M., Nishida, A., Tsujikawa, T., Fujiyama, Y., 2008. Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14, 5154-5161.

Araki, Y., Sugihara, H., Hattori, T., 2006. The free radical scavengers edaravone and tempol suppress experimental dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Int J Mol Med* 17, 331-334.

Ardite, E., Sans, M., Panes, J., Romero, F.J., Pique, J.M., Fernandez-Checa, J.C., 2000. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. *Lab Invest* 80, 735-744.

Ardizzone, S., Bianchi Porro, G., 2002. Comparative tolerability of therapies for ulcerative colitis. *Drug Saf* 25, 561-582.

Arnett, H.A., Viney, J.L., 2010. Gatekeepers of intestinal inflammation. *Inflamm Res* 59, 1-14.

Atreya, I., Atreya, R., Neurath, M.F., 2008. Nf-kappab in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 263, 591-596.

Babbs, C.F., 1992. Oxygen radicals in ulcerative colitis. *Free Radic Biol Med* 13, 169-181.

Bach, J.F., 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 347, 911-920.

Bailon, E., Comalada, M., Roman, J., Michelena, P., Ramis, I., Merlos, M., Nieto, A., Concha, A., Zarzuelo, A., Galvez, J., 2008. Ur-1505, a salicylate able to selectively block t-cell activation,

shows intestinal anti-inflammatory activity in the chronic phase of the dss model of rat colitis. *Inflamm Bowel Dis* 14, 888-897.

Bartsch, H., Nair, J., 2006. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: Role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Arch Surg* 391, 499-510.

Baumgart, D.C., Targan, S.R., Dignass, A.U., Mayer, L., van Assche, G., Hommes, D.W., Hanauer, S.B., Mahadevan, U., Reinisch, W., Plevy, S.E., Salzberg, B.A., Buchman, A.L., Mechkov, G.M., Krastev, Z.A., Lowder, J.N., Frankel, M.B., Sandborn, W.J., 2010. Prospective randomized open-label multicenter phase i/ii dose escalation trial of visilizumab (hum291) in severe steroid-refractory ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 16, 620-629.

Becker, C., Wirtz, S., Blessing, M., Pirhonen, J., Strand, D., Bechthold, O., Frick, J., Galle, P.R., Autenrieth, I., Neurath, M.F., 2003. Constitutive p40 promoter activation and il-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest* 112, 693-706.

Becker, C., Wirtz, S., Ma, X., Blessing, M., Galle, P.R., Neurath, M.F., 2001. Regulation of il-12 p40 promoter activity in primary human monocytes: Roles of nf-kappab, ccaat/enhancer-binding protein beta, and pu.1 and identification of a novel repressor element (ga-12) that responds to il-4 and prostaglandin e(2). *J Immunol* 167, 2608-2618.

Berenguer, B., Sanchez, L.M., Quilez, A., Lopez-Barreiro, M., de Haro, O., Galvez, J., Martin, M.J., 2006. Protective and antioxidant effects of rhizophora mangle l. Against nsaid-induced gastric ulcers. *J Ethnopharmacol* 103, 194-200.

Bobin-Dubigeon, C., Collin, X., Grimaud, N., Robert, J.M., Le Baut, G., Petit, J.Y., 2001. Effects of tumour necrosis factor-alpha synthesis inhibitors on rat trinitrobenzene sulphonic acid-induced chronic colitis. *Eur J Pharmacol* 431, 103-110.

Bouguen, G., Chevaux, J.B., Peyrin-Biroulet, L., 2011. Recent advances in cytokines: Therapeutic implications for inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 17, 547-556.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Brand, S., 2009. Crohn's disease: Th1, th17 or both? The change of a paradigm: New immunological and genetic insights implicate th17 cells in the pathogenesis of crohn's disease. *Gut* 58, 1152-1167.

Bravo, L., 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56, 317-333.

Camacho-Barquero, L., Villegas, I., Sanchez-Calvo, J.M., Talero, E., Sanchez-Fidalgo, S., Motilva, V., Alarcon de la Lastra, C., 2007. Curcumin, a curcuma longa constituent, acts on mapk p38 pathway modulating cox-2 and inos expression in chronic experimental colitis. *Int Immunopharmacol* 7, 333-342.

Camara, R.J., Ziegler, R., Begre, S., Schoepfer, A.M., von Kanel, R., Swiss Inflammatory Bowel Disease Cohort Study, g., 2009. The role of psychological stress in inflammatory bowel disease: Quality assessment of methods of 18 prospective studies and suggestions for future research. *Digestion* 80, 129-139.

Chassaing, B., Darfeuille-Michaud, A., 2011. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, 1720-1728.

Chiurciu, V., Maccarrone, M., 2011. Chronic inflammatory disorders and their redox control: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 15, 2605-2641.

Cho, J.H., Abraham, C., 2007. Inflammatory bowel disease genetics: Nod2. *Annu Rev Med* 58, 401-416.

Cho, J.H., Brant, S.R., 2011. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 140, 1704-1712.

Chu, F.F., Esworthy, R.S., Doroshov, J.H., 2004. Role of se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med* 36, 1481-1495.

Consonni, S.R., Rosa, R.G., Nascimento, M.A.C., Vinagre, C.M., Toledo, O.M.S., Joazeiro, P.P., 2012. Recovery of the pubic symphysis on primiparous young and multiparous senescent mice at postpartum. *Histology and Histopathology* 27, 885-896.

Cornish, J.A., Tan, E., Simillis, C., Clark, S.K., Teare, J., Tekkis, P.P., 2008. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 103, 2394-2400.

Damman, C.J., Miller, S.I., Surawicz, C.M., Zisman, T.L., 2012. The microbiome and inflammatory bowel disease: Is there a therapeutic role for fecal microbiota transplantation? *Am J Gastroenterol* 107, 1452-1459.

Danese, S., Fiocchi, C., 2011. Ulcerative colitis. *N Engl J Med* 365, 1713-1725.

Danese, S., Sans, M., Fiocchi, C., 2004. Inflammatory bowel disease: The role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 3, 394-400.

de-Faria, F.M., Almeida, A.C., Luiz-Ferreira, A., Dunder, R.J., Takayama, C., da Silva, M.S., da Silva, M.A., Vilegas, W., Rozza, A.L., Pellizzon, C.H., Toma, W., Souza-Brito, A.R., 2012a. Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the rhizophora mangle l. J Ethnopharmacol 139, 234-243.

de-Faria, F.M., Almeida, A.C., Luiz-Ferreira, A., Takayama, C., Dunder, R.J., da Silva, M.A., Salvador, M.J., Abdelnur, P.V., Eberlin, M.N., Vilegas, W., Toma, W., Souza-Brito, A.R., 2012b. Antioxidant action of mangrove polyphenols against gastric damage induced by absolute ethanol and ischemia-reperfusion in the rat. ScientificWorldJournal 2012, 327071.

de Armas, E., Sarracent, Y., Marrero, E., Fernandez, O., Branford-White, C., 2005. Efficacy of rhizophora mangle aqueous bark extract (rmabe) in the treatment of aphthous ulcers: A pilot study. Curr Med Res Opin 21, 1711-1715.

de Faria, F.M., Luiz-Ferreira, A., Socca, E.A., de Almeida, A.C., Dunder, R.J., Manzo, L.P., da Silva, M.A., Vilegas, W., Rozza, A.L., Pellizzon, C.H., Dos Santos, L.C., Souza Brito, A.R., 2012. Effects of rhizophora mangle on experimental colitis induced by tnbs in rats. Evid Based Complement Alternat Med 2012, 753971.

Dolowschiak, T., Chassin, C., Ben Mkaddem, S., Fuchs, T.M., Weiss, S., Vandewalle, A., Hornef, M.W., 2010. Potentiation of epithelial innate host responses by intercellular communication. PLoS Pathog 6, e1001194.

Dryden, G.W., Song, M., McClain, C., 2006. Polyphenols and gastrointestinal diseases. Curr Opin Gastroenterol 22, 165-170.

Eksteen, B., Liaskou, E., Adams, D.H., 2008. Lymphocyte homing and its role in the pathogenesis of ibd. Inflamm Bowel Dis 14, 1298-1312.

Esworthy, R.S., Kim, B.W., Larson, G.P., Yip, M.L., Smith, D.D., Li, M., Chu, F.F., 2011. Colitis locus on chromosome 2 impacting the severity of early-onset disease in mice deficient in gpx1 and gpx2. Inflamm Bowel Dis 17, 1373-1386.

Esworthy, R.S., Kim, B.W., Rivas, G.E., Leto, T.L., Doroshov, J.H., Chu, F.F., 2012. Analysis of candidate colitis genes in the gdac1 locus of mice deficient in glutathione peroxidase-1 and -2. PLoS One 7, e44262.

Fang, X., Shao, L., Zhang, H., Wang, S., 2005. Chmis-c: A comprehensive herbal medicine information system for cancer. J Med Chem 48, 1481-1488.

Feagan, B.G., Greenberg, G.R., Wild, G., Fedorak, R.N., Pare, P., McDonald, J.W., Dube, R., Cohen, A., Steinhart, A.H., Landau, S., Aguzzi, R.A., Fox, I.H., Vandervoort, M.K., 2005. Treatment

of ulcerative colitis with a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. *N Engl J Med* 352, 2499-2507.

Fournier, B.M., Parkos, C.A., 2012. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* 5, 354-366.

Fukata, M., Michelsen, K.S., Eri, R., Thomas, L.S., Hu, B., Lukasek, K., Nast, C.C., Lechago, J., Xu, R., Naiki, Y., Soliman, A., Arditi, M., Abreu, M.T., 2005. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288, G1055-1065.

Fukunaga, K., Matsumoto, T., 2012. Current status and future perspectives of leukocytapheresis for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 27, 997-1003.

Gelbmann, C.M., Leeb, S.N., Vogl, D., Maendel, M., Herfarth, H., Scholmerich, J., Falk, W., Rogler, G., 2003. Inducible cd40 expression mediates nfkappab activation and cytokine secretion in human colonic fibroblasts. *Gut* 52, 1448-1456.

Ghosh, S., Goldin, E., Gordon, F.H., Malchow, H.A., Rask-Madsen, J., Rutgeerts, P., Vyhnaek, P., Zadorova, Z., Palmer, T., Donoghue, S., Natalizumab Pan-European Study, G., 2003. Natalizumab for active crohn's disease. *N Engl J Med* 348, 24-32.

Gonzalez-Lama, Y., Taxonera, C., Lopez-Sanroman, A., Perez-Calle, J.L., Bermejo, F., Pajares, R., McNicholl, A.G., Opio, V., Mendoza, J.L., Lopez, P., Algaba, A., Estelles, J., Barbero, A., Mendoza, J., Mate, J., Gisbert, J.P., Madrid Group for Study of Inflammatory Bowel, D., 2012. Methotrexate in inflammatory bowel disease: A multicenter retrospective study focused on long-term efficacy and safety. The madrid experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 24, 1086-1091.

Grassi, D., Lippi, C., Necozone, S., Desideri, G., Ferri, C., 2005. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *Am J Clin Nutr* 81, 611-614.

Grisham, M.B., Granger, D.N., 1988. Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci* 33, 6S-15S.

Grisham, M.B., Volkmer, C., Tso, P., Yamada, T., 1991. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. *Gastroenterology* 101, 540-547.

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

Haslam, E., 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *Journal of Natural Products* 59, 205-215.

Head, K.A., Jurenka, J.S., 2003. Inflammatory bowel disease part 1: Ulcerative colitis--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev* 8, 247-283.

Hyun, E., Andrade-Gordon, P., Steinhoff, M., Vergnolle, N., 2008. Protease-activated receptor-2 activation: A major actor in intestinal inflammation. *Gut* 57, 1222-1229.

Ichikawa, H., Okamoto, S., Kamada, N., Nagamoto, H., Kitazume, M.T., Kobayashi, T., Chinen, H., Hisamatsu, T., Hibi, T., 2008. Tetomilast suppressed production of proinflammatory cytokines from human monocytes and ameliorated chronic colitis in il-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 14, 1483-1490.

Ito, H., Takazoe, M., Fukuda, Y., Hibi, T., Kusugami, K., Andoh, A., Matsumoto, T., Yamamura, T., Azuma, J., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Shimoyama, T., Kishimoto, T., 2004. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active crohn's disease. *Gastroenterology* 126, 989-996; discussion 947.

Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., Lee, J.C., Schumm, L.P., Sharma, Y., Anderson, C.A., Essers, J., Mitrovic, M., Ning, K., Cleynen, I., Theatre, E., Spain, S.L., Raychaudhuri, S., Goyette, P., Wei, Z., Abraham, C., Achkar, J.P., Ahmad, T., Amininejad, L., Ananthakrishnan, A.N., Andersen, V., Andrews, J.M., Baidoo, L., Balschun, T., Bampton, P.A., Bitton, A., Boucher, G., Brand, S., Buning, C., Cohain, A., Cichon, S., D'Amato, M., De Jong, D., Devaney, K.L., Dubinsky, M., Edwards, C., Ellinghaus, D., Ferguson, L.R., Franchimont, D., Fransen, K., Geary, R., Georges, M., Gieger, C., Glas, J., Haritunians, T., Hart, A., Hawkey, C., Hedl, M., Hu, X., Karlsen, T.H., Kupcinskis, L., Kugathasan, S., Latiano, A., Laukens, D., Lawrance, I.C., Lees, C.W., Louis, E., Mahy, G., Mansfield, J., Morgan, A.R., Mowat, C., Newman, W., Palmieri, O., Ponsioen, C.Y., Potocnik, U., Prescott, N.J., Regueiro, M., Rotter, J.I., Russell, R.K., Sanderson, J.D., Sans, M., Satsangi, J., Schreiber, S., Simms, L.A., Sventoraityte, J., Targan, S.R., Taylor, K.D., Tremelling, M., Verspaget, H.W., De Vos, M., Wijmenga, C., Wilson, D.C., Winkelmann, J., Xavier, R.J., Zeissig, S., Zhang, B., Zhang, C.K., Zhao, H., International, I.B.D.G.C., Silverberg, M.S., Annesse, V., Hakonarson, H., Brant, S.R., Radford-Smith, G., Mathew, C.G., Rioux, J.D., Schadt, E.E., Daly, M.J., Franke, A., Parkes, M., Vermeire, S., Barrett, J.C., Cho, J.H., 2012. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491, 119-124.

Kaser, A., Blumberg, R.S., 2010. Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* 3, 11-16.

Kaser, A., Lee, A.H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., Blumberg, R.S., 2008. Xbp1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134, 743-756.

Kasran, A., Boon, L., Wortel, C.H., Hogezaand, R.A., Schreiber, S., Goldin, E., Boer, M., Geboes, K., Rutgeerts, P., Ceuppens, J.L., 2005. Safety and tolerability of antagonist anti-human cd40 mab ch5d12 in patients with moderate to severe crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 22, 111-122.

Ke, F., Yadav, P.K., Ju, L.Z., 2012. Herbal medicine in the treatment of ulcerative colitis. *Saudi J Gastroenterol* 18, 3-10.

Khan, K.J., Dubinsky, M.C., Ford, A.C., Ullman, T.A., Talley, N.J., Moayyedi, P., 2011. Efficacy of immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 106, 630-642.

Khor, B., Gardet, A., Xavier, R.J., 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 307-317.

Kiank, C., Tache, Y., Larauche, M., 2010. Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: Role of corticotropin-releasing factor receptors. *Brain Behav Immun* 24, 41-48.

Kim, Y.H., Kim, M.H., Kim, B.J., Kim, J.J., Chang, D.K., Son, H.J., Rhee, P.L., Rhee, J.C., 2009. Inhibition of cell proliferation and invasion in a human colon cancer cell line by 5-aminosalicylic acid. *Dig Liver Dis* 41, 328-337.

Klement, E., Cohen, R.V., Boxman, J., Joseph, A., Reif, S., 2004. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: A systematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 80, 1342-1352.

Kraaij, M.D., Savage, N.D., van der Kooij, S.W., Koekkoek, K., Wang, J., van den Berg, J.M., Ottenhoff, T.H., Kuijpers, T.W., Holmdahl, R., van Kooten, C., Gelderman, K.A., 2010. Induction of regulatory t cells by macrophages is dependent on production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17686-17691.

Krawisz, J.E., Sharon, P., Stenson, W.F., 1984. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87, 1344-1350.

Krishnan, A., Korzenik, J.R., 2002. Inflammatory bowel disease and environmental influences. *Gastroenterol Clin North Am* 31, 21-39.

Kroon, P.A., Clifford, M.N., Crozier, A., Day, A.J., Donovan, J.L., Manach, C., Williamson, G., 2004. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr* 80, 15-21.

Lakatos, P.L., 2009. Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: Have we made progress? *Dig Dis* 27, 215-225.

Lekakis, J., Rallidis, L.S., Andreadou, I., Vamvakou, G., Kazantzoglou, G., Magiatis, P., Skaltsounis, A.L., Kremastinos, D.T., 2005. Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 12, 596-600.

Lewis, K., McKay, D.M., 2009. Metabolic stress evokes decreases in epithelial barrier function. *Ann N Y Acad Sci* 1165, 327-337.

Li, D.L., Li, X.M., Peng, Z.Y., Wang, B.G., 2007. Flavanol derivatives from *rhizophora stylosa* and their dpph radical scavenging activity. *Molecules* 12, 1163-1169.

Lunney, P.C., Leong, R.W., 2012. Review article: Ulcerative colitis, smoking and nicotine therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 36, 997-1008.

Mahid, S.S., Minor, K.S., Soto, R.E., Hornung, C.A., Galandiuk, S., 2006. Smoking and inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 81, 1462-1471.

Marrero, E., Sanchez, J., de Armas, E., Escobar, A., Melchor, G., Abad, M.J., Bermejo, P., Villar, A.M., Megias, J., Alcaraz, M.J., 2006. Cox-2 and spla2 inhibitory activity of aqueous extract and polyphenols of *rhizophora mangle* (red mangrove). *Fitoterapia* 77, 313-315.

Martensson, J., Jain, A., Meister, A., 1990. Glutathione is required for intestinal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1715-1719.

Maunder, R.G., 2005. Evidence that stress contributes to inflammatory bowel disease: Evaluation, synthesis, and future directions. *Inflamm Bowel Dis* 11, 600-608.

Mayer, L., 2010. Evolving paradigms in the pathogenesis of ibd. *J Gastroenterol* 45, 9-16.

McDonald, J.W., Tsoulis, D.J., Macdonald, J.K., Feagan, B.G., 2012. Methotrexate for induction of remission in refractory crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 12, CD003459.

McGeachy, M.J., Cua, D.J., 2007. The link between il-23 and th17 cell-mediated immune pathologies. *Semin Immunol* 19, 372-376.

Melchor, G., Armenteros, M., Fernandez, O., Linares, E., Fragas, I., 2001. Antibacterial activity of rhizophora mangle bark. *Fitoterapia* 72, 689-691.

Mitsuyama, K., Sata, M., Rose-John, S., 2006. Interleukin-6 trans-signaling in inflammatory bowel disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 451-461.

Mochizuki, M., Hasegawa, N., 2010. (-)-epigallocatechin-3-gallate reduces experimental colon injury in rats by regulating macrophage and mast cell. *Phytother Res* 24 Suppl 1, S120-122.

Monteleone, G., Caprioli, F., 2008. Why are molecular mechanisms of immune activation important in ibd? *Inflamm Bowel Dis* 14 Suppl 2, S106-107.

Morgan, X.C., Tickle, T.L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K.L., Ward, D.V., Reyes, J.A., Shah, S.A., Leleiko, N., Snapper, S.B., Bousvaros, A., Korzenik, J., Sands, B.E., Xavier, R.J., Huttenhower, C., 2012. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol* 13, R79.

Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge, M.S., Depew, W.T., Szewczuk, M.R., Wallace, J.L., 1989. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96, 795-803.

Nakamura, T., Nagahori, M., Kanai, T., Watanabe, M., 2008. Current pharmacologic therapies and emerging alternatives in the treatment of ulcerative colitis. *Digestion* 77 Suppl 1, 36-41.

Neurath, M.F., Weigmann, B., Finotto, S., Glickman, J., Nieuwenhuis, E., Iijima, H., Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Mudter, J., Galle, P.R., Bhan, A., Autschbach, F., Sullivan, B.M., Szabo, S.J., Glimcher, L.H., Blumberg, R.S., 2002. The transcription factor t-bet regulates mucosal t cell activation in experimental colitis and crohn's disease. *J Exp Med* 195, 1129-1143.

Nielsen, O.H., Munck, L.K., 2007. Drug insight: Aminosalicylates for the treatment of ibd. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 4, 160-170.

Nielsen, O.H., Rogler, G., Hahnloser, D., Thomsen, O.O., 2009. Diagnosis and management of fistulizing crohn's disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 6, 92-106.

Nieto, N., Torres, M.I., Fernandez, M.I., Giron, M.D., Rios, A., Suarez, M.D., Gil, A., 2000. Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. *Dig Dis Sci* 45, 1820-1827.

Ningthoujam, S.S., Talukdar, A.D., Potsangbam, K.S., Choudhury, M.D., 2012. Challenges in developing medicinal plant databases for sharing ethnopharmacological knowledge. *J Ethnopharmacol* 141, 9-32.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351-358.

Okada, Y., Maeda, N., Takakura, S., Miyata, K., Koshiba, M., 2011. Tacrolimus ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: Implication of interferon-gamma and interleukin-1beta suppression. *Biol Pharm Bull* 34, 1823-1827.

Okuda, T., 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* 66, 2012-2031.

Ordas, I., Eckmann, L., Talamini, M., Baumgart, D.C., Sandborn, W.J., 2012. Ulcerative colitis. *Lancet* 380, 1606-1619.

Oz, H.S., Chen, T.S., McClain, C.J., de Villiers, W.J., 2005. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. *J Nutr Biochem* 16, 297-304.

Perera, L.M., Ruedas, D., Gomez, B.C., 2001. Gastric antiulcer effect of rhizophora mangle l. *J Ethnopharmacol* 77, 1-3.

Peyrin-Biroulet, L., Desreumaux, P., Sandborn, W.J., Colombel, J.F., 2008. Crohn's disease: Beyond antagonists of tumour necrosis factor. *Lancet* 372, 67-81.

Pithadia, A.B., Jain, S., 2011. Treatment of inflammatory bowel disease (ibd). *Pharmacol Rep* 63, 629-642.

Plevy, S., Salzberg, B., Van Assche, G., Regueiro, M., Hommes, D., Sandborn, W., Hanauer, S., Targan, S., Mayer, L., Mahadevan, U., Frankel, M., Lowder, J., 2007. A phase i study of visilizumab, a humanized anti-cd3 monoclonal antibody, in severe steroid-refractory ulcerative colitis. *Gastroenterology* 133, 1414-1422.

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouysegu, L., 2011. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 50, 586-621.

Rahim, A.A., Rocca, E., Steinmetz, J., Kassim, M.J., Ibrahim, M.S., Osman, H., 2008. Antioxidant activities of mangrove rhizophora apiculata bark extracts. *Food Chemistry* 107, 200-207.

Ray, K., 2012. Ibd: Lighting the way for steroid withdrawal in crohn's disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9, 366.

Reading, N.C., Kasper, D.L., 2011. The starting lineup: Key microbial players in intestinal immunity and homeostasis. *Front Microbiol* 2, 148.

Regueiro, M., Kip, K.E., Cheung, O., Hegazi, R.A., Plevy, S., 2005. Cigarette smoking and age at diagnosis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 11, 42-47.

Rodrigues, C.M., Rinaldo, D., dos Santos, L.C., Montoro, P., Piacente, S., Pizza, C., Hiruma-Lima, C.A., Brito, A.R., Vilegas, W., 2007. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *hancornia speciosa*. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21, 1907-1914.

Romero-Calvo, I., Ocon, B., Martinez-Moya, P., Suarez, M.D., Zarzuelo, A., Martinez-Augustin, O., de Medina, F.S., 2010. Reversible ponceau staining as a loading control alternative to actin in western blots. *Anal Biochem* 401, 318-320.

Round, J.L., Lee, S.M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T.A., Mazmanian, S.K., 2011. The toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science* 332, 974-977.

Ruano, J., Lopez-Miranda, J., Fuentes, F., Moreno, J.A., Bellido, C., Perez-Martinez, P., Lozano, A., Gomez, P., Jimenez, Y., Perez Jimenez, F., 2005. Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients. *J Am Coll Cardiol* 46, 1864-1868.

Rutgeerts, P., Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Reinisch, W., Olson, A., Johanss, J., Travers, S., Rachmilewitz, D., Hanauer, S.B., Lichtenstein, G.R., de Villiers, W.J., Present, D., Sands, B.E., Colombel, J.F., 2005. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 353, 2462-2476.

Sabat, R., 2010. Il-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 315-324.

Sakuraba, A., Motoya, S., Watanabe, K., Nishishita, M., Kanke, K., Matsui, T., Suzuki, Y., Oshima, T., Kunisaki, R., Matsumoto, T., Hanai, H., Fukunaga, K., Yoshimura, N., Chiba, T., Funakoshi, S., Aoyama, N., Andoh, A., Nakase, H., Mizuta, Y., Suzuki, R., Akamatsu, T., Iizuka, M., Ashida, T., Hibi, T., 2009. An open-label prospective randomized multicenter study shows very rapid remission of ulcerative colitis by intensive granulocyte and monocyte adsorptive apheresis as compared with routine weekly treatment. *Am J Gastroenterol* 104, 2990-2995.

Sanchez-Munoz, F., Dominguez-Lopez, A., Yamamoto-Furusho, J.K., 2008. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14, 4280-4288.

Sandborn, W.J., Colombel, J.F., Enns, R., Feagan, B.G., Hanauer, S.B., Lawrance, I.C., Panaccione, R., Sanders, M., Schreiber, S., Targan, S., van Deventer, S., Goldblum, R., Despaign, D., Hogge, G.S., Rutgeerts, P., International Efficacy of Natalizumab as Active Crohn's Therapy

Trial, G., Evaluation of Natalizumab as Continuous Therapy Trial, G., 2005. Natalizumab induction and maintenance therapy for crohn's disease. *N Engl J Med* 353, 1912-1925.

Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Fedorak, R.N., Scherl, E., Fleisher, M.R., Katz, S., Johanss, J., Blank, M., Rutgeerts, P., Ustekinumab Crohn's Disease Study, G., 2008. A randomized trial of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe crohn's disease. *Gastroenterology* 135, 1130-1141.

Sands, B.E., Sandborn, W.J., Feagan, B., Lofberg, R., Hibi, T., Wang, T., Gustofson, L.M., Wong, C.J., Vandervoort, M.K., Hanauer, S., Adacolumn Study, G., 2008. A randomized, double-blind, sham-controlled study of granulocyte/monocyte apheresis for active ulcerative colitis. *Gastroenterology* 135, 400-409.

Sawaya, A.C., Tomazela, D.M., Cunha, I.B., Bankova, V.S., Marcucci, M.C., Custodio, A.R., Eberlin, M.N., 2004. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst* 129, 739-744.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45, 287-306.

Scaldaferri, F., Fiocchi, C., 2007. Inflammatory bowel disease: Progress and current concepts of etiopathogenesis. *J Dig Dis* 8, 171-178.

Schrenk, D., 2009. Dietary fiber, low-molecular-weight food constituents and colo-rectal inflammation in animal models -- a review. *Mol Nutr Food Res* 53, 1281-1288.

Schroeder, B.O., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., Buchner, J., Schaller, M., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2011. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1. *Nature* 469, 419-423.

Shapiro, H., Singer, P., Halpern, Z., Bruck, R., 2007. Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and acute pancreatitis. *Gut* 56, 426-435.

Siggers, R.H., Hackam, D.J., 2011. The role of innate immune-stimulated epithelial apoptosis during gastrointestinal inflammatory diseases. *Cell Mol Life Sci* 68, 3623-3634.

Singh, H., Mahmud, S.M., Turner, D., Xue, L., Demers, A.A., Bernstein, C.N., 2009. Long-term use of statins and risk of colorectal cancer: A population-based study. *Am J Gastroenterol* 104, 3015-3023.

Soderholm, J.D., Perdue, M.H., 2001. Stress and gastrointestinal tract. Ii. Stress and intestinal barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G7-G13.

Sousa, W.P., Quek, S.P., Mitchell, B.J., 2003. Regeneration of rhizophora mangle in a caribbean mangrove forest: Interacting effects of canopy disturbance and a stem-boring beetle. *Oecologia* 137, 436-445.

Stagg, A.J., Hart, A.L., Knight, S.C., Kamm, M.A., 2003. The dendritic cell: Its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut* 52, 1522-1529.

Steinbrecher, K.A., Harmel-Laws, E., Sitcheran, R., Baldwin, A.S., 2008. Loss of epithelial rela results in deregulated intestinal proliferative/apoptotic homeostasis and susceptibility to inflammation. *J Immunol* 180, 2588-2599.

Takara, K., Kuniyoshi, A., Wada, K., Kinjyo, K., Iwasaki, H., 2008. Antioxidative flavan-3-ol glycosides from stems of rhizophora stylosa. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 72, 2191-2194.

Takeuchi, K., Smale, S., Premchand, P., Maiden, L., Sherwood, R., Thjodleifsson, B., Bjornsson, E., Bjarnason, I., 2006. Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4, 196-202.

Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-820.

Tham, D.M., Whitin, J.C., Cohen, H.J., 2002. Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. *Pediatr Res* 51, 641-646.

Thomas, A.G., Miller, V., Shenkin, A., Fell, G.S., Taylor, F., 1994. Selenium and glutathione peroxidase status in paediatric health and gastrointestinal disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 19, 213-219.

Timmer, A., McDonald, J.W., Tsoulis, D.J., Macdonald, J.K., 2012. Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 9, CD000478.

Toedter, G.P., Blank, M., Lang, Y., Chen, D., Sandborn, W.J., de Villiers, W.J., 2009. Relationship of c-reactive protein with clinical response after therapy with ustekinumab in crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 104, 2768-2773.

Van Assche, G., Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Salzberg, B.A., Silvers, D., Monroe, P.S., Pandak, W.M., Anderson, F.H., Valentine, J.F., Wild, G.E., Geenen, D.J., Sprague, R., Targan, S.R., Rutgeerts, P., Vexler, V., Young, D., Shames, R.S., 2006. Daclizumab, a humanised monoclonal antibody to the interleukin 2 receptor (cd25), for the treatment of moderately to severely

active ulcerative colitis: A randomised, double blind, placebo controlled, dose ranging trial. *Gut* 55, 1568-1574.

Veldhoen, M., Brucklacher-Waldert, V., 2012. Dietary influences on intestinal immunity. *Nat Rev Immunol* 12, 696-708.

Vicario, M., Crespi, M., Franch, A., Amat, C., Pelegri, C., Moreto, M., 2005. Induction of colitis in young rats by dextran sulfate sodium. *Dig Dis Sci* 50, 143-150.

Vijayavel, K., Anbuselvam, C., Balasubramanian, M.P., 2006. Free radical scavenging activity of the marine mangrove rhizophora apiculata bark extract with reference to naphthalene induced mitochondrial dysfunction. *Chem Biol Interact* 163, 170-175.

Vuorelaa, P., Leinonenb, M., Saikkuc, P., Tammela, P., Rauhad, J.P., Wennberge, T., Vuorela, H., 2004. Natural products in the process of finding new drug candidates. *Curr Med Chem* 11, 1375-1389.

Wang, Y.H., Ge, B., Yang, X.L., Zhai, J., Yang, L.N., Wang, X.X., Liu, X., Shi, J.C., Wu, Y.J., 2011. Proanthocyanidins from grape seeds modulates the nuclear factor-kappa b signal transduction pathways in rats with tnbs-induced recurrent ulcerative colitis. *Int Immunopharmacol* 11, 1620-1627.

Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., Neurath, M.F., 2007. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2, 541-546.

Wirtz, S., Neurath, M.F., 2000. Animal models of intestinal inflammation: New insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 15, 144-160.

Xavier, R.J., Podolsky, D.K., 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448, 427-434.

Yoshida, H., Russell, J., Senchenkova, E.Y., Almeida Paula, L.D., Granger, D.N., 2010. Interleukin-1beta mediates the extra-intestinal thrombosis associated with experimental colitis. *Am J Pathol* 177, 2774-2781.

Yoshikawa, T., Naito, Y., Kishi, A., Tomii, T., Kaneko, T., Iinuma, S., Ichikawa, H., Yasuda, M., Takahashi, S., Kondo, M., 1993. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut* 34, 732-737.

Yoshikawa, T., Takahashi, S., Kondo, M., 1992. Possible role of free radicals in the chronic inflammation of the gut. *EXS* 62, 353-358.

Yoshioka, Y., Akiyama, H., Nakano, M., Shoji, T., Kanda, T., Ohtake, Y., Takita, T., Matsuda, R., Maitani, T., 2008. Orally administered apple procyanidins protect against experimental inflammatory bowel disease in mice. *Int Immunopharmacol* 8, 1802-1807.