

**ALDA JUSCELINE LEONEL**

***Efeitos e Mecanismos de Ação da  
Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa  
Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano***

**Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2012**

ALDA JUSCELINE LEONEL

***Efeitos e Mecanismos de Ação da  
Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa  
Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências com ênfase em Imunologia.

**Orientadora:** Dra. Jacqueline I. Alvarez-Leite

**Co-orientadora:** Dra. Ana Maria Caetano de Faria

**Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais**

**2012**



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE ALDA JUSCELINE LEONEL** Aos dezesseis dias do mês de abril de 2012, às 9:00 horas reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Efeitos e mecanismo de ação da tributirina na proteção da colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrano”, requisito final para a obtenção do grau de *Doutor em Ciências: Imunologia*. Abrindo a sessão a Presidente da Comissão, Profa. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Dan Linetzky Waitzberg da Universidade de São Paulo, aprovada; Dr. Reinaldo Barreto Oriá da Universidade Federal do Ceará, aprovada; Dra. Maria de Lourdes Abreu Ferrari da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Jacques Robert Nicoli da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria, co-orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de abril de 2012.

Dr. Dan Linetzky Waitzberg – USP

Dr. Reinaldo Barreto Oriá – UFCE

Dra. Maria de Lourdes Abreu Ferrari – UFMG

Dr. Jacques Robert Nicoli – UFMG

Dra. Ana Maria Caetano de Faria – co-orientadora – UFMG

Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite – orientadora - UFMG

Profª Maria Elena de Lima Perez Garcia  
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

Carinhosamente dedico este trabalho a meus pais,  
**Edson e Alda**, meus incentivadores,  
pela presença constante e indispensável,  
por serem meus exemplos de vida, de amor,  
de fé, de dedicação. Sem vocês, eu nada seria.

## **Agradecimentos**

A Deus, pela dádiva da vida e pelas enormes e diárias bênçãos, por estar sempre comigo e me dar força para seguir em frente.

A CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

À professora Jacqueline, que tão carinhosamente me recebeu, apoiou-me e soube lidar com minhas limitações. Muito obrigada pela oportunidade, Jacque!

À professora Ana Maria, por toda a parte imunológica e por ter aberto seu laboratório para mim.

Aos membros da banca, professor Jacques Robert Nicoli, professora Maria de Lourdes Abreu Ferrari, professor Reinaldo Barreto Oriá e professor Dan Linetzky Waitzberg, pelo tempo dispensado a este trabalho e por todas as sugestões.

Ao Rafael e à Andrezza, dois anjos no meu doutorado, pela imensa ajuda e pela receptividade.

À professora Denise, por todo o tempo dispensado a este trabalho, pela parte histológica e pelas ótimas sugestões.

À Nathália, pela microscopia intravital.

Ao professor Valbert e à Rosana, pela ajuda na permeabilidade intestinal.

À Talita, por trilhar comigo o início do trabalho, aprendendo juntas as delícias e as dificuldades do trabalho com mucosa.

À Lílian, meu braço direito, por tudo! Tão essencial e tão eficiente tanto na bancada quanto na deliciosa amizade que construímos.

Ao Ed, meu amigo irmão, tantas vezes meu apoio nessa jornada, por sempre estar pronto a ouvir e pela paciência interminável, mesmo com tantas mulheres em TPM.

A toda a enorme e deliciosa família LABIN: Fah, Tati, Ceci, Sol, Lana, Gi, Rachel, Lu, Ju, Lorryne, Carmen, Pri, Marco, Rafa, Analina e aos respectivos agregados, pelas importantes discussões científicas e pelos não menos importantes momentos de distração.

À Maria Helena, nossa querida bioterista, por tratar tão bem dos nossos animais e tornar nosso trabalho mais fácil.

À Eneida, pela atenção e por ser sempre tão prestativa comigo.

À Celise, pela colaboração e atenção.

À Anita, minha amiga mais que querida, por toda a força e por termos superado tantas coisas juntas.

A minha amada família: Jacke, Denis, Denner, Edilaine, Tânia, Rafael, Gustavo, Vinícius e Laura, por sermos esta pequena "grande família". E, claro, a papai e mamãe, por tornar tantas coisas possíveis e por nos manter sempre unidos.

À vovó Maria, por sua preocupação e abençoadas orações. E a vovó Antônia, vovô João e vovô José, que também olham por mim.

A tio Mateus e tia Ana, pela força e ajuda essenciais, e pelo melhor almoço de domingo de BH!

Às minhas queridas da "ponte rodoviária" Capitólio-Viçosa-Campinas: Danúbia, Carol, Glau e Andrea, por contribuírem tanto com meu amadurecimento pessoal e profissional.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e para meu crescimento pessoal e acadêmico.

*"... Se em alguma atividade houver um empurrador  
de serviço, pode saber, não é um Leonel!..."*

Trecho do livro "Capit6lio em Prosa e Verso",  
Adil R. Alves e Sinval A. de Melo

## Sumário

Lista de Tabelas .....	XI
Lista de Figuras .....	XII
Lista de Abreviaturas .....	XV
Resumo .....	XIX
Abstract .....	XXI
Introdução .....	23
Revisão Bibliográfica .....	27
<i>Sistema Digestivo</i> .....	28
<i>Doenças Inflamatórias Intestinais</i> .....	30
<i>Indução de Colite Experimental</i> .....	36
<i>Ácidos Graxos de Cadeia Curta</i> .....	36
<i>Butirato</i> .....	39
<i>Tributirina</i> .....	45
Justificativa .....	47
Objetivos .....	49
<i>Objetivo Geral</i> .....	50
<i>Objetivos Específicos</i> .....	50
Material e Métodos .....	51
<i>Animais</i> .....	52
<i>Dieta e Soluções</i> .....	52
<i>Delineamento Experimental</i> .....	53
<i>Evolução Ponderal, Consumo Alimentar e Consumo Hídrico</i> .....	54
<i>Análise Histológica do Cólon</i> .....	54
<i>Análise da Permeabilidade Intestinal</i> .....	55
<i>Perfil Imunológico</i> .....	55
<i>Análise Indireta de Eosinófilos e Neutrófilos no Cólon</i> .....	55
<i>Análise do Perfil Leucocitário por Citometria de Fluxo</i> .....	57
<i>Contagem Total de Leucócitos no Sangue</i> .....	62
<i>Contagem Diferencial de Leucócitos no Sangue</i> .....	62
<i>Análise de Rolamento e Adesão Leucocitários no Cólon por</i>	
<i>Microscopia Intravital</i> .....	63
<i>Análise de Citocinas no Cólon por ELISA</i> .....	63

## Sumário (continuação)

<i>Análise de Estresse Oxidativo no Cólon</i> .....	64
<i>Avaliação da peroxidação lipídica por TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)</i> .....	64
<i>Dosagem da Concentração de Hidroperóxidos no Cólon</i> .....	65
<i>Dosagem da Atividade da Superóxido Dismutase no Cólon</i> .....	66
<i>Dosagem da Atividade da Catalase no Cólon</i> .....	67
<i>Dosagem de Proteína no Cólon</i> .....	67
<i>Avaliação da Ação da Tributirina Durante a Indução da Colite Experimental</i> .....	68
<i>Animais, Dieta, Soluções e Delineamento Experimental - 3 dias de DSS</i> .....	68
<i>Análises do Delineamento Experimental - 3 dias de DSS</i> .....	69
<i>Análise Estatística</i> .....	69
Resultados .....	70
<i>Consumo Alimentar e Consumo Hídrico</i> .....	71
<i>Variação Ponderal, Sangue Oculto nas Fezes e Comprimento do Cólon</i> .....	72
<i>Análise Histológica</i> .....	74
<i>Permeabilidade Intestinal</i> .....	77
<i>Perfil Imunológico</i> .....	78
<i>Análise Indireta de Eosinófilos e Neutrófilos no Cólon</i> .....	78
<i>Perfil Leucocitário na Lâmina Própria</i> .....	80
<i>Perfil Leucocitário no Linfonodo Cecal</i> .....	83
<i>Perfil Leucocitário no Baço</i> .....	86
<i>Contagem Total e Diferencial de Leucócitos no Sangue</i> .....	89
<i>Rolamento e Adesão Leucocitários no Cólon</i> .....	90
<i>Análise de Citocinas no Cólon</i> .....	91
<i>Análise de Estresse Oxidativo no Cólon</i> .....	93
<i>Avaliação da peroxidação lipídica por TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e Dosagem da Concentração de Hidroperóxidos</i> .....	94

## Sumário (continuação)

<i>Atividade da Enzima Superóxido Dismutase e Atividade da Enzima Catalase</i> .....	94
<i>Avaliação da Ação da Tributirina Durante a Indução da Colite Experimental</i> .....	96
<i>Consumo Alimentar e Consumo Hídrico</i> .....	96
<i>Variação Ponderal e Comprimento do Cólon</i> .....	96
<i>Análise Histológica</i> .....	98
<i>Análise Indireta de Eosinófilos e Neutrófilos no Cólon</i> .....	100
<i>Análise de Estresse Oxidativo no Cólon</i> .....	101
<i>Avaliação da peroxidação lipídica por TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e Dosagem da Concentração de Hidroperóxidos</i> .....	101
<i>Atividade da Enzima Superóxido Dismutase e Atividade da Enzima Catalase</i> .....	102
Discussão .....	104
Conclusão .....	113
Referências Bibliográficas .....	115
Anexos .....	128
<i>Anexo 1 - Protocolo de Aceitação do CETEA</i> .....	129
<i>Anexo 2 - Publicação Científica</i> .....	131
<i>Anexo 3 - Artigo Submetido para Publicação Científica</i> .....	139

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1 - Composição das dietas utilizadas .....	53
Tabela 2 - Leucograma do sangue .....	90

## Lista de Figuras

Figura 1 – Delineamento experimental .....	54
Figura 2 – Populações de linfócitos e de monócitos/macrófagos/célula dendrítica .....	59
Figura 3 – Delimitação dos quadrantes para análise dos marcadores CD11c e MOMA, dentro da população de monócitos/macrófagos/célula dendrítica .....	59
Figura 4 – Delimitação da marcação de MOMA positivo, dentro da população de monócitos/macrófagos/célula dendrítica e de CD80 positivo, dentro da população positiva para MOMA .....	60
Figura 5 – Delimitação da marcação de CD4 positivo e de CD19 positivo, ambos dentro da população de linfócitos .....	60
Figura 6 – Delimitação da marcação de CD44 positivo e da marcação de CD69 positivo, ambos dentro da população positiva para CD4 .....	61
Figura 7 – Delimitação da marcação de CD5 positivo e da marcação de CD21 positivo, ambos dentro da população positiva para CD19 .....	61
Figura 8 – Delimitação dos quadrantes para análise dos marcadores CD25 e LAP e dos marcadores CD25 e FOXP3, ambos dentro da população positiva para CD4 .....	62
Figura 9 – Delineamento experimental com três dias de DSS .....	68
Figura 10 – Consumo alimentar durante o experimento .....	71
Figura 11 – Consumo hídrico durante o experimento .....	72
Figura 12 – Variação ponderal durante o experimento .....	73
Figura 13 – Comprimento do cólon .....	74
Figura 14 – Aspecto morfológico do cólon .....	75
Figura 15 – Escore histopatológico total do cólon .....	76
Figura 16 – Itens usados no escore histopatológico do cólon .....	77
Figura 17 – Determinação da permeabilidade intestinal usando DTPA marcado com Tecnésio .....	78
Figura 18 – Análise indireta da presença de eosinófilos no cólon pela quantificação da atividade da enzima peroxidase de eosinófilos .....	79
Figura 19 – Análise indireta da presença de neutrófilos no cólon pela quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase .....	79

## Lista de Figuras (continuação)

Figura 20 – Porcentagem de células dendríticas, de monócitos e macrófagos e de macrófagos ativados na lâmina própria .....	80
Figura 21 – Porcentagem de linfócito B1 e de linfócitos B ativados na lâmina própria .....	81
Figura 22 – Porcentagem de linfócito T auxiliar de memória e de linfócito T auxiliar ativado na lâmina própria .....	82
Figura 23 – Porcentagem de linfócito T regulador na lâmina própria .....	83
Figura 24 – Porcentagem de célula dendrítica no linfonodo cecal .....	84
Figura 25 – Porcentagem de monócitos e macrófagos e de macrófagos ativados no linfonodo cecal .....	84
Figura 26 – Porcentagem de linfócitos B1 e de linfócitos B ativados no linfonodo cecal .....	85
Figura 27 – Porcentagem de linfócitos T auxiliar de memória e de linfócitos T auxiliar ativados no linfonodo cecal .....	85
Figura 28 – Porcentagem de linfócito T regulador no linfonodo cecal .....	86
Figura 29 – Porcentagem de células dendríticas, de monócitos e macrófagos e de macrófagos ativados no baço .....	87
Figura 30 – Porcentagem de linfócitos B1 e de linfócitos B ativados no baço .....	88
Figura 31 – Porcentagem de linfócitos T auxiliar de memória e de linfócitos T auxiliar ativados no baço .....	88
Figura 32 – Porcentagem de linfócito T regulador no baço .....	89
Figura 33 - Rolamento e adesão leucocitária no cólon .....	91
Figura 34 – Concentração das citocinas TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ no cólon .....	91
Figura 35 – Concentração das citocinas IL- 4, IL- 17 e IL- 1 $\beta$ no cólon .....	92
Figura 36 – Concentração das citocinas TGF- $\beta$ e IL- 10 no cólon .....	93
Figura 37 - Análise da peroxidação lipídica por TBARS e dosagem da concentração de hidroperóxidos no cólon .....	94
Figura 38 - Atividade da superóxido dismutase e da catalase no cólon .....	95
Figura 39 - Consumo alimentar e consumo hídrico com três dias de DSS .....	96
Figura 40 - Variação ponderal com três dias de DSS .....	97
Figura 41 – Comprimento do cólon com três dias de DSS .....	97
Figura 42 – Aspecto morfológico do cólon com três dias de DSS .....	98

## **Lista de Figuras (continuação)**

Figura 43 – Escore histopatológico total do cólon com três dias de DSS .....	99
Figura 44 – Itens usados no escore histopatológico do cólon com três dias de DSS .....	100
Figura 45 - Análise indireta da presença de eosinófilos e análise indireta da presença de neutrófilos no cólon com três dias de DSS .....	101
Figura 46 - Análise de TBARS e dosagem da concentração de hidroperóxidos no cólon com três dias de DSS .....	102
Figura 47 - Atividade da superóxido dismutase e atividade da catalase no cólon com três dias de DSS .....	102

## Lista de Siglas e Abreviaturas

µL: microlitro

µm: micrometro

µM: micromolar

<sup>99m</sup>Tc: tecnécio

Acetil-CoA: Acetil Coenzima A

AIN: American Institute of Nutrition

Ara-C: arabinosídeo citosina

ATP: adenosina trifosfato

BHT: hidroxitolueno butilado

C57BL/6 GFP para FOXP3: animais da linhagem C57BL/6 que apresentam o fator de transcrição FOXP3 marcado com a proteína fluorescente verde

CD: grupamento de diferenciação

CD11b: marcador de superfície celular para células dendríticas

CD11c: marcador de superfície celular para monócitos e macrófagos

CD18: marcador de superfície celular para monócitos e macrófagos

CD19: marcador de superfície celular para linfócitos B

CD21: marcador de superfície celular para ativação de linfócitos B

CD25: marcador de superfície celular para ativação de linfócitos T reguladores

CD4: marcador de superfície celular para linfócitos T

CD44: marcador de superfície celular para linfócitos T de memória

CD5: marcador de superfície celular para linfócitos B1

CD69: marcador de superfície celular para ativação de linfócitos T

CD80: marcador de superfície celular para ativação de macrófagos

CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal

cm: centímetro

CPM: contagem por minuto

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

DSS: sulfato de sódio dextrano

DTPA: ácido dietilenoaminopentacético

DVD: disco digital versátil

ECP: proteína catiônica eosinofílica

## Lista de Siglas e Abreviaturas (continuação)

EDN: neurotoxina derivada de eosinófilo

ELISA: ensaio imunoadsorvente ligado à enzima

EPO: peroxidase de eosinófilos

Fe<sup>2+</sup>: íon ferroso

Fe<sup>3+</sup>: íon férrico

FOX: solução de xilenol orange e sulfato ferroso

FOXP3: fator de transcrição da família *forkhead* expresso em linfócitos T reguladores

FSC: forward angle light scatter (tamanho celular)

g: grama

GBF: germinated barley foodstuff

GFP: proteína fluorescente verde

H: hidrogênio

H<sub>2</sub>O: água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico

HBSS: solução de sal tamponada de Hank

HCl: ácido clorídrico

HETAB: brometo de hexadeciltrimetilamônio

HOBr<sup>-</sup>: ácido hipobromoso

HOCl<sup>-</sup>: ácido hipocloroso

ICAM: molécula de adesão intercelular

IFN-γ: interferon gama

IgG1: imunoglobulina G1

IL-10: interleucina 10

IL-12: interleucina 12

IL-13: interleucina 13

IL-17: interleucina 17

IL-1β: interleucina 1 beta

IL-2: interleucina 2

IL-4: interleucina 4

IL-5: interleucina 5

## Lista de Siglas e Abreviaturas (continuação)

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

iNOS: óxido nítrico sintase indutível

kg: quilograma

L: litro

LAP: peptídeo associado a latência

LPS: lipopolissacarídeos

M: molar (mol por litro)

MadCAM-1: molécula 1 de adesão celular de adressina vascular da mucosa

MBP: proteína de base maior

MBq: megabecquerel

MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1

MDA: malondialdeído

meio IEL: meio para linfócitos intraepiteliais

mg: miligrama

mL: mililitro

mM: milimolar

mm<sup>3</sup>: milímetro cúbico

mmol: milimol

MOMA: marcador de superfície celular para monócitos e macrófagos

MPO: mieloperoxidase

MTT: brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium

N: normal

Na: sódio

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>: pertecnetato de sódio

NF-κB: fator nuclear kapa B

ng: nanograma

NKT: célula T natural killer

nm: nanômetro

nº: número

O<sub>2</sub>: oxigênio

## **Lista de Siglas e Abreviaturas (continuação)**

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: ânion superóxido

°C: grau centígrado

OPD: 1,2 diaminobenzeno, 1,2 fenilenodiamina

p: peso

PBS: solução salina tamponada com fosfato

pH: potencial de hidrogênio

pKa: constante de dissociação ácida

PTN: proteína

rpm: rotações por minuto

SOD: superóxido dismutase

SSC: side angle light scatter (granulosidade celular)

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBT: tributirina

TCA: ácido tricloroacético

TGF-β: fator de transformação e crescimento beta

Th1: células T secretoras do padrão 1 de citocinas

Th2: células T secretoras do padrão 2 de citocinas

Th3: células T secretoras do padrão 3 de citocinas

TMB: 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina

TNBS: ácido 2,4,6- trinitrobenzenosulfônico

TNF-α: fator de necrose tumoral alfa

TPP: trifenilfosfina

U: unidade

v: volume

VCAM: molécula de adesão da célula vascular

## Resumo

Tributirina é o triacilglicerol composto por três moléculas de ácido butírico que tem efeitos benéficos na saúde intestinal por sua ação trófica e efeitos anti-inflamatórios, pró-apoptóticos e anticancerígenos. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos e os possíveis mecanismos de ação da suplementação com tributirina na colite experimental induzida por sulfato de sódio dextrano. Para isso, camundongos receberam dieta padrão (controle) ou suplementada com tributirina (0,5%) durante dez ou quinze dias. A indução da colite ulcerativa foi feita pela administração de sulfato de sódio dextrano a partir do sétimo dia experimental, por três ou sete dias. Lesões na mucosa, percentual e ativação das células do sistema imunológico: eosinófilo, neutrófilo, macrófago, célula dendrítica, linfócitos B, linfócitos T auxiliar e linfócitos T reguladores, e concentração das citocinas TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-4, IL-17, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  e IL-10 foram determinadas por escore histológico, citometria de fluxo e ELISA, respectivamente. Por microscopia intravital foi analisado o rolamento e a adesão de leucócitos *in vivo*. O estresse oxidativo foi determinado pela concentração de hidroperóxido e pela atividade de superóxido dismutase e catalase.  $^{99m}\text{TcDTPA}$  (ácido dietilenoaminopentacético) foi utilizado como marcador de permeabilidade intestinal. Comparado com o grupo colite (não suplementado com tributirina), o grupo colite + TBT apresentou redução do dano da mucosa e dos infiltrados de neutrófilos e eosinófilos na mucosa associados à maior percentagem de células T reguladoras e das citocinas anti-inflamatórias TGF- $\beta$  e IL-10 na lâmina própria. A adesão de leucócitos na microvasculatura do cólon mostrou-se diminuída, *in vivo*, após a ingestão de tributirina. Menor concentração de hidroperóxidos e maior atividade de superóxido dismutase e de catalase foram associados à suplementação com tributirina. Animais do grupo colite + TBT mostraram redução da permeabilidade intestinal para níveis intermediários entre os grupos controle e colite. Além disso, com três dias de ingestão de sulfato de sódio dextrano, foi observada lesão da mucosa igual nos dois grupos com indução da colite e também aumento do infiltrado de neutrófilos, além do aumento do estresse oxidativo pelo aumento da concentração de hidroperóxidos e diminuição da atividade da catalase nesses dois grupos, mostrando que a tributirina leva à

melhora do quadro da doença pela modulação do estresse oxidativo e do infiltrado de neutrófilos. Em conclusão, nossos resultados sugerem que a tributirina administrada por via oral apresenta efeitos positivos na colite experimental, reestruturando a mucosa colônica por modular a resposta imune, aumentando concentração de citocinas anti-inflamatórias e população de células T reguladoras e diminuindo infiltrado de eosinófilos e neutrófilos, e por modular o estresse oxidativo, aumentando atividade de enzimas antioxidantes.

**Palavras-chave:** tributirina, butirato, colite experimental, inflamação, estresse oxidativo, citocinas.

## Abstract

Tributylin is the triacylglycerol composed by three molecules of butyric acid, which has beneficial effects in intestinal health due to its trophic, anti-inflammatory, pro-apoptotic and anti-carcinogenic effects. Our goal was to evaluate the efficacy and possible mechanisms of tributyrin supplementation in experimental colitis induced by dextran sodium sulfate. For that, mice received standard (control) or TBT-supplemented (0,5%) diets for ten or fifteen days. Colitis was induced by dextran sodium sulfate administration from the seventh experimental day, for three or seven days. Mucosa damage, percentage and activation of immune cells: eosinophil, neutrophil, macrophage, dendritic cell, B lymphocytes, helper T lymphocytes and regulatory T lymphocytes, and cytokine TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-4, IL-17, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  and IL-10 were determined by histological score, flow cytometry and ELISA, respectively. Intravital microscopy assessed the *in vivo* leukocyte rolling and adhesion. Oxidative stress was determined by hydroperoxide concentration and superoxide dismutase and catalase activities. <sup>99m</sup>TcDTPA (diethylenetriaminepentacetate acid) was used as marker of intestinal permeability. Compared to colitis group (non-supplemented), Colitis + TBT group presented reduced mucosal damage and neutrophil and eosinophil mucosa infiltrations associated with higher percentage of regulatory T cells and TGF- $\beta$  and IL-10 anti-inflammatory cytokines in the propria lamina. *In vivo* colon microvasculature leukocyte adhesion was decreased after tributyrin intake. Lower level of hydroperoxide and higher superoxide dismutase and catalase activities were associated with tributyrin supplementation. Colitis + TBT mice showed reduced intestinal permeability to levels between control and colitis groups. In addition, with three days intake dextran sodium sulfate, mucosal damage was observed equal in both groups with colitis induction, there was increased neutrophil infiltration, and increased oxidative stress by increasing the concentration of hydroperoxides and decreased activity catalase in these two groups, showing that tributyrin leads to improvement of the disease by modulation of oxidative stress and neutrophil infiltration. In conclusion, our results suggest that orally administered tributyrin has positive effects in experimental colitis, restructuring the colonic mucosa by modulating the immune response, increasing concentration of anti-inflammatory

cytokines and regulatory T cell population and decreasing infiltration of eosinophils and neutrophils, and by modulating oxidative stress by increasing activity of antioxidant enzymes.

**Keywords:** tributyrin, butyrate, experimental colitis, inflammation, oxidative stress, cytokines.

# Efeitos e Mecanismos de Ação da Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano

---

**Introdução**

### Introdução

Colite ulcerativa e doença de Crohn, dois tipos de doenças inflamatórias intestinais, são distúrbios complexos e de etiologia desconhecida (Haller, 2006). A primeira é tipicamente restrita ao cólon e afeta principalmente a mucosa, enquanto a segunda pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, da boca ao ânus, e é capaz de alterar a parede intestinal inteira (Marchesi et al., 2007).

A colite ulcerativa é um distúrbio úlcero-inflamatório crônico recidivante que começa invariavelmente no reto e se estende ao longo do cólon na direção retrógrada. Trata-se de uma doença em continuidade e tem como características a presença de dor abdominal e crises de diarreia mucoide sanguinolenta. Estes sintomas podem persistir por dias, semanas ou até meses e a seguir regredir, para recidivar após um intervalo assintomático de meses a anos ou até mesmo décadas (Cotran et al., 1996; Mahan & Escott-Stump, 2002; Spencer et al., 2007).

Histologicamente, a fase ativa da doença se caracteriza por abscessos das criptas e ulcerações que se estendem até a muscular, circundadas por proeminente infiltrado inflamatório. O processo inflamatório parece começar na profundidade das criptas e à medida que a doença se torna crônica ocorre a ruptura das criptas para dentro da lâmina própria e da submucosa levando à extensão lateral deste processo. Assim, a mucosa circundante é descolada e se descama, produzindo ulcerações (Cotran et al., 1996; Dianzani et al., 2006). Além da resposta imunológica, com infiltração de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos, as áreas de ulceração da mucosa demonstram aumento da apoptose das células epiteliais, que está correlacionada positivamente com a gravidade da doença (Spencer et al., 2007).

O butirato, um importante ácido graxo de cadeia curta, além de ser uma essencial fonte de energia para os colonócitos, também influencia várias funções celulares que afetam a saúde do cólon. O butirato apresenta efeitos anticarcinogênicos e anti-inflamatórios, pode alterar a barreira intestinal e tem papel na saciedade e no estresse oxidativo, além de ser considerado agente antidiarreico, uma vez que estimula a absorção de sódio e água. Este composto é produzido no intestino pela fermentação de fibras solúveis, e as

quantidades totais de butirato produzidas dependem do local de fermentação, da estrutura química do composto fermentável e da microbiota intestinal. A maioria do butirato presente no intestino é metabolizada pelo epitélio do cólon, resultando em baixas concentrações deste ácido graxo na circulação portal e sistêmica (Hallert et al., 2003; Menzel et al., 2004; Dianzani et al., 2006; Gassull, 2006; Hamer et al., 2008; Vieira et al., 2011).

Como o butirato é uma conhecida fonte energética dos colonócitos, a falta deste no lúmen ou a inabilidade de oxidação do butirato leva a deficiências nutricionais no epitélio colônico. Estas deficiências causam atrofia muscular a curto prazo e colite nutricional a longo prazo, além de numerosos defeitos celulares, maturação celular prejudicada, diminuição da síntese de muco e lipogênese, resultando em integridade alterada e conseqüentemente aumento da permeabilidade da membrana (Kinoshita et al., 2002). Em pacientes com colite ulcerativa ativa, uma capacidade diminuída da mucosa intestinal para oxidar butirato foi observada, enquanto que em pacientes com colite ulcerativa inativa esta capacidade estava normalizada, sugerindo que uma oxidação anormal de butirato não é um defeito primário na origem desta doença (Hamer et al., 2008).

Estudos anteriores em nosso laboratório mostraram que a administração oral de butirato, em modelo de colite experimental induzida por sulfato de sódio dextrano, melhorou a lesão colônica e o perfil inflamatório da mucosa e do linfonodo cecal, com a normalização do infiltrado de neutrófilo e eosinófilo e de linfócito B ativado e linfócito T auxiliar ativado (Vieira et al., 2011). Estes resultados destacam o uso potencial do butirato como adjuvante no tratamento da colite ulcerativa.

Apesar das vantagens do butirato, seu uso clínico é limitado por sua vida útil curta, metabolismo e excreção rápidos, além dos efeitos colaterais, tais como cefaleia, náusea e anorexia. Para superar estas desvantagens existem algumas alternativas, como a ingestão de tributirina, um triglicerídeo constituído por três moléculas de ácido butírico esterificadas ao glicerol, e ainda, por via oral, o uso de micropartículas de butirato que envolvem o composto até sua chegada no intestino, onde se dissolvem e liberam seu conteúdo no ambiente intestinal (Dianzani et al., 2006; Gassull, 2006; Hamer et al., 2008).

A tributirina, presente naturalmente em leite e derivados, poderia diminuir os efeitos indesejáveis observados com o butirato. Estudos mostram efeitos positivos com o uso deste nutriente, diminuindo migração leucocitária e produção de citocinas pró-inflamatórias, além de mostrar boa tolerabilidade em pacientes (Edelman *et al.*, 2003; Vinolo *et al.*, 2011). Apesar desses resultados positivos, estes estudos não testaram o efeito da tributirina em doenças inflamatórias intestinais, sendo necessária esta avaliação, uma vez que este nutriente pode ser um adjuvante no tratamento destas doenças intestinais.

# Efeitos e Mecanismos de Ação da Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano

---

**Revisão Bibliográfica**

### Revisão Bibliográfica

#### Sistema Digestivo

O sistema digestivo não é apenas um tubo por onde os alimentos passam e o que é soluto é absorvido e o que é sólido, eliminado, este conjunto de órgão é a mais profunda vinculação do organismo com o meio ambiente. Desta interação decorre a sobrevivência, pois é graças a ela que há processamento, registro e neutralização de substâncias estranhas que, desde o primeiro dia de vida entram em contato com o organismo (Madi *et al.*, 2001).

O sistema digestivo estende-se da boca ao ânus. As células que o revestem possuem um ciclo de vida variável, e o intestino delgado possui o menor ciclo de vida, que é de aproximadamente 3 a 5 dias antes de se desprenderem no lúmen. Estas células são completamente funcionais por pelo menos 2 a 3 dias, conforme migram das criptas para o terço distal das vilosidades (Mahan & Escott-Stump, 2002).

O tubo digestivo, ao longo de sua extensão, é organizado morfológicamente de maneira semelhante, sendo formado por uma camada mucosa especializada, uma camada submucosa, uma camada muscular e uma camada adventícia ou serosa (Gardner *et al.*, 1971; Cotran *et al.*, 1996).

A camada mais especializada e complexa de o todo tubo digestivo é a mucosa, que é formada por tecido epitelial de revestimento, glândulas e pela lâmina própria. As células epiteliais presentes nesta camada são diferentes em cada parte do sistema digestivo. Podem revestir vilosidades ou criptas, permitem uma absorção seletiva do material encontrado no lúmen intestinal, secretam produtos de maneira diferenciada como muco (células caliciformes) e imunoglobulinas, e expressam diversos marcadores celulares. Intrínsecas ao tecido epitelial, encontram-se células especializadas na defesa do organismo, como os linfócitos intraepiteliais e as células M. As células M funcionam como captadoras seletivas de macromoléculas, sendo também porta de entrada de microrganismos, uma vez que são desprovidas de glicocálix, o que permite a adesão de microrganismos. Estas células recobrem, principalmente, as placas de Peyer, que são aglomerados de nódulos linfóides na interface entre a camada mucosa e submucosa, sendo muito raras nos vilos. A lâmina própria,

por sua vez, é rica em células do sistema imune, como mastócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. A grande maioria das interações que ocorre entre o meio ambiente intestinal e o organismo acontece na camada mucosa (Cotran *et al.*, 1996).

Fazem parte do sistema digestivo: boca, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e ânus, além do pâncreas, do fígado e da vesícula biliar, responsáveis pela secreção de enzimas. O intestino delgado estende-se do piloro até a junção ileocecólica, onde se une ao intestino grosso. Compreende o duodeno, jejuno e íleo, e é um órgão indispensável, uma vez que é nele que o alimento é completamente digerido e absorvido (Gardner *et al.*, 1971).

O intestino grosso consiste do ceco e apêndice vermiforme, do cólon, composto por quatro partes (ascendente, transversa, descendente e sigmoide), do reto e do canal anal. É caracterizado por sua mobilidade, capacidade de distensão, pela disposição especial de sua musculatura e pelo tempo durante o qual consegue reter o seu conteúdo, sendo estas características diretamente relacionadas com algumas de suas funções, como a formação e o transporte das fezes (Gardner *et al.*, 1971). Microscopicamente, o cólon não possui vilosidades, a superfície absorptiva é plana e pontilhada por inúmeras criptas tubulares retas que se estendem para dentro da lâmina própria. As criptas são revestidas principalmente por células caliciformes e algumas células endócrinas. A superfície da mucosa é coberta em sua maior parte por células absorptivas e em suas superfícies luminiais apresentam microvilosidades, responsáveis pela absorção de água, ácidos graxos de cadeia curta, entre outros nutrientes. Dentro da mucosa estão espalhados focos linfoides cobertos por células ligeiramente achatadas capazes de engolfar e transferir os antígenos para as células do sistema imune subjacentes (Cotran *et al.*, 1996).

Antes do nascimento, o tubo digestivo é considerado estéril. A microbiota começa a ser formada a partir do nascimento, com os estímulos externos, principalmente a alimentação. O principal sítio da microbiota é o intestino grosso e estima-se que um total de  $10^{14}$  células fazem parte desta microbiota, o que a torna o maior órgão do corpo humano em termos de números celulares. Em condições normais, a microbiota é predominantemente anaeróbica e possui vários papéis fisiológicos, como indução da tolerância e

amadurecimento do sistema imunológico, desenvolvimento do epitélio intestinal, produção de substratos importantes por fermentação e controle da população aeróbica e patógenos intestinais, contribuindo para a manutenção da homeostase (Coombes *et al.*, 2005; Gassull, 2006).

### Doenças Inflamatórias Intestinais

As doenças inflamatórias intestinais, como a colite ulcerativa e a doença de Crohn, são doenças complexas e multifatoriais. As teorias sobre as origens destas doenças podem ser divididas em grupos: as que consideram o envolvimento de um agente infeccioso; as que acreditam que mecanismos imunológicos iniciam ou perpetuam a doença; e a que indica envolvimento de mecanismos psicossomáticos, genéticos, dietéticos, vasculares, traumáticos, hormonais, além da microbiota intestinal, uma vez que pacientes com doenças inflamatórias intestinais têm níveis diminuídos de bactérias responsáveis pela produção de ácidos graxos de cadeia curta. Apesar destas hipóteses, a causa das doenças inflamatórias intestinais continua desconhecida. Há um consenso de que principalmente fatores genéticos e ambientais estejam envolvidos na patogênese destas doenças, resultando em um desequilíbrio no balanço normal entre a microbiota intestinal, a integridade e função das células epiteliais intestinais e o sistema imunológico. Isto mostra que um único agente ou mecanismo isolado não é suficiente para desencadear a inflamação intestinal (Cotran *et al.*, 1996; Mahan & Escott-Stump, 2002; Hallert *et al.*, 2003; Dohi & Fujihashi, 2006; Marchesi *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008).

Evidências mostram que a quebra da tolerância oral, com papel essencial da microbiota, pode contribuir de modo importante para o desenvolvimento e perpetuação das doenças inflamatórias intestinais que tiveram início, muitas vezes, meses ou anos antes do seu diagnóstico. Esta constatação vem de estudos que mostram que camundongos nocautes para a citocina IL-10, modelo para o desenvolvimento da colite ulcerativa, quando mantidos em condição isentas de germes e com indução da doença por drogas como DSS e TNBS não desenvolvem a condição patológica (Garside *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 1999; Uhlig & Powrie, 2003; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004; Haller, 2006).

Alguns sinais e sintomas apresentados por pessoas com doenças inflamatórias intestinais são obstruções parciais do tubo digestivo, má absorção, aversões e associações alimentares, episódios de dor abdominal, diarreia, perda de peso entre vários outros (Cotran *et al.*, 1996; Hendrickson *et al.*, 2002; Mahan & Escott-Stump, 2002; Hallert *et al.*, 2003; Dohi & Fujihashi, 2006; Haller, 2006; Marchesi *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008).

As doenças inflamatórias intestinais aparecem em qualquer fase da vida, tendo alta incidência na população de origem caucasiana, com idade entre 15 e 35 anos (Mahan & Escott-Stump, 2002; Pallis *et al.*, 2002). Estudos epidemiológicos e familiares têm mostrado evidências de que fatores genéticos são importantes na determinação da suscetibilidade a estas doenças. A evidência mais forte vem de estudos com gêmeos; a razão de concordância de doença de Crohn reportada foi de 58% em gêmeos idênticos, enquanto que em gêmeos dizigóticos a concordância não foi significativamente diferente. Dados específicos de colite ulcerativa mostram uma concordância de 6 a 17% entre gêmeos homozigóticos e de 0 a 5% entre dizigóticos. Além disso, aproximadamente 15% a 30% dos pacientes acometidos têm histórico familiar destes distúrbios (Pallis *et al.*, 2002; Bouma & Strober, 2003; Loftus, 2004; Lakatos & Lakatos, 2007a; Xavier & Podolsky, 2007).

A prevalência de colite ulcerativa e doença de Crohn é de 10 a 200 casos por cem mil pessoas na América do Norte e a incidência é de 6 a 12 novos casos por cem mil habitantes para colite ulcerativa e 5 a 7 novos casos por cem mil habitantes para doença de Crohn (Andres & Friedman, 1999; Blumberg & Strober, 2001; Bouma & Strober, 2003). A prevalência na Europa é ainda maior, de 160 a 320 pacientes por cem mil habitantes, e a incidência é em torno de 16 novos casos por cem mil habitantes (Koutroubakis *et al.*, 1999; Pallis *et al.*, 2002). Ainda não existem dados que relatam incidência e prevalência no Brasil, sendo necessário que estudos nacionais sobre estas doenças inflamatórias intestinais sejam feitos.

O diagnóstico dos pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn é baseado em manifestações clínicas intestinais e extraintestinais. As manifestações extraintestinais, como exemplo a perda de peso, estão geralmente associadas à atividade intestinal e podem ocorrer antes ou simultaneamente às outras manifestações e/ou como efeito colateral do

tratamento farmacológico. Colite ulcerativa e doença de Crohn apresentam diferenças com relação às manifestações intestinais, e o impacto destas doenças sobre o sistema digestivo varia dependendo do local afetado, da natureza e da extensão da inflamação intestinal (Hendrickson *et al.*, 2002).

A incidência anatômica da doença de Crohn é variável, mas observa-se que o íleo terminal frequentemente é afetado. A inflamação pode ser transmural, estendendo-se da camada mucosa até a camada serosa, resultando em abscessos no tubo digestivo ou na formação de fístulas (Hendrickson *et al.*, 2002). A doença de Crohn, comparada a colite ulcerativa, possui sintomas clínicos mais sutis, e, conseqüentemente, um diagnóstico mais tardio. Quando a doença de Crohn afeta o cólon, sempre é menos intensa que a colite ulcerativa, com diarreia sem muco ou sangue, associada com pequenas cólicas abdominais durante a defecação (Lakatos & Lakatos, 2007b; Lakatos & Lakatos, 2007c).

A colite ulcerativa apresenta inflamação aguda e crônica da mucosa pela presença de um grande número de leucócitos, abscessos de cripta, distorção das glândulas da mucosa e depleção das células caliciformes (Hendrickson *et al.*, 2002; Shils *et al.*, 2006). A doença começa no reto e se estende pelo cólon, em graus variáveis e de modo contínuo, e afeta mucosa e submucosa colônica (Hendrickson *et al.*, 2002; Izcue *et al.*, 2006; Shils *et al.*, 2006). É muito comum a presença de sangue e muco nas fezes, acompanhado de cólicas intestinais, que se tornam intensas durante a passagem do bolo fecal. A colite ulcerativa possui diagnóstico mais rápido quando comparado à doença de Crohn por causa principalmente da presença de sangue nas fezes, que sugere algum tipo de transtorno gastrointestinal. Entre 25 e 40% dos pacientes que apresentam a forma grave da doença são submetidos à colectomia, e após oito anos do diagnóstico é feita vigilância colonoscópica para detecção de possíveis displasias (Hendrickson *et al.*, 2002; Lakatos & Lakatos, 2007c). Uma consequência da colite ulcerativa pode ser a desnutrição, já que a maioria dos pacientes adultos apresentam perda de peso exacerbada na fase aguda, e a incidência e a magnitude desta perda de peso variam com a gravidade da doença (Shils *et al.*, 2006).

A inflamação da mucosa resulta de ativação mediada por células T auxiliares do tipo 1 (Th1) ou do tipo 2 (Th2), que parecem estar associadas,

respectivamente, a doença de Crohn e colite ulcerativa. Na ativação mediada pelas células Th1, há secreção aumentada de IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , enquanto que na ativação Th2 há secreção aumentada de IL-4, IL-5 e IL-13. Na colite ulcerativa parece haver também grande quantidade da imunoglobulina IgG1 no plasma, colocalizada com o componente do complemento C3b, além de anticorpos de componentes perinucleares de neutrófilos (MacDonald *et al.*, 2000; Hendrickson *et al.*, 2002; Bouma & Strober, 2003; Lakatos & Lakatos, 2007c; Strober *et al.*, 2007). Alguns estudos mostram que colite ulcerativa pode ainda apresentar perfil inflamatório do tipo Th1, sugerindo que esta doença poderia ser tratada com anticorpos anti-IFN- $\gamma$  e anti-TNF- $\alpha$  (Powrie *et al.*, 1993; Asseman *et al.*, 1999; Coombes *et al.*, 2005; Izcue *et al.*, 2006).

Apesar dos estudos contraditórios, a resposta imunológica que gera a inflamação intestinal depende da natureza dos fatores que desencadearam a doença. É inegável a importância da microbiota e do sistema imunológico ligado à mucosa; o desequilíbrio desta interação imune pode promover o desenvolvimento da resposta imunológica celular contra proteínas bacterianas e aumento da atividade inflamatória com quebra da barreira intestinal, levando ao desenvolvimento da colite mediada por células Th1, induzida principalmente por macrófagos (Allison & Garboczi, 2002; Berg *et al.*, 2002). O desenvolvimento desta resposta permite a entrada destas proteínas bacterianas através da barreira epitelial por macrófagos e células dendríticas, que apresentam os antígenos às células T CD4, ativando a resposta pró-inflamatória em detrimento das células reguladoras (Th3 e células NK-T). Isto leva a liberação de citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . O TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  liberados pelas células T ativadas também agem sinergicamente, modificando a morfologia das células endoteliais dos vasos sanguíneos próximos ao sítio inflamatório, permitindo um aumento do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular, aumento da expressão de moléculas de adesão e maior migração de leucócitos, líquidos e proteínas ao sítio de infecção. O TNF- $\alpha$  também tem um papel chave na regulação da apoptose de células epiteliais intestinais, e acredita-se que a alta apoptose encontrada em colite ulcerativa esteja ligada ao aumento desta citocina (Marini *et al.*, 2003; Spencer *et al.*, 2007).

A ativação imune e do sistema vascular também é regulada por células nervosas do plexo mioentérico e de mediadores como a substância P. A

ativação do plexo mioentérico leva a degranulação de mastócitos e consequente quimiotaxia de leucócitos e produção de mediadores lipídicos. Uma das consequências desta resposta é o aumento do estresse oxidativo e a destruição tissular localizada, com perda da barreira epitelial intestinal, resultante da liberação de mediadores antimicrobianos, tais como radicais de oxigênio, óxido nítrico e proteases por macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (Janeway *et al.*, 2002).

Mastócitos, eosinófilos e neutrófilos também têm função importante no desenvolvimento da inflamação intestinal, mas o papel de cada uma destas células ainda não está completamente elucidado (Jeziorska *et al.*, 2001; Forbes *et al.*, 2004). Os neutrófilos chegam até a mucosa inflamada por mecanismos quimiotáticos, são as primeiras células a chegarem ao sítio inflamatório e têm um papel significativo na amplificação da inflamação e destruição tecidual. Estão em grande número na lâmina própria e nas criptas intestinais, onde formam micro-abscessos na colite ulcerativa pela liberação da enzima mieloperoxidase (Xavier & Podolsky, 2007). A mieloperoxidase catalisa reações de peróxido de hidrogênio com íon cloreto, produzindo ácido hipocloroso, que é utilizado para matar microrganismos, mas que também eleva o estresse oxidativo local, perpetuando lesão e inflamação (Aratani, 2006; Malle *et al.*, 2006; Naito *et al.*, 2007). Modelos de colite ulcerativa em camundongos usando drogas como DSS e TNBS são caracterizados pela grande migração de neutrófilos e eosinófilos ao sítio inflamatório (Elson *et al.*, 1995; Wirtz & Neurath, 2007).

O número aumentado de mastócitos e eosinófilos na mucosa inflamada está correlacionado à manutenção da resposta inflamatória local, uma vez que liberam mediadores do ácido araquidônico e enzimas proteolíticas (Resnick & Weller, 1993). Os mastócitos são responsáveis pela liberação de histamina e proteoglicanos, produção de mediadores lipídicos e início da transcrição, translocação e secreção de citocinas. Na colite ulcerativa, os eosinófilos geralmente representam um pequeno percentual de leucócitos infiltrados, mas sua detecção, mesmo que em pequenas quantidades, têm sido um indicador prognóstico negativo, pois, apesar de serem células residentes do tubo digestivo normal, em algumas doenças intestinais como gastroenterite eosinofílica, colite alérgica e refluxo gastroesofágico houve acúmulo de

eosinófilos na mucosa, intensificando a resposta inflamatória (Winter *et al.*, 1982; Keshavarzian *et al.*, 1985; Torpier *et al.*, 1988; Talley *et al.*, 1992; Odze *et al.*, 1995; Rothenberg *et al.*, 2001; Rothenberg, 2004). Além disso, foi observado número elevado destas células em biopsias de cólon de pacientes com colite ulcerativa, e este aumento estava correlacionado com a gravidade da doença e a disfunção gastrointestinal (Bischoff *et al.*, 1999; Saitoh *et al.*, 1999; Sangfelt *et al.*, 2001; Rothenberg, 2004).

Eosinófilos são células efetoras na disfunção e dano tissular através da liberação de mediadores lipídicos e grânulos protéicos tóxicos, como a proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), peroxidase de eosinófilos (EPO) e neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN). Acredita-se que o eosinófilo, juntamente com neutrófilo, seja uma das principais células efetoras na colite ulcerativa (Cara *et al.*, 2000; Rothenberg *et al.*, 2001; Rothenberg, 2004). A peroxidase de eosinófilos constitui cerca de 25% dos grânulos secretados por eosinófilos e catalisa a oxidação de várias moléculas resultando em espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Esta reação, juntamente com as reações da mieloperoxidase, acarreta estresse oxidativo que leva a morte celular tanto de microorganismos quanto de células colônicas, o que justifica o prognóstico negativo envolvido com estas células (Rothenberg *et al.*, 2001; Rothenberg, 2004; Naito *et al.*, 2007).

Na fase aguda da colite ulcerativa há migração de leucócitos do sangue para a mucosa intestinal, e este processo é marcado por alterações na seletividade da ligação de leucócitos aos vasos da mucosa e linfonodos periféricos. As moléculas de adesão presentes em maior número na mucosa intestinal inflamada são selectina E, integrinas  $\beta$ -2 (CD11b e CD11c/CD18), ICAM e VCAM. A expressão aumentada destas moléculas apresenta correlação positiva com a intensidade da inflamação, e neutralização destas leva a significativa diminuição da atividade inflamatória (Connor *et al.*, 1999; Menzel *et al.*, 2004). Outra molécula envolvida no recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório da mucosa é a MAdCAM-1; esta molécula é expressa, basicamente, na superfície endotelial de vênulas no intestino, em outras mucosas, e em placas de Peyer, e apresenta-se drasticamente aumentada na colite ulcerativa (Viney *et al.*, 1996; Connor *et al.*, 1999; Oshima *et al.*, 2001).

### *Indução de Colite Experimental*

A colite experimental pode ser estudada em vários modelos de camundongos. Esses modelos podem ser divididos em quatro grupos: colite espontânea como resultado de uma anormalidade genética que ocorre naturalmente, colite espontânea que ocorre em camundongos que foram modificados geneticamente, colite induzida por algum tipo de composto fornecido ao animal, como DSS e TNBS, e, por fim, colite induzida pela transferência de células regulatórias em hospedeiro gravemente linfopênico sem populações de células T (Bouma & Strober, 2003).

Na colite induzida por DSS são observados cólons menores, esplenomegalia, infiltração grave de células inflamatórias incluindo células plasmáticas, linfócitos e macrófagos. As lesões predominam no lado esquerdo do intestino grosso (nos cólons descendente e sigmóide) e no cólon transversal (Okayasu *et al.*, 1990). O mecanismo pelo qual o DSS induz a colite ainda é incerto, mas provavelmente é devido à função inapropriada de macrófagos, alterações das bactérias luminiais e efeitos tóxicos no epitélio do intestino. A introdução do DSS causa mudança na população da microbiota intestinal, notando-se aumento de bactérias gram-negativas anaeróbicas (Okayasu *et al.*, 1990).

A colite induzida por DSS apresenta manifestações clínicas semelhantes às aquelas apresentadas por pacientes com colite ulcerativa, tais como perda de peso, diarreia com sangue, encurtamento do cólon, dor abdominal e altas taxas de apoptose celular, mostrando ser um bom modelo para estudo desta doença (Blumberg *et al.*, 1999; Spencer *et al.*, 2007).

### Ácidos Graxos de Cadeia Curta

A homeostase do cólon está ligada à manutenção da saúde e redução dos riscos para o desenvolvimento de várias doenças, e melhoras na dieta e no estilo de vida ajudam na regulação desta. Assim, os estudos de fatores dietéticos emergentes ligados à melhora e manutenção da saúde do cólon têm sido evidenciados, como os probióticos, os prebióticos, as fibras e outros componentes da dieta que atuam no cólon, afetando seu ambiente, e,

consequentemente, alterando a produção de ácidos graxos de cadeia curta. Estes têm sido associados com a redução do risco para diversas doenças, incluindo a síndrome do intestino irritável, colite ulcerativa, doenças cardiovasculares e câncer (Wong *et al.*, 2006; Hamer *et al.*, 2008).

Ácidos graxos de cadeia curta, principalmente ácido acético, propiônico e butírico, são ácidos orgânicos produzidos dentro do lúmen intestinal por fermentação de fibras e de carboidratos não digeridos pela microbiota, mas também, em menor parte, de proteínas endógenas e da dieta. A fermentação de fibras e carboidratos, preferível pelas bactérias a proteínas, ocorre predominantemente no cólon proximal, enquanto a fermentação proteolítica predominantemente ocorre no cólon distal e leva à formação de vários metabólitos tóxicos, como amônia, fenóis e compostos contendo enxofre. Como o cólon distal é frequentemente acometido por graves desordens gastrointestinais, como colite ulcerativa e câncer, é possível que a produção destes metabólitos tóxicos, aliado a baixa disponibilidade de ácidos graxos de cadeia curta nesta área colônica, estejam envolvidas na patogênese destas doenças (Gassull, 2006; Hamer *et al.*, 2008).

Acetato, propionato e butirato representam aproximadamente 83% dos ácidos graxos de cadeia curta formados no cólon, e a produção destes varia de acordo com o número e a composição da microbiota, o tempo de trânsito intestinal, e a estrutura química do substrato disponível para fermentação (Rombeau & Kripke, 1990; Wong *et al.*, 2006; Hamer *et al.*, 2008). A fermentação de fibras solúveis, como oligofrutose, inulina, *psyllium*, farelo de aveia e goma guar, está associada à produção de elevadas quantidades de ácidos graxos de cadeia curta no lúmen intestinal. Já as fibras insolúveis têm baixo grau de fermentabilidade e estão mais associadas ao aumento da massa fecal e do trânsito intestinal (Nordgaard *et al.*, 1996; Márquez, 2003; Morrison *et al.*, 2006; Stewart & Slavin, 2006).

Os percentuais de concentração de acetato, propionato e butirato no lúmen intestinal são de, aproximadamente, 60:20:20, respectivamente. Entretanto, é difícil quantificar a produção local, principalmente de butirato, pois estima-se que 95% da produção deste composto sejam rapidamente absorvidos e metabolizados pelas células colônicas (Topping & Clifton, 2001; Ohkusa *et al.*, 2003; Hamer *et al.*, 2008).

Os ácidos graxos de cadeia curta são ácidos fracos com valores de pKa de 4,75 para acetato, 4,87 para propionato, e 4,81 para butirato, e podem ser encontrados sob a forma protonada (não-iônica) ou dissociada (ionizada). A proporção destes nas formas protonada ou dissociada é determinada pelo pH do meio, e, no cólon, como o pH está entre 6 e 8, a maior parte encontra-se na forma dissociada (Cook & Sellin, 1998; Oliveira & Gazzola, 2002). A protonação dos ácidos graxos de cadeia curta pode ocorrer por prótons presentes no lúmen do cólon ou pela atividade metabólica das bactérias (Ramos *et al.*, 1999). A forma protonada é lipossolúvel e difunde-se facilmente através da membrana celular (Saemann *et al.*, 2002a; Saemann *et al.*, 2002b). Por outro lado, a forma dissociada é transportada por troca iônica, mecanismo que envolve absorção dos ácidos graxos de cadeia curta e de íons sódio e excreção de íons bicarbonato (Velazquez *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1999; Saemann *et al.*, 2002a; Wong *et al.*, 2006; Kawamata *et al.*, 2007). Assim, o acúmulo de íons bicarbonato no lúmen intestinal é diretamente proporcional à absorção dos ácidos graxos de cadeia curta (Oliveira & Gazzola, 2002).

Além do sódio, os ácidos graxos de cadeia curta promovem também a absorção de potássio e água, o que confere a eles considerável efeito anti-secretório (Roediger, 1994). Estudos experimentais indicam que redução da concentração de ácidos graxos de cadeia curta no ambiente intestinal está relacionada a quadros de diarreia. Em concordância, a infusão destes ou de butirato isoladamente pode aumentar significativamente a absorção de sódio e água em colonócitos (Parsons & Paterson, 1965; Ruppin *et al.*, 1980; Roediger & Moore, 1981; Krishnan *et al.*, 1999). Em humanos o mesmo efeito já foi observado, em estudo que mostrou que o suprimento luminal de ácidos graxos de cadeia curta restaurou a absorção aquosa em pacientes com diarreia (Ramakrishna & Mathan, 1993). Na síndrome do intestino curto, em que pode haver perda considerável de água e sódio, o efeito antidiarreico dos ácidos graxos de cadeia curta pode ter importância clínica, promovendo melhora dos quadros de diarreia e diminuindo a necessidade de reposição endovenosa de eletrólitos (Nightingale *et al.*, 1992; Scheppach *et al.*, 1992b; Hove & Mortensen, 1995). Isto ocorre porque intestino delgado e cólon possuem a função de absorção de íons sódio, gerando um gasto de ATP, mas na presença dos ácidos graxos de cadeia curta esta absorção é estimulada. A

presença intracelular de butirato aumenta os níveis de gás carbônico, que subsequentemente suprem o número de prótons para a absorção de sódio pelo canal iônico  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  na superfície do epitélio (Saemann *et al.*, 2002a). Dados sugerem que a cada 10mmol de ácidos graxos de cadeia curta são absorvidos cerca de 40mmol de sódio e 360 mililitros de água (Ruppin *et al.*, 1980; Márquez, 2003).

No cólon, as fibras dietéticas são degradadas pelas bactérias em pentoses e hexoses e então em ácidos graxos de cadeia curta. As pentoses são convertidas em hexose e triose fosfato no ciclo das pentoses. Pela via glicolítica, as hexoses são metabolizadas até a formação de piruvato. O piruvato pode gerar propionato pela via succinato, ou gerar acetato e butirato pela formação de acetil-CoA (Duncan *et al.*, 2002; Nelson & Cox, 2002).

Acetato, propionato e butirato são absorvidos em taxas semelhantes em diferentes regiões do cólon. Uma vez absorvidos, são metabolizados em três grandes sítios no organismo: nas células epiteliais do ceco e cólon, que utilizam o butirato como principal substrato energético e de manutenção; células do fígado que metabolizam o butirato residual juntamente com o propionato na via de gliconeogênese e 50 a 70% do acetato; e células musculares, que geram energia através da oxidação do acetato residual (Márquez, 2003; Roberfroid, 2005; Wong *et al.*, 2006). Assim, o butirato é praticamente todo oxidado na mucosa do cólon, e o acetato e o propionato são utilizados pelo organismo como substrato energético em diferentes sítios, sendo o propionato usado principalmente pelo fígado na gliconeogênese, e o acetato na lipogênese, atingindo também tecidos periféricos (Márquez, 2003).

### *Butirato*

Dentre os ácidos graxos de cadeia curta, o ácido butírico é o mais importante no metabolismo do colonócito, visto que cerca de 95% do butirato produzido é metabolizado pelo mesmo. A ordem de utilização de combustíveis respiratórios pelo colonócito é butirato > acetoacetato > glutamina > glicose (Ramos *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2006; Hamer *et al.*, 2008). Já na década de 80 a oxidação do butirato foi demonstrada utilizando suspensões de colonócitos humanos e murinos, e, após absorvido, o butirato é rapidamente

oxidado e convertido a corpos cetônicos, como o acetoacetato e o  $\beta$ -hidroxibutirato, envolvidos com a síntese de ATP (Roediger, 1980). O metabolismo do butirato pode também ativar proteinases específicas, promovendo o trofismo celular pela geração, através da acetil-CoA, do mevalonato, que atua na via da biossíntese do colesterol e na ativação da proteína G (Márquez, 2003). Defeitos no metabolismo do butirato podem estar envolvidos na patogênese da colite ulcerativa, pois colonócitos de pacientes com esta doença oxidam menos butirato que colonócitos sem anormalidades na mucosa (Ohkusa *et al.*, 2003).

Além de ser uma importante fonte de energia para os colonócitos, o butirato também influencia várias funções celulares que afetam a saúde do cólon. Possui efeitos anticarcinogênicos e anti-inflamatórios, pode alterar a barreira intestinal e tem um papel na saciedade e no estresse oxidativo (Pomare *et al.*, 1985; Jankowski *et al.*, 1994; Hallert *et al.*, 2003; Menzel *et al.*, 2004; Dianzani *et al.*, 2006; Gassull, 2006; Hamer *et al.*, 2008).

Um dos efeitos propostos para o butirato é a prevenção e inibição de câncer de cólon; exposição *in vitro* de linhagens de células tumorigênicas a butirato leva a efeitos anticarcinogênicos pela indução da apoptose celular, inibição da proliferação e promoção de fenótipos mais diferenciados, ao contrário do seu efeito em células intestinais saudáveis ou naquelas de modelos de inflamação (Heerdt *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1997; Velazquez *et al.*, 1997; Velazquez & Rombeau, 1997; Ramos *et al.*, 1999; Hallert *et al.*, 2003; Ohkusa *et al.*, 2003; Menzel *et al.*, 2004; Hamer *et al.*, 2008).

Butirato também potencializa a ação de agentes quimioterápicos. Tratamento de linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda com este nutriente sinergicamente aumentou os efeitos citotóxicos de antineoplásicos como o Ara-C e o etoposídeo, resultando em redução significativa da proliferação celular (Ramos *et al.*, 2004; dos Santos *et al.*, 2009).

Esta propriedade anticarcinogênica se deve, principalmente, à capacidade de hiperacetilação de histonas exercida por este nutriente (Archer & Hodin, 1999; Chai *et al.*, 2000; Mandal *et al.*, 2001). Estudos *in vitro* mostram que o butirato pode inibir a enzima histona desacetilase, o que torna as histonas mais acetiladas, afetando a organização da cromatina. Isso permite que o DNA se torne mais acessível a fatores de transcrição responsáveis por

ativar genes específicos para a apoptose (Davie, 1997; Koyama *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2002; Saemann *et al.*, 2002a). O tratamento de linhagens celulares de câncer de cólon com butirato levou a significativa hiperacetilação das histonas H3 e H4, além da maior expressão gênica de p21, proteína que exerce atividade supressora em células tumorais (Hinnebusch *et al.*, 2002; Sanderson, 2007).

O efeito paradoxal do butirato nas células normais e neoplásicas pode ser explicado pelos diferentes perfis metabólicos dessas células. As células neoplásicas não utilizam o butirato como combustível energético, preferindo outros substratos, como a glicose. Este mecanismo permite que este nutriente possa agir preferencialmente sobre a regulação da expressão gênica, induzindo apoptose nestas células com ciclo celular anormal (Ramos *et al.*, 1999; Andriamihaja *et al.*, 2008).

Butirato também afeta componentes da barreira de defesa colônica, garantindo proteção contra antígenos do lúmen, pela regulação da expressão de genes e enzimas. O butirato, a baixas concentrações, induz diminuição na permeabilidade intestinal, relacionada com a expressão de proteínas responsáveis pela junção celular, mas a altas concentrações, ao contrário, esse composto parece aumentar esta permeabilidade (Kinoshita *et al.*, 2002; Menzel *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2007; Hamer *et al.*, 2008). Este ácido graxo também evita translocação bacteriana, levando a proteção contra *Campylobacter jejuni* (Van Deun *et al.*, 2008).

Estudos mostram efeito do butirato no aumento da síntese de mucina e também na maior expressão de tff3, gene responsável pela síntese de fatores trefoils, que são peptídeos constituintes do muco (Finnie *et al.*, 1995; Barcelo *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2006).

Muitos estudos indicam que metabólitos bacterianos, como o butirato, podem afetar a resposta imune do hospedeiro, exercendo atividade imunomodulatória (Hond *et al.*, 1998; Saemann *et al.*, 2000; Saemann *et al.*, 2002a; Ohkusa *et al.*, 2003; Kanauchi *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2007).

Butirato pode exercer uma atividade anti-inflamatória através da inibição da produção e/ou sinalização de IFN- $\gamma$  e da diminuição da expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, iNOS e de metaloproteinasas. Além disso, aumenta a expressão de IL-10 em monócitos humanos (Wachtershauser *et al.*, 2000;

Kanufre, 2002; Kinoshita *et al.*, 2002; Hallert *et al.*, 2003; Menzel *et al.*, 2004; Dubuquoy *et al.*, 2006; Gassull, 2006; Hamer *et al.*, 2008). Butirato também tem múltiplos efeitos em leucócitos, particularmente em células polimorfonucleares, alterando o pH citoplasmático, a concentração de cálcio, o metabolismo do oxigênio, a fagocitose, a proliferação celular e a distribuição de actina dentro da célula (Dianzani *et al.*, 2006; Vinolo *et al.*, 2011).

Dentre os mecanismos propostos para a ação imune do butirato a supressão do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) é a mais estudada. O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição que controla a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, enzimas indutoras da inflamação, moléculas de adesão, fatores de crescimento, algumas proteínas de fase aguda e receptores imunes (Wu *et al.*, 1999; Inan *et al.*, 2000; Segain *et al.*, 2000; Place *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006; Sanderson, 2007; Kumar *et al.*, 2009). Em condições fisiológicas, o NF- $\kappa$ B é regulado através da ligação de moléculas inibidoras conhecidas como I $\kappa$ B. Várias são as I $\kappa$ B, sendo as principais I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$ , I $\kappa$ B- $\epsilon$ , p105 e p100. A ativação deste fator de transcrição requer uma fosforilação dependente de ubiquitinação com subsequente degradação, no proteassoma, de uma ou mais moléculas de I $\kappa$ B. A estimulação e ativação celular resulta na fosforilação da subunidade I $\kappa$ B, pela enzima I $\kappa$ B- $\beta$ -cinase, que leva a ativação do NF- $\kappa$ B que se transloca para o núcleo, ativando a expressão de múltiplos genes pró-inflamatórios (Baeuerle, 1998; Crinelli *et al.*, 1999; Hatakeyama *et al.*, 1999).

Estudos demonstram que o butirato pode modular a atividade do NF- $\kappa$ B em diferentes tipos celulares, incluindo linhagens de células cancerosas, células isoladas da lâmina própria do cólon, macrófagos, neutrófilos e monócitos (Wu *et al.*, 1999; Chakravorty *et al.*, 2000; Segain *et al.*, 2000). A habilidade do butirato em modular a atividade do NF- $\kappa$ B está relacionada ao seu potencial em inibir as proteínas desacetilases, em ação semelhante à observada com a histona desacetilase, inibindo a ativação deste fator de transcrição (Velazquez *et al.*, 1997; Velazquez & Rombeau, 1997).

Outros estudos relacionam a ação do butirato no sistema imunológico, tanto com ações ligadas à imunidade inata como à imunidade adquirida. Um estudo com células semelhantes aos adenocarcinomas de enterócitos humanos da linhagem Caco-2 e células semelhantes a monócitos humanos da linhagem U937 demonstrou que o butirato é capaz de proteger a barreira

epitelial, bem como inibir a secreção de TNF- $\alpha$  e aumentar a produção da citocina IL-10 (van Nuenen *et al.*, 2005). Resultados semelhantes a esse último trabalho foram encontrados com macrófagos de lavado peritoneal de animais C57BL/6 (Soderberg *et al.*, 2004). Ao butirato também foram atribuídos outros efeitos como diminuição da expressão de moléculas de adesão VCAM-1 e E-selectina em células endoteliais do cordão umbilical de humanos, redução da produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  por monócitos, mudança da morfologia e fenótipo de células dendríticas, inibição da liberação de mediadores inflamatórios por mastócitos e neutrófilos (Miller & Wolin, 1979; Saemann *et al.*, 2002a; Saemann *et al.*, 2002b; Menzel *et al.*, 2004; Scheppach & Weiler, 2004; Zapolska-Downar *et al.*, 2004; Diakos *et al.*, 2006; Vinolo *et al.*, 2011).

Com relação à imunidade adaptativa, estudos com linfócitos provenientes de linfonodos mesentéricos demonstraram que o butirato possui efeito imunomodulador com ação inibitória semelhante ao encontrado para células da imunidade inata como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Em cultura de linfócitos, a adição de butirato ao meio de cultura inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-2 e IFN- $\gamma$ , além de promover mudança fenotípica das células Th1 para células Th2, devido a defeitos na produção de IL-12 e supressão da expressão do receptor desta mesma citocina (Saemann *et al.*, 2000; Saemann *et al.*, 2002a; Cavaglieri *et al.*, 2003).

Em humanos, estudos relatam que cinco entre dez pacientes com colite ulcerativa responderam à administração de butirato, refletindo em melhora da inflamação, e ainda outros trabalhos demonstraram que pacientes que tiveram falhas na terapia medicamentosa com corticóides responderam bem à administração de ácidos graxos de cadeia curta (Scheppach *et al.*, 1992b; Patz *et al.*, 1996; Scheppach, 1996). Mais estudos clínicos avaliaram o uso de butirato no tratamento de colite ulcerativa e mostraram melhora em parâmetros histológicos e inflamatórios, menor ativação de NF- $\kappa$ B e menor infiltração de células inflamatórias na mucosa colônica (Scheppach *et al.*, 1992a; Luhrs *et al.*, 2002). A combinação de butirato com drogas anti-inflamatórias, como a mesalazina, também se mostrou eficiente nestes pacientes (Vernia *et al.*, 2003). Entretanto, esses efeitos são contestados por outros estudos que, com métodos semelhantes, apresentaram resultados opostos (Steinhart *et al.*, 1996;

Breuer *et al.*, 1997). Assim, as concentrações adequadas de ácidos graxos de cadeia curta ou de butirato, a frequência e a duração do tratamento com enemas ainda não estão bem esclarecidas em humanos. Inconvenientes relacionados ao número amostral insuficiente, uso prolongado de enemas e fontes diferentes do nutriente (diretamente, através de enemas e injeções intrarectal e intracecal, ou indiretamente, pela inoculação de bactérias produtoras de butirato, como *Clostridium butyricum* e *Eubacterium limosum*, ou por consumo de fibras terapêuticas tipo mucilagens e derivados, como germinated barley foodstuff - GBF) são as principais limitações dos estudos clínicos e contribuem para resultados controversos (Kanauchi *et al.*, 1999a; Kanauchi *et al.*, 1999b; Videla *et al.*, 2001; Isono *et al.*, 2007; Hamer *et al.*, 2008). Quando se trata de administração oral de butirato, são muito poucos os estudos *in vivo* e estes apresentam resultados contraditórios (Kanauchi *et al.*, 1999b; Moreau *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2011).

Butirato pode ainda reduzir o estresse oxidativo secundário à inflamação. Estudo analisando a oferta oral de butirato observou diminuição da infiltração de neutrófilos e eosinófilos em modelo de colite experimental induzida por DSS (Vieira *et al.*, 2011). A diminuição destas células confere menor produção de espécies reativas de oxigênio no tecido intestinal e contribui para a diminuição do estresse oxidativo (Souza, 2001; Naito *et al.*, 2007).

Estudos *in vitro* demonstraram que a redução do estresse oxidativo está relacionada com ativação de sistemas de reparo de DNA e de enzimas antioxidantes (Hamer *et al.*, 2008). A incubação de células colônicas com butirato resultou em diminuição do dano ao DNA induzido pelo peróxido de hidrogênio e em maior atividade do sistema glutationa-S-transferase (Abrahamse *et al.*, 1999; Rosignoli *et al.*, 2001).

Apesar de todas estas ações, o uso clínico do butirato é limitado por sua vida útil curta (entre 3 e 4 horas), metabolismo e excreção rápidos, além dos efeitos colaterais, como cefaleia, náusea, anorexia, entre outros. A administração por via retal também é possível e a forma mais utilizada. Em pacientes com doença inflamatória intestinal é comum a indicação de enemas para aumento da concentração de butirato no cólon, contudo, seu uso tem baixa aceitabilidade por parte dos pacientes por ser um procedimento

incômodo e que necessita de aplicação várias vezes ao dia (Dianzani *et al.*, 2006; Gassull, 2006; Hamer *et al.*, 2008).

Existem algumas alternativas para aumentar a quantidade de butirato no ambiente intestinal. Uma delas é o uso de micropartículas de butirato que envolvem o composto até sua chegada ao intestino, onde se dissolvem e liberam seu conteúdo no ambiente intestinal, diminuindo algumas desvantagens do butirato, além de aumentar o tempo de exposição do composto, levando em consideração que sua liberação de dentro das micropartículas é feita lentamente (Dianzani *et al.*, 2006; Gassull, 2006; Hamer *et al.*, 2008). Estudo comparando o efeito anti-inflamatório de butirato e de micropartículas de butirato mostrou que o uso das micropartículas seria favorável, uma vez que elas foram mais eficientes do que o butirato isolado na diminuição da adesão de células polimorfonucleares, da produção de íons superóxidos e da liberação de mieloperoxidase por neutrófilos (Dianzani *et al.*, 2006).

### *Tributirina*

Outra alternativa interessante é a ingestão de tributirina, triglicerídeo constituído por três moléculas de ácido butírico esterificadas ao glicerol (Hamer *et al.*, 2008). A tributirina, presente em leite e derivados, é hidrolisada por lipases mais rapidamente do que os triglicerídeos de cadeia longa e libera moléculas de ácido butírico no meio intestinal. Além disso, pode ser absorvida como um triglicerídeo intacto, e, uma vez no interior da célula epitelial intestinal, é rapidamente hidrolisada em butirato por lipases celulares (Sgarbieri & Pacheco, 1999; Edelman *et al.*, 2003)

O uso de tributirina levaria a diminuição e até eliminação dos efeitos indesejáveis do butirato. Além disso, sendo fisicamente um óleo, seria facilmente usada como suplementação em doenças inflamatórias como a colite ulcerativa (Dianzani *et al.*, 2006; Gassull, 2006; Hamer *et al.*, 2008).

Ainda não existem muitos trabalhos testando este composto *in vivo*. Um trabalho *ex vivo* mostrou que o uso da tributirina reduziu recrutamento de neutrófilos ao sítio inflamatório e também inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e CINC-2 $\alpha\beta$ ) e de óxido nítrico por neutrófilos (Vinolo *et*

*al.*, 2011). Outro estudo *in vitro* provou que tributirina é mais ativa que butirato na diferenciação de células de leucemia (Maier *et al.*, 2000).

Estudo testando toxicidade e farmacocinética da tributirina em camundongos mostrou que apenas a altas concentrações, 10,3g/kg de peso do animal, a tributirina foi letal. As outras concentrações testadas não apresentaram toxicidade e a administração oral de tributirina levou a relevantes concentrações de butirato no plasma, cinco minutos após a administração, com picos entre 15 e 60 minutos (Egorin *et al.*, 1999).

A análise da tributirina em humanos foi feita com pacientes com diferentes tipos de câncer. Observou-se que a tributirina, oferecida via oral a concentrações de 150 a 200mg/kg de peso do paciente por três vezes diariamente, foi bem tolerada por meses, e, apesar de variações, a média de concentração plasmática obtida com o uso de tributirina foi de 52µM, nível este que é consistente com ação biológica. Além disso, a toxicidade foi mínima e muitos dos pacientes que participaram da pesquisa reportaram melhora no bem-estar, no apetite e no controle da dor (Edelman *et al.*, 2003).

Estudos com tributirina ainda não mostram seus efeitos e mecanismos de ação em doenças inflamatórias intestinais, campo que ainda precisa ser pesquisado.

# Efeitos e Mecanismos de Ação da Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano

---

**Justificativa**

### **Justificativa**

Como a colite ulcerativa, uma doença úlcero-inflamatória crônica e recidivante, mostra uma incidência que vem aumentando progressivamente em todo o mundo, é fundamental que novos tratamentos sejam testados e os mecanismos envolvidos compreendidos para que novas estratégias clínicas possam ser desenvolvidas. Sabendo-se da ação trófica e anti-inflamatória do butirato no cólon, mas também conhecendo os efeitos colaterais que seu uso acarreta, torna-se importante avaliar os efeitos e conhecer os mecanismos de ação da tributirina, um potencial adjuvante para o tratamento da doença, uma vez que o seu uso poderia trazer os benefícios sem apresentar os efeitos indesejáveis observados com o ácido graxo.

# Efeitos e Mecanismos de Ação da Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano

---

**Objetivos**

### Objetivos

#### Objetivo Geral

Avaliar o efeito da tributirina administrada oralmente na colite experimental induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS) em camundongos C57BL/6 e determinar seus possíveis mecanismos de ação.

#### Objetivos Específicos

- Avaliar a intensidade da colite em animais C57BL/6 tratados ou não com tributirina através de sinais clínico-histológicos: acompanhamento da evolução ponderal, consumo alimentar, presença de sangue oculto nas fezes, comprimento do cólon e morfometria do cólon.
- Avaliar o perfil imunológico e suas alterações devido à indução de colite e administração de tributirina em animais C57BL/6 através de:
  - quantificação de leucócitos totais e suas populações no sangue;
  - quantificação das populações de linfócito B, linfócito T, linfócito T regulador, célula dendrítica e macrófago em baço, linfonodo cecal e cólon;
  - quantificação de eosinófilos e neutrófilos por atividade enzimática no cólon;
  - quantificação de adesão e rolamento de leucócitos na microcirculação colônica;
  - quantificação de citocinas presentes no cólon.
- Avaliar a ação da tributirina na permeabilidade da mucosa intestinal em animais C57BL/6 após a indução da colite.
- Avaliar o efeito da indução da colite e da suplementação com tributirina no estresse oxidativo colônico.
- Avaliar a ação da tributirina na mucosa colônica durante a indução da colite em animais C57BL/6 através de:
  - morfometria colônica;
  - quantificação de eosinófilos e neutrófilos por atividade enzimática no cólon;
  - análise do estresse oxidativo colônico.

# Efeitos e Mecanismos de Ação da Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano

---

## **Material e Métodos**

### Material e Métodos

#### Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos e fêmeas de sete a nove semanas de idade, obtidos e mantidos no Biotério Ênio Cardillo Vieira, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais usados na citometria de fluxo para a marcação FOXP3 foram animais C57BL/6 GFP para FOXP3, com sete semanas de idade, obtidos no Biotério do Laboratório de Imunobiologia e mantidos no Biotério Ênio Cardillo Vieira. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e acesso livre a dieta e água.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG), com protocolo de número 223/2008 (Anexo 1).

#### Dieta e Soluções

Os animais foram alimentados com dieta AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993) suplementada ou não com 0,5% de tributirina (Tabela 1).

A indução da colite experimental foi realizada dissolvendo-se o sulfato de sódio dextrano (DSS, peso molecular 36,000-50,000, MP Biomedicals) na água administrada aos animais na concentração de 2,0% (peso/volume) (Okayasu *et al.*, 1990).

**Tabela 1** – Composição das dietas utilizadas

<b>Ingrediente</b>	<b>Quantidade (g/kg de dieta) – AIN-93M</b>	<b>Quantidade (g/kg de dieta) – AIN-93M suplementada</b>
Amido de milho	465,69	465,69
BHT (hidroxitolueno butilado)	0,008	0,008
Bitartarato de colina	2,5	2,5
Caseína	140	140
Celulose	50	50
L-cistina	1,8	1,8
Maltodextrina	155	155
Mix de minerais para AIN-93M	35	35
Mix de vitaminas para AIN-93M	10	10
Óleo de soja	40	40
Sacarose	100	100
Tributirina	-	5

### Delineamento Experimental

Os camundongos foram divididos em quatro grupos: 1- sem indução de colite e sem suplementação dietética de tributirina (grupo CONTROLE), 2- sem indução de colite e com suplementação dietética de tributirina (grupo TBT), 3- com indução de colite e sem suplementação dietética de tributirina (grupo COLITE) e 4- com indução de colite e com suplementação dietética de tributirina (grupo COLITE + TBT). Os animais dos grupos CONTROLE e COLITE receberam dieta AIN-93M e os animais dos grupos TBT e COLITE + TBT receberam dieta AIN-93M com suplementação de tributirina a 0,5% durante 15 dias. O DSS, para indução da colite, foi introduzido no 7º dia, e a água com este composto foi oferecida até o 15º dia (Figura 1). No 15º dia

experimental, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com solução de ketamina (10%) e xilazina (2%) para retirada de sangue e órgãos.



**Figura 1** – Delineamento experimental

### Evolução Ponderal, Consumo Alimentar e Consumo Hídrico

Semanalmente foram avaliados, com balança semi-analítica, peso, consumo alimentar e consumo hídrico dos animais. A presença de sangue oculto nas fezes foi avaliada por meio de cartelas para detecção de sangue (INLAB, Diagnostica São Paulo, BR) a partir do segundo dia após a introdução do DSS.

### Análise Histológica do Cólon

O cólon usado para análise das condições histológicas foi retirado, medido com régua milimetrada e colocado imediatamente em solução de formol tamponado 10%, para fixação, por aproximadamente 4 horas. O órgão foi então enrolado da porção proximal para a distal formando um rocambole, processado para inclusão em paraplast para cortes histológicos de 10µm e coloração com hematoxilina e eosina. A observação dos cortes foi feita por patologista, de forma cega, em microscópio óptico acoplado a uma câmera para captação de imagens, que foram analisadas no programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, MD, EUA). O sistema de escore semi-quantitativo foi baseado no descrito por McCafferty (McCafferty *et al.*, 2000) no qual são classificadas as seguintes características: extensão da destruição da

arquitetura da mucosa (0: normal; 1: leve; 2: moderada; 3: dano extensivo), presença e grau de infiltração celular (0: normal; 1: leve; 2: moderada; 3: infiltração transmural), extensão do espessamento do músculo (0: normal; 1: leve; 2: moderada; 3: espessamento extensivo), presença ou ausência de abscessos das criptas (0: ausente; 1: presente) e presença ou ausência de depleção das células caliciformes (0: ausente; 1: presente). Os escores para cada característica são somados, e o escore máximo possível é de 11.

### Análise da Permeabilidade Intestinal

Para avaliação da permeabilidade da mucosa intestinal, os animais, no dia do sacrifício, receberam por gavagem 100µL de solução com fármaco ácido dietilenoaminopentacético (DTPA) marcado com 3,7 MBq <sup>99m</sup>Tecnécio (<sup>99m</sup>Tc) sob a forma de pertecnetato de sódio (Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>), obtido por gerador de <sup>99</sup>molibdênio/<sup>99m</sup>tecnécio (IPEN/CNEM, São Paulo, Brasil). Quatro horas após a gavagem, os animais foram anestesiados para exanguinação pelo plexo axilar e alíquota de 400µL de sangue foi retirada e submetida à determinação da radiação por meio de cintilador de poço automático (ANSR, Abbott®, EUA). Os resultados foram comparados com o padrão de dose e o percentual de dose da radiação encontrada no sangue foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ dose} = (\text{CPM do sangue} \times 100) / \text{CPM do padrão de dose}$$

sendo CPM = contagem por minuto.

### Perfil Imunológico

#### *Análise Indireta de Eosinófilos e Neutrófilos no Cólon*

Foram medidas as atividades das enzimas mieloperoxidase e peroxidase de eosinófilos, presentes em neutrófilos e eosinófilos, respectivamente (Werner & Szelenyi, 1992). Para isso, o cólon foi limpo com PBS 1x, medido com régua milimetrada, pesado em balança analítica e separado em duas partes, uma para análise indireta da presença de neutrófilo (40mg) e outra para análise indireta da presença de eosinófilo (20mg).

Para quantificação da enzima mieloperoxidase, as amostras foram pesadas, homogeneizadas em 760µL de tampão fosfato e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuscitado em 600µL de salina 0,2% e 600µL de salina 1,6% acrescida de 5% de glicose e centrifugado novamente a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e o precipitado foi ressuscitado em 760µL de HETAB (brometo de hexadeciltrimetilamonio) 0,5% diluído em tampão fosfato. As amostras foram então congeladas e descongeladas, por 3 vezes, em nitrogênio líquido. As suspensões foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado para o ensaio enzimático. Para isso, adicionam-se 25µL das amostras diluídas (1:3) a uma placa de 96 poços. Às amostras, adicionam-se 25µL de substrato para a mieloperoxidase, TMB (3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina – Sigma) diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Sigma) e procede-se à incubação a 37°C por 5 minutos. Após este tempo, adiciona-se 100µL de peróxido de hidrogênio a 0,002% e novamente incuba-se a 37°C por 5 minutos. Para interromper a reação acrescentam-se 100µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 1M. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

Para quantificação da enzima peroxidase de eosinófilos, as amostras foram pesadas, homogeneizadas em 380µL de PBS 1x e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Foram adicionados 300µL de solução salina 0,2% e 300µL de solução salina 1,6%, acrescida de 5% de glicose e as amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuscitado em 380µL de HETAB 0,5%, diluído em PBS 1x. Em seguida as amostras foram congeladas e descongeladas, por 3 vezes, em nitrogênio líquido. As suspensões foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado para o ensaio enzimático. Para isso, adicionam-se 75µL das amostras a uma placa de 96 poços. Às amostras, acrescentam-se 75µL do cromógeno OPD (1,2 diaminobenzeno, 1,2 fenilenodiamina – Sigma) diluído em tampão Tris-HCl a 0,075mM acrescido de peróxido de hidrogênio a 6,6 mM e procede-se incubação a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. Então, interrompe-se a reação com adição de 50µL de ácido

sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 1M. A absorvância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 492nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

### *Análise do Perfil Leucocitário por Citometria de Fluxo*

Baço e linfonodo cecal foram tratados para retirada de leucócitos para citometria de fluxo. O cólon foi tratado para retirada de leucócitos presentes na lâmina própria e então estas células foram utilizadas na análise.

As suspensões celulares foram preparadas de acordo com Taylor (Taylor *et al.*, 1987). Brevemente, linfonodo cecal foi colocado em 2mL de meio RPMI completo, macerado, centrifugado a 1200 rpm por 7 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 500µL de meio RPMI 1640 completo. Baço foi colocado em 2mL de meio RPMI completo, macerado, centrifugado a 1200 rpm por 7 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado, e então foram adicionados 9mL de água destilada e 1mL de PBS 10x. A suspensão foi centrifugada a 1200 rpm por 7 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em 1mL de meio RPMI completo. Tanto as suspensões de linfonodo cecal quanto de baço foram contadas em câmara de Neubauer para determinação da quantidade de células utilizando-se o corante eritrosina.

Para retirada de células da lâmina própria (Santiago *et al.*, 2011), o cólon foi removido, lavado três vezes com 15mL de solução de HBSS 1x e incubado em 25mL de meio IEL sob agitação por 30 minutos a 37°C. A solução contendo o tecido foi então agitada vigorosamente por 25-30 segundos, filtrada e o sobrenadante descartado. O tecido foi incubado com 30mL de colagenase tipo 2 (400U/mL - Sigma) em meio HBSS 1x sob agitação por 30-40 minutos a 37°C, macerado, filtrado e centrifugado em 30mL de meio IEL a 1400 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 12mL de meio IEL, centrifugado novamente a 1400 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi mais uma vez descartado e o precipitado ressuspendido em 200µL de meio IEL.

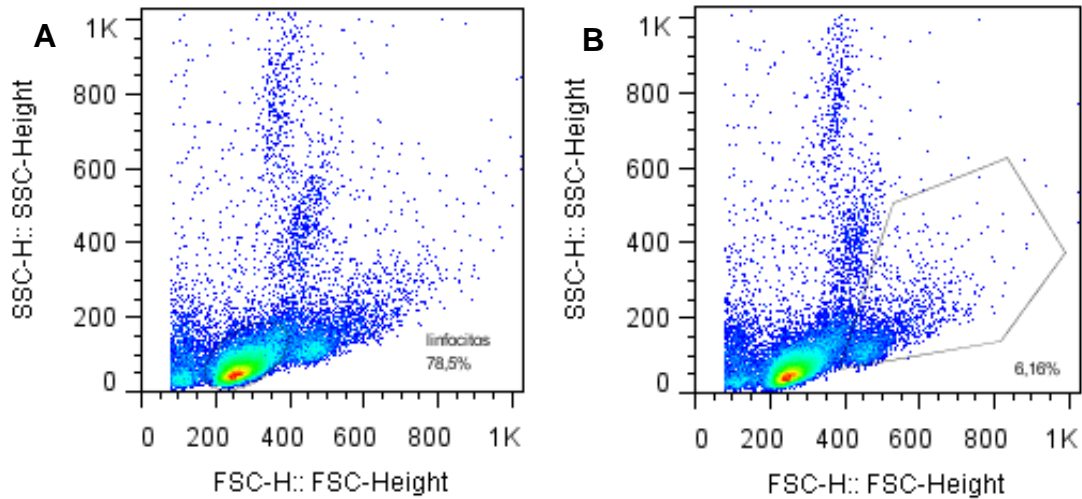
As suspensões celulares (25µL) foram plaqueadas em placa de 96 poços de fundo U juntamente com 10µL dos anticorpos; as amostras foram

incubadas por 30 minutos a 4°C no escuro, lavadas duas vezes com 175µL de PBS 1x adicionado de azida a 0,01% e centrifugadas a 1300 rpm por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, as amostras foram fixadas com 200µL de solução fixadora contendo 10g/L de paraformaldeído e transferidas para tubos de contagem. As amostras foram lidas em citômetro de fluxo (FACScan – Becton Dickinson), a aquisição dos dados foi feita com o programa CELLQuest™ e a análise com o programa FlowJo 7.6. Para cada imunofenotipagem, foram coletadas informações relativas aos aspectos morfométricos de tamanho e granulosidade, bem como aspectos imunofenotípicos de 30.000 eventos para linfonodo cecal e baço e de 10.000 eventos para lâmina própria.

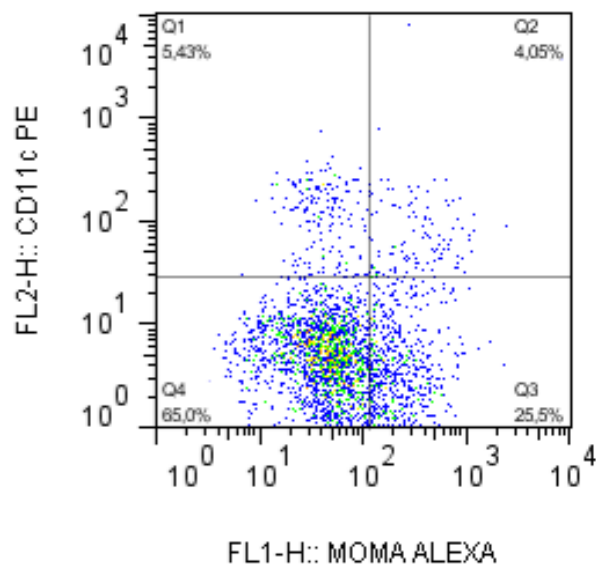
Nos três tecidos analisados, foram feitas marcações para determinação da presença e ativação de:

- célula dendrítica: CD11c MOMA;
- monócito e macrófago: MOMA CD80;
- linfócito B: CD19 CD5 CD21;
- linfócito T auxiliar: CD4 CD44 CD69;
- linfócito T regulador: CD4 CD25 LAP e CD4 CD25 FOXP3.

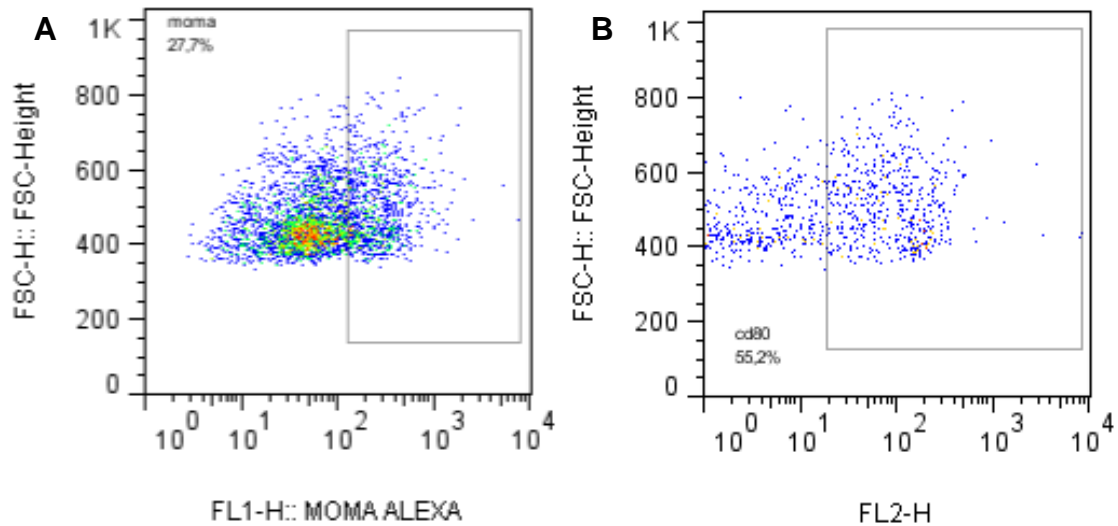
Os resultados foram obtidos utilizando-se a estratégia de análise convencional. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). Após a seleção da região de interesse (R1), o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência, como mostrado nas figuras abaixo.



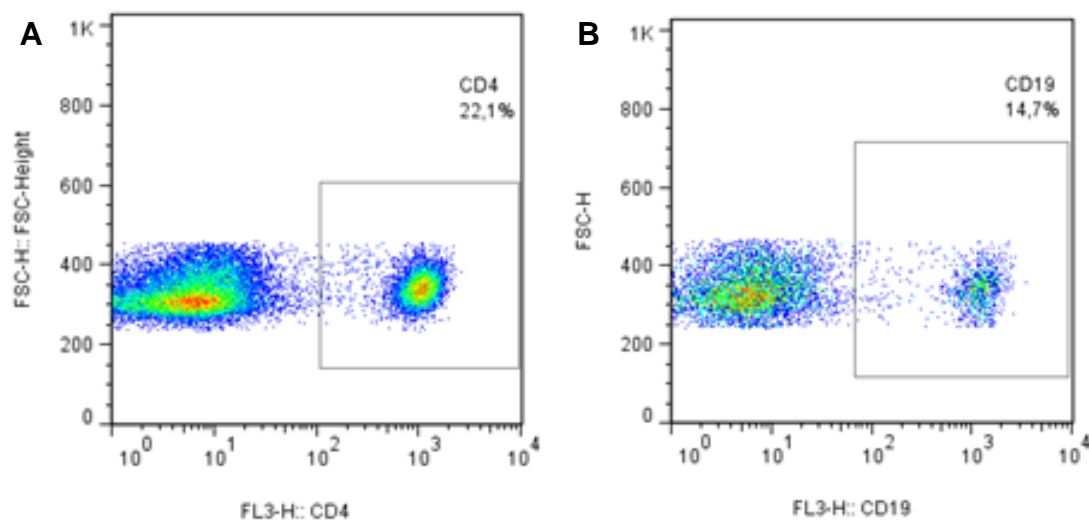
**Figura 2** – Populações de linfócitos (A) e de monócitos/macrófagos/célula dendrítica (B).



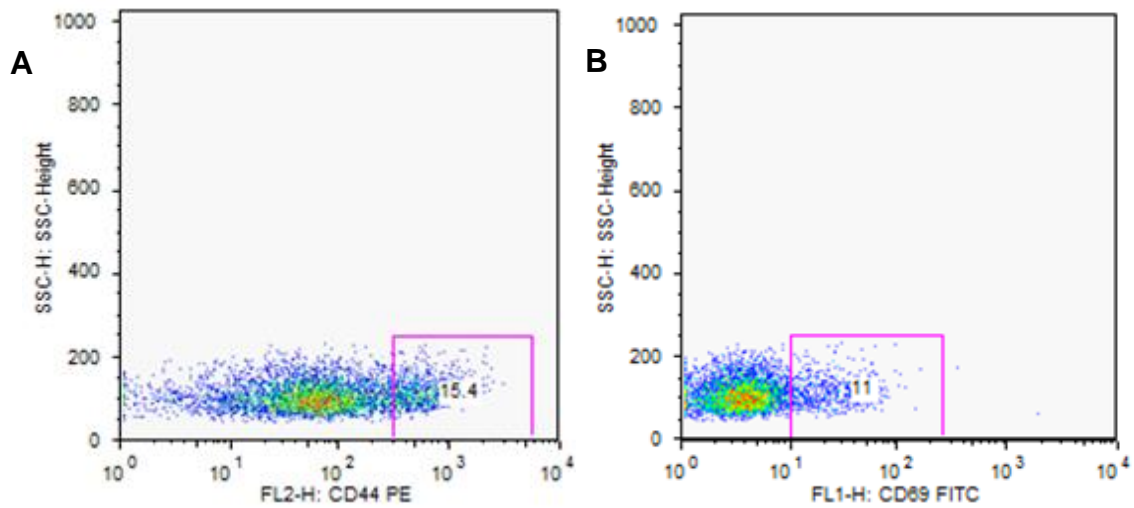
**Figura 3** – Delimitação dos quadrantes para análise dos marcadores CD11c e MOMA, dentro da população de monócitos/macrófagos/célula dendrítica.



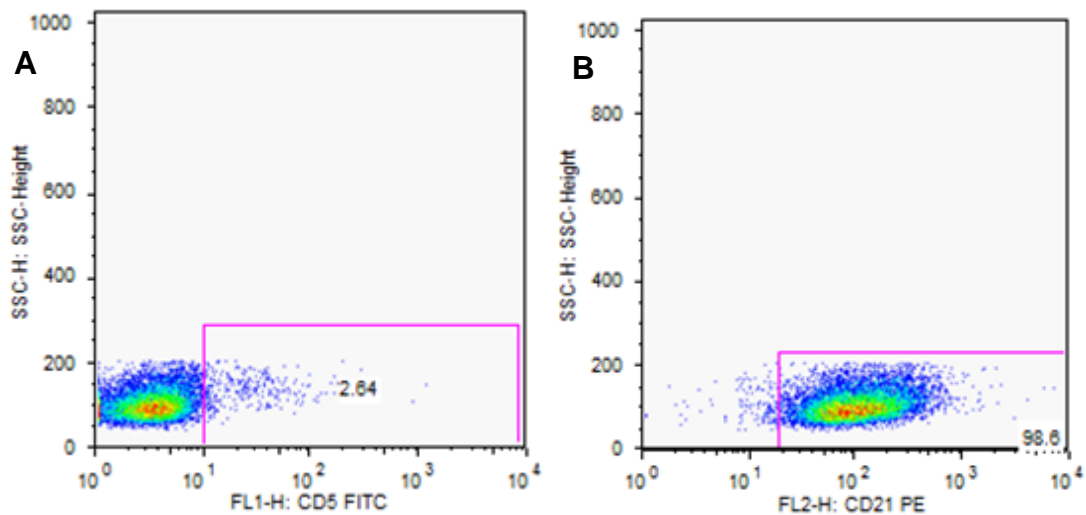
**Figura 4** – Delimitação da marcação de MOMA positivo (A), dentro da população de monócitos/macrófagos/célula dendrítica e de CD80 positivo (B), dentro da população positiva para MOMA.



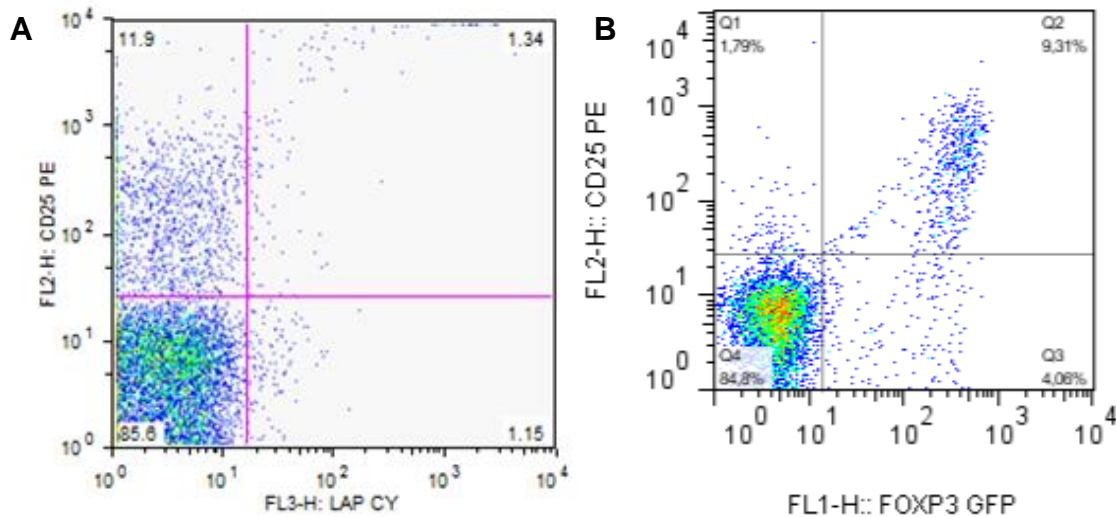
**Figura 5** – Delimitação da marcação de CD4 positivo (A) e de CD19 positivo (B), ambos dentro da população de linfócitos.



**Figura 6** – Delimitação da marcação de CD44 positivo (A) e da marcação de CD69 positivo (B), ambos dentro da população positiva para CD4.



**Figura 7** – Delimitação da marcação de CD5 positivo (A) e da marcação de CD21 positivo (B), ambos dentro da população positiva para CD19.



**Figura 8** – Delimitação dos quadrantes para análise dos marcadores CD25 e LAP (A) e dos marcadores CD25 e FOXP3 (B), ambos dentro da população positiva para CD4.

#### *Contagem Total de Leucócitos no Sangue*

No dia do sacrifício, foi retirado sangue da veia caudal para contagem de leucócitos totais no sangue. O sangue retirado foi adicionado ao corante Turk, responsável pela lise de eritrócitos, numa diluição de 1:10 e a contagem foi feita em câmara de Neubauer, sendo contadas as células presentes nos quatro quadrantes externos. Após a contagem, o número total de leucócitos foi dado pela fórmula:

$$n^{\circ} \text{ total de leucócitos} = \text{somatório do } n^{\circ} \text{ de células nos quadrantes} \times 2,5 \times 10$$

sendo 10 o fator de diluição e 2,5 o fator relacionado ao volume da câmara.

#### *Contagem Diferencial de Leucócitos no Sangue*

Para a contagem diferencial de leucócitos no sangue foi feito esfregaço de boa qualidade corado pelo kit Panótico Rápido (LaborClin, Pinhais, PR), e levado ao microscópio para observação. A avaliação da lâmina foi feita com objetiva de 100x. A contagem de células foi realizada da metade para o fim da borda do esfregaço, em zigue-zague, totalizando a contagem de 100 células, entre neutrófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos e basófilos.

### *Análise de Rolamento e Adesão Leucocitários no Cólon por Microscopia Intravital*

Para a realização da microscopia intravital, os camundongos em estado de jejum por 20 horas foram anestesiados intraperitonealmente com solução de ketamina (10%) e xilazina (2%). A veia jugular direita foi canulada, os animais receberam injeção intravenosa de rodamina 6G (Sigma Chemical Co. USA) (0,15mg/Kg), e o cólon foi exposto para a análise das interações entre leucócitos e endotélio na microcirculação. A microcirculação colônica foi visualizada através de um microscópio de fluorescência, com objetiva de 20x, (Nikon Eclipse, Japan) conectado a uma câmera (Nikon, Japan) que transmitia a imagem a um monitor de televisão. As imagens foram gravadas em DVD para análises posteriores.

Os leucócitos em rolamento foram avaliados contando-se o número de células que passavam por um determinado ponto da vênula por minuto. O leucócito foi considerado aderido, quando permaneceu estacionário por pelo menos trinta segundos, sendo a adesão leucocitária total quantificada como o número de células aderidas em 100µm de extensão da vênula (Dourado *et al.*, 2011).

### *Análise de Citocinas no Cólon por ELISA*

Foram analisadas as concentrações de citocinas no cólon. Para isso, o órgão foi limpo com PBS 1x, pesado em balança analítica (100mg), homogeneizado com 1mL de solução de extração de citocinas, centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi usado no ensaio de ELISA.

O ensaio de ELISA, com duração de três dias, foi feito com kits de anticorpos (BD Systems, San Diego, CA, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Brevemente, no primeiro dia a placa de 96 poços foi sensibilizada com 50µL de anticorpo de captura e incubada em câmara úmida no escuro a 4°C por 24 horas. No segundo dia, após lavar a placa 6 vezes com PBS 1x acrescido de Tween 20 a 0,1% (Sigma), foi feito o bloqueio com 200µL de PBS 1x acrescido de albumina bovina a 1% (Sigma) por 1 hora.

A placa foi lavada 2 vezes com PBS 1x acrescido de Tween 20 a 0,1% (Sigma), 50µL das amostras foram adicionadas e foi feita incubação *overnight* em câmara úmida no escuro a 4°C. No terceiro dia, após lavar a placa 6 vezes com PBS 1x acrescido de Tween 20 a 0,1% (Sigma), foram acrescentados 50µL do anticorpo de detecção e feita incubação por 1 hora em câmara úmida no escuro a 4°C; a placa foi lavada 6 vezes, foram acrescentados 50µL de estreptovidina e feita incubação por 45 minutos. A placa foi novamente lavada por 6 vezes, foram então acrescentados 50µL do cromógeno OPD (1,2 diaminobenzeno, 1,2 fenilenodiamina – Sigma), as amostras foram incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz e a reação foi parada com 20µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 1M. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 490nm. Os resultados foram expressos em ng/mL depois de obtida a fórmula pela curva padrão.

Foi analisada a concentração das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL-1β, IL-17, TGF-β e IL-10.

### Análise de Estresse Oxidativo no Cólon

Para análise do estresse oxidativo o cólon foi retirado, limpo com PBS 1x, medido com régua milimetrada e pesado em balança analítica. O órgão (100mg) foi então homogeneizado com 1mL de PBS 1x gelado, centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi separado para as análises descritas abaixo.

### *Avaliação da peroxidação lipídica por TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)*

A geração de radicais livres e a peroxidação lipídica são reações extremamente rápidas, que são, geralmente, mensuradas pelos seus produtos, principalmente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre as quais o malondialdeído (MDA) é a principal. A formação do MDA, pela quebra de ácidos graxos poli-insaturados, é um método conveniente para se determinar o grau de peroxidação lipídica, uma vez que o ácido tiobarbitúrico

reage com o MDA, formando um aduto na proporção de 2:1, sendo este detectado espectrofotometricamente.

A medida dos metabólitos, reativos ao ácido tiobarbitúrico, foi realizada em microplacas (Buege & Aust, 1978). Para isso, ao sobrenadante de cólon (250µL) foi adicionado 500µL da solução contendo ácido tricloroacético (TCA 15%), ácido tiobarbitúrico (TBA 0,0375%) e ácido clorídrico (HCL 0,25 N). As amostras foram mantidas em banho-maria fervente por 15 minutos e então colocadas sob água corrente até esfriarem. Foram adicionados 750µL de álcool butílico, e os tubos foram vigorosamente agitados. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, e 200µL do sobrenadante foram plaqueados, em duplicata. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 535nm, e os resultados foram normalizados pela concentração de proteína no cólon (Lowry *et al.*, 1951).

### *Dosagem da Concentração de Hidroperóxidos no Cólon*

O ensaio da oxidação ferrosa do xilenol orange consiste basicamente na oxidação de íons ferrosos ( $Fe^{2+}$ ) a férricos ( $Fe^{3+}$ ) sob condições ácidas pelos hidroperóxidos (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1994; Banerjee *et al.*, 2002). O indicador utilizado é o xilenol orange, uma vez que se liga ao íon férrico produzindo um cromóforo azul-arroxeadado, detectado espectrofotometricamente.

A medida da concentração de hidroperóxidos foi realizada em microplaca. No momento da realização do ensaio, uma parte da solução FOX (preparado pela dissolução do xilenol orange e do sulfato ferroso amoniacal em 250mM de  $H_2SO_4$  para uma concentração final de 1 e 2,5mM, respectivamente) foi diluída em nove partes da solução de metanol contendo 4,4mM de BHT (hidroxitolueno butilado), obtendo-se, assim, o reagente FOX-2. Para as dosagens, ao sobrenadante de cólon (20µL) foram acrescentados 180µL do reagente FOX-2, diretamente na microplaca, em duplicata, e o branco foi feito utilizando água deionizada no lugar do sobrenadante. Em seguida, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos, e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 560nm.

Na segunda etapa da técnica, foi realizada a redução dos hidroperóxidos com trifenilfostina (TPP). A TPP é utilizada como eficiente ferramenta para distinção entre peróxido de hidrogênio e peróxidos (não-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), já que a presença de TPP indica o teor de peróxido de hidrogênio na amostra (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1994; Banerjee *et al.*, 2002). Ao sobrenadante do órgão (15µL) foram adicionados 5µL da solução de TPP em metanol (TPP a 10mM), diretamente na microplaca, em duplicata, e o branco foi feito utilizando água deionizada. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos, após este tempo foi acrescentado 180µL do reagente FOX-2. As amostras foram mantidas novamente a temperatura ambiente por mais 30 minutos e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 560nm.

A concentração de hidroperóxidos foi estimada pelo coeficiente de extinção de hidroperóxidos,  $4,3 \times 10^{-4} \text{M}^{-1}$ , e pelo coeficiente de extinção do cromóforo azul-arroxeadado produzido pelo xilenol orange, ao se ligar aos íons férricos,  $1,5 \times 10^{-4} \text{M}^{-1}$ . Para quantificar os hidroperóxidos da amostra foram subtraídas as dosagens com TPP daquelas sem TPP (sem TPP - com TPP = quantidade de hidroperóxidos da amostra), e o resultado foi normalizado pela concentração de proteína no cólon (Lowry *et al.*, 1951).

### *Dosagem da Atividade da Superóxido Dismutase no Cólon*

A dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD) é baseada na sua habilidade de limpar radicais superóxidos (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), diminuindo a razão de auto-oxidação do pirogallol (Dieterich *et al.*, 2000). Para esta dosagem, em placa de 96 poços, foram adicionados 30µL do sobrenadante de cólon, 99µL do PBS 1x, 6µL do MTT (brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium) e 15µL do pirogallol. No branco, o pirogallol foi substituído por PBS 1x, e no padrão a amostra foi substituída por PBS 1x. As amostras foram incubada por 5 minutos a 37°C, a reação foi parada com 150µL de DMSO (dimetil sulfóxido) e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 570nm.

Para o cálculo da atividade, foi considerado que 1 unidade (U) de SOD é capaz de evitar a auto-oxidação de 50% de pirogallol do padrão. Após a

normalização pela concentração de proteína no cólon (Lowry *et al.*, 1951), o resultado foi expresso em unidades de SOD por mg de proteína.

### *Dosagem da Atividade da Catalase no Cólon*

A dosagem da atividade de catalase se baseia no declínio da absorvância do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), em comprimento de onda de 240nm, pela metabolização deste pela catalase ( $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ ) (Nelson & Kiesow, 1972).

Para esta dosagem, 25 $\mu$ L do sobrenadante do tecido já diluído (1:25) em PBS 1x foram acrescentados a 1mL de PBS 1x em cubeta de quartzo. Foram então acrescentados 25 $\mu$ L de solução de  $H_2O_2$  0,3M e a absorvância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 240nm por dois minutos. Os cálculos foram feitos pela diferença de leitura no tempo final pelo tempo inicial, dividido pelo volume (mL) da amostra e depois dividido por dois para obtenção do resultado da atividade da enzima em 1 minuto. Após a normalização pela concentração de proteína no cólon (Lowry *et al.*, 1951), o resultado foi expresso em delta E por minuto por g de proteína.

### *Dosagem de Proteína no Cólon*

A dosagem da concentração de proteína em extrato colônico foi feito de acordo com Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Para isso, em 250 $\mu$ L de amostra diluída (1:50) foram adicionados 250 $\mu$ L da solução A (1 parte de sulfato de cobre, 1 parte de tartarato de sódio e 100 partes de carbonato de sódio) e 25 $\mu$ L de Folin diluído (1:2). Imediatamente após o Folin, as amostras foram agitadas em vórtex e incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. As amostras foram então plaqueadas (200 $\mu$ L) em placa de 96 poços e a absorvância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 660nm. Os resultados foram expressos em mg/mL depois de obtida a fórmula pela curva padrão, feita com albumina.

### Avaliação da Ação da Tributirina Durante a Indução da Colite Experimental

#### *Animais, Dieta, Soluções e Delineamento Experimental - 3 dias de DSS*

Para avaliação da ação da tributirina durante a indução da colite experimental, foi feito um delineamento com oferecimento de DSS por 3 dias.

Para isso, camundongos C57BL/6 machos e fêmeas de sete a nove semanas de idade, obtidos e mantidos no Biotério Ênio Cardillo Vieira, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), foram mantidos em gaiolas coletivas, com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e acesso livre a dieta e água.

Os camundongos foram divididos nos três grupos: 1- sem indução de colite e sem suplementação dietética de tributirina (grupo CONTROLE), 2- com indução de colite e sem suplementação dietética de tributirina (grupo COLITE) e 3- com indução de colite e com suplementação dietética de tributirina (grupo COLITE + TBT). Os animais dos grupos CONTROLE e COLITE receberam dieta AIN-93M e os animais do grupo COLITE + TBT receberam dieta AIN-93M com suplementação de tributirina a 0,5% durante 10 dias. O DSS, para indução da colite ulcerativa, foi introduzido no 7º dia, e a água com este composto foi oferecida até o 10º dia (Figura 9). No 10º dia experimental, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com solução de ketamina (10%) e xilazina (2%) para retirada de órgãos.



**Figura 9** – Delineamento experimental com três dias de DSS

### *Análises do Delineamento Experimental - 3 dias de DSS*

Neste delineamento, foram analisados:

- morfometria do cólon,
- presença de eosinófilos e neutrófilos no cólon, pela atividade das enzimas peroxidase de eosinófilos e mieloperoxidase,
- estresse oxidativo no cólon, por TBARS, dosagem de hidroperóxidos, atividade da superóxido dismutase e atividade de catalase.

Os métodos estão devidamente descritos acima.

### Análise Estatística

Os resultados foram avaliados, quanto à distribuição normal, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e quanto à presença de *outliers* pelo teste de Grubbs e pelo teste de Box-Plot. Os dados que assumiram distribuição normal foram submetidos ao teste ANOVA one-way, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Os dados que assumiram distribuição não paramétrica foram analisados pelo teste de ANOVA Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunns.

Os resultados foram expressos como média e erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5.0, e o nível de significância foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

# Efeitos e Mecanismos de Ação da Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano

---

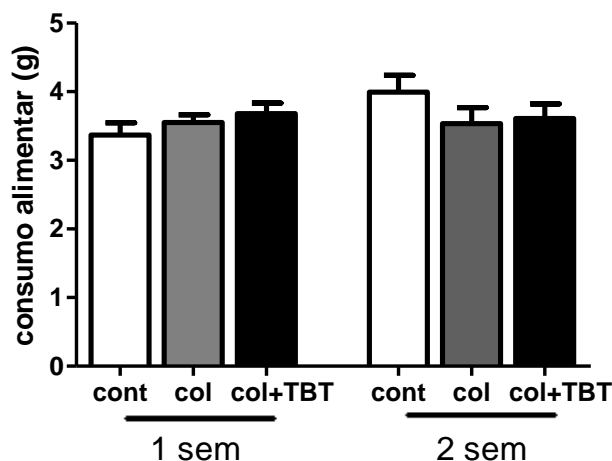
## Resultados

## Resultados

Foram feitas análises de consumo alimentar, consumo hídrico, variação ponderal, comprimento do cólon, análise histopatológica e presença de eosinófilos e neutrófilos nos quatro grupos iniciais e não foi observadas diferenças estatísticas entre o grupo controle e o grupo TBT. Considerando essa igualdade estatística, somente o grupo controle foi utilizado para comparações estatísticas com os outros grupos experimentais, e os demais experimentos foram realizados com três grupos experimentais: grupo CONTROLE, grupo COLITE e grupo COLITE + TBT.

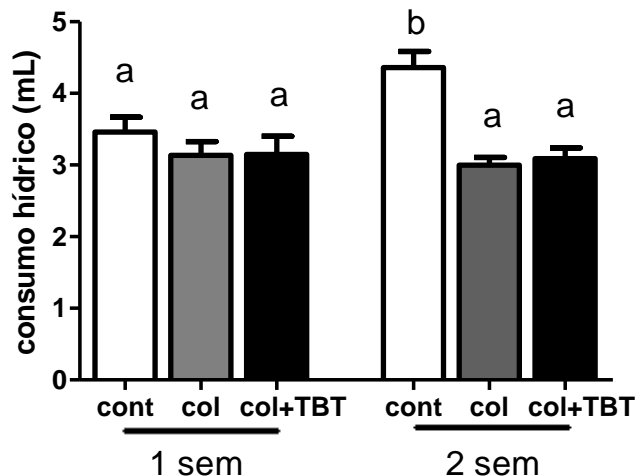
### Consumo Alimentar e Consumo Hídrico

O consumo alimentar não apresentou diferença durante os quinze dias de experimento entre os três grupos experimentais (Figura 10). Com o resultado de consumo alimentar, foi calculada a ingestão diária de tributirina, que mostrou que os animais ingeriram por volta de 20mg de tributirina/dia.



**Figura 10** – Consumo alimentar durante o experimento. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em g/dia/animal. n=11/11/11. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls, p<0,05.

Quanto ao consumo hídrico (Figura 11), o grupo controle apresentou maior consumo na segunda semana em relação aos outros grupos e em relação a ele mesmo na primeira semana. Os grupos colite e colite + TBT, na segunda semana, não apresentaram diferença quando comparados entre eles ou em relação ao consumo na primeira semana, indicando que o consumo de DSS foi similar entre os grupos experimentais.

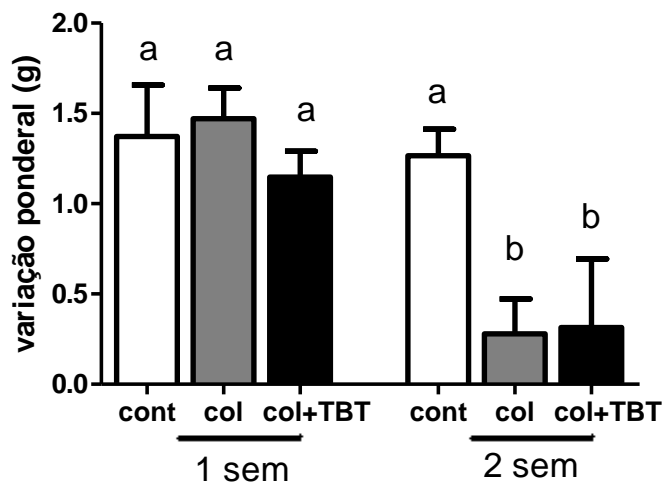


**Figura 11** – Consumo hídrico durante o experimento. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em mL/dia/animal. n=11/11/11. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, p<0,05.

### Variação Ponderal, Sangue Oculto nas Fezes e Comprimento do Cólon

Durante o experimento, os grupos colite e colite + TBT ganharam menos peso com a introdução do DSS, na segunda semana, em relação ao controle e em relação aos três grupos na primeira semana. Este resultado, ao menos no grupo colite, era esperado, pois diminuição do ganho de peso e até perda de peso é um dos sinais encontrados na colite experimental induzida por DSS, mas observa-se que não houve melhora com o uso da tributirina neste parâmetro clínico (Figura 12). Com a variação ponderal, foi calculada a dose de tributirina por quilo de peso, e esta dose foi por volta de 1g de tributirina/kg de peso do animal, mostrando que a dose oferecida neste trabalho está abaixo da

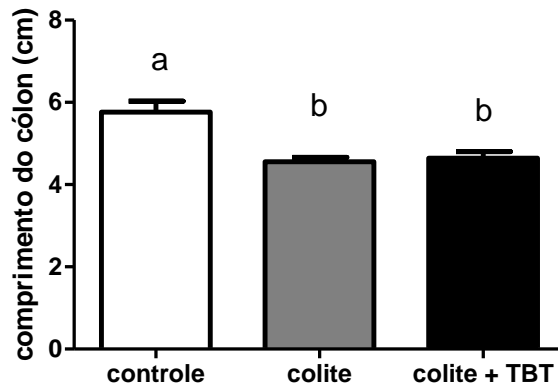
dose que foi letal (Egorin *et al.*, 1999), indicando que a dose aqui utilizada seria segura e não mostraria toxicidade.



**Figura 12** – Variação ponderal durante o experimento. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em gramas. n=13/13/12. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística,  $p < 0,05$ .

Não houve sangramento anal visível, e a presença de sangramento oculto foi detectada pelo teste de sangue oculto nas fezes em ambos os grupos com colite experimental, a partir do segundo dia após a introdução do DSS na água de beber dos animais. Esta presença permaneceu nestes dois grupos até o dia da eutanásia.

O comprimento do cólon foi menor nos grupos colite e colite + TBT em relação ao controle (Figura 13). Apesar de não ter sido observada melhora neste parâmetro pela suplementação com tributirina, este resultado era esperado no grupo colite, uma vez que diminuição do comprimento colônico é um dos sinais da colite experimental induzida por DSS.

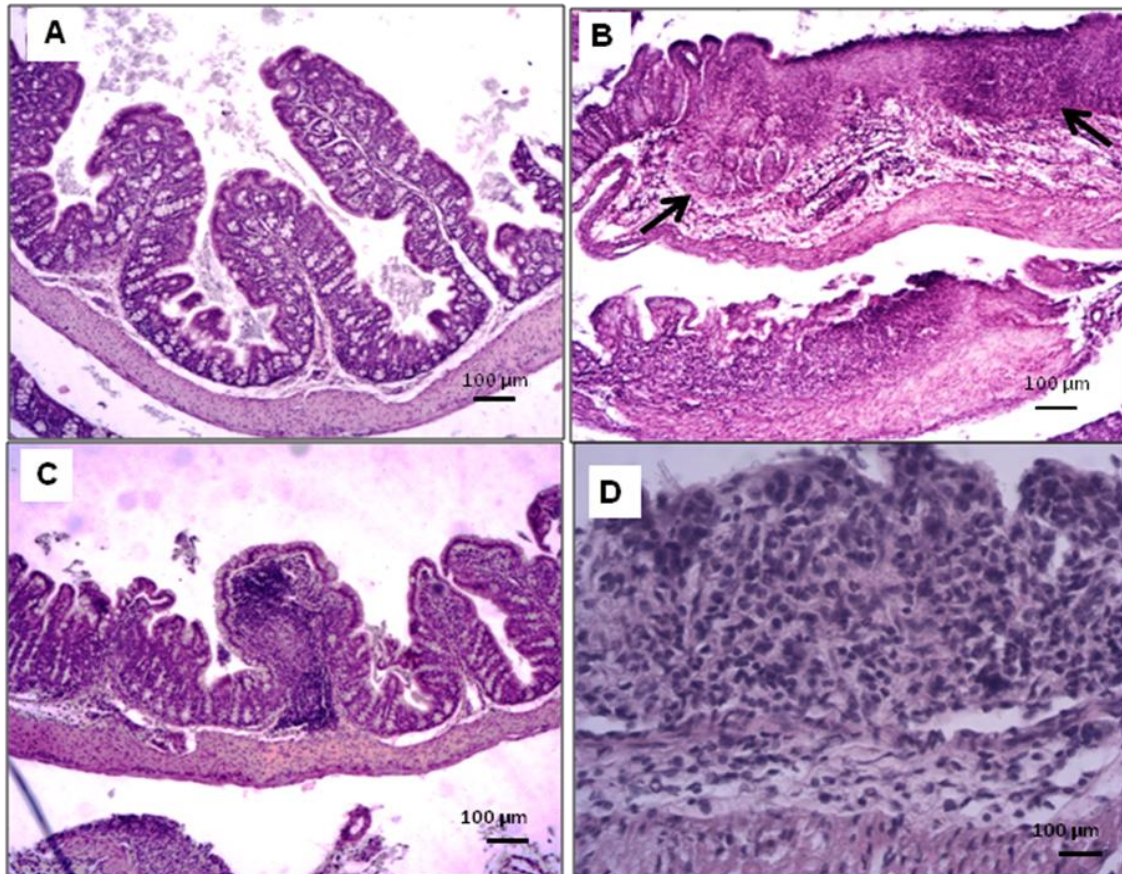


**Figura 13** – Comprimento do cólon. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em centímetros. n=13/13/12. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística,  $p < 0,05$ .

Estes resultados de sinais clínicos indicam indução da colite experimental nos grupos com DSS, apesar de não ter havido efeitos da tributirina na melhora destes parâmetros. O próximo passo foi a avaliação histológica do cólon, para comprovação desta indução e para avaliação de algum efeito positivo do nutriente.

### Análise Histológica

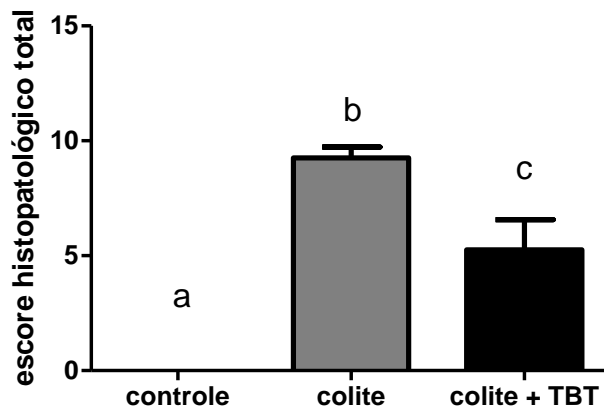
A análise histológica mostrou efetiva indução da doença no grupo colite e ainda uma melhora substancial no grupo colite + TBT em relação ao grupo colite. A Figura 14 mostra o aspecto morfológico do cólon, observado em microscópio óptico, dos três grupos analisados.



**Figura 14** – Aspecto morfológico do cólon. Quadro A: grupo controle, AIN-93M e sem indução de colite; quadro B: grupo colite, AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); quadro C: grupo colite + TBT, AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v); quadro D: foco do infiltrado inflamatório do grupo colite, AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v). Aumento de 40 vezes (quadros A, B e C), e aumento de 200 vezes (quadro D).

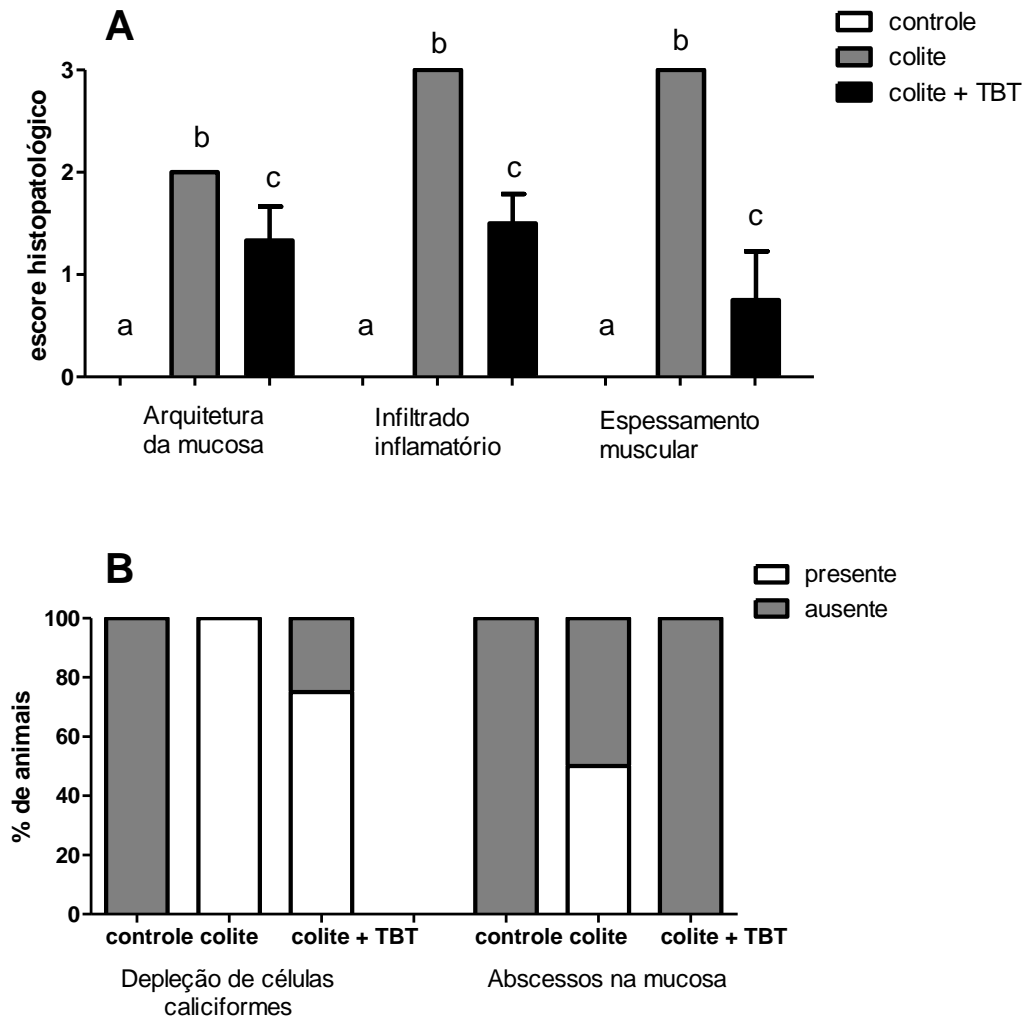
Na Figura 15 está apresentado o resultado do escore histopatológico, no qual o grupo colite + TBT difere estatisticamente do grupo colite, com valor menor, se aproximando do grupo controle. Analisando cada grupo, observa-se que o grupo controle se apresentou dentro dos padrões de normalidade, com arquitetura do cólon íntegra, presença de células caliciformes e ausência de infiltrado inflamatório na mucosa e submucosa. O grupo colite apresentou áreas com intensa ulceração, ausência de glândulas em grande parte da mucosa, depleção de células caliciformes, presença de abscessos das criptas, espessamento da camada muscular e intenso infiltrado inflamatório. Já o grupo colite + TBT apresentou um quadro patológico intermediário tendendo para uma mucosa mais íntegra, com uma área comprometida menor e intensidade

de lesão reduzida, infiltrado inflamatório reduzido e sem erosão de epitélio, preservando parcialmente a arquitetura da mucosa. Este resultado, além de provar que a colite foi realmente induzida nos animais, mostra o efeito trófico da tributirina, pela melhora da arquitetura colônica, e também o seu efeito anti-inflamatório, pela diminuição do infiltrado inflamatório encontrado.



**Figura 15** – Escore histopatológico total do cólon. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão. n=8/4/4. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística,  $p < 0,05$ .

Na Figura 16A e B são apresentados os itens usados no escore histopatológico, e pode-se observar a melhora encontrada com o uso da tributirina em quatro dos cinco parâmetros analisados.

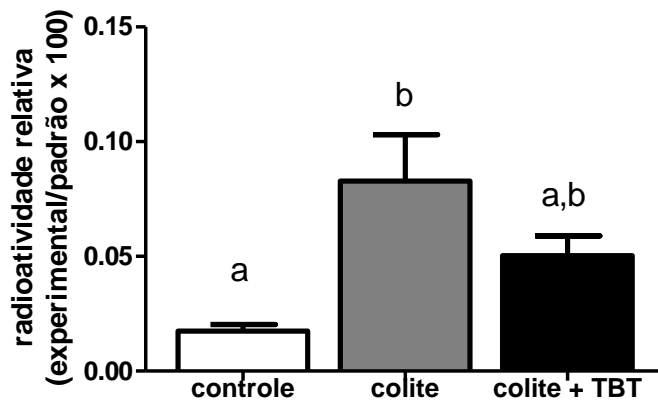


**Figura 16** – Itens usados no escore histopatológico do cólon. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão. n=8/3/3 para arquitetura da mucosa, teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls,  $p < 0,05$ . n=8/4/4 para infiltrado inflamatório, espessamento do músculo, teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls,  $p < 0,05$ . n=8/4/4 para presença de abscesso e depleção de células caliciformes. Letras diferentes representam diferença estatística.

### Permeabilidade Intestinal

Com a melhora na mucosa intestinal constatada pelo escore histopatológico, o próximo passo foi a avaliação da permeabilidade intestinal. Os resultados mostram aumento desta permeabilidade decorrente da indução da colite experimental e mostram que houve ação da tributirina na

normalização deste parâmetro, com o grupo colite + TBT em estado intermediário entre os grupo controle e colite (Figura 17).



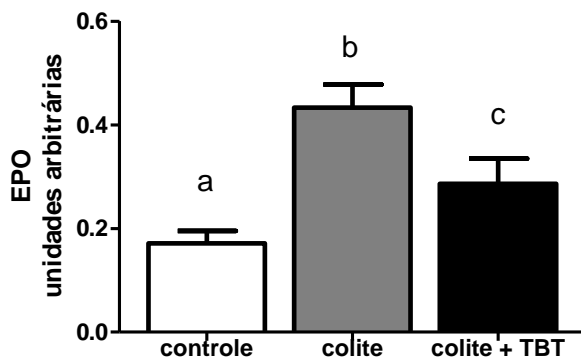
**Figura 17** – Determinação da permeabilidade intestinal usando DTPA marcado com Tecnésio. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em porcentagem de dose encontrada no sangue. n=5/5/5, teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística,  $p < 0,05$ .

### Perfil Imunológico

O escore histopatológico também mostrou diminuição do infiltrado inflamatório no grupo colite + TBT. Para avaliação deste infiltrado, foram realizadas análises da população de linfócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos no cólon dos animais.

### *Análise Indireta de Eosinófilos e Neutrófilos no Cólon*

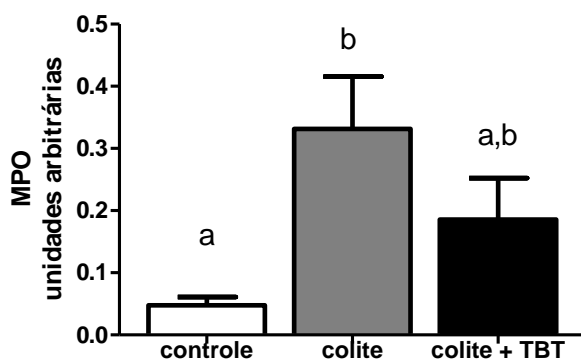
Na análise indireta da presença de eosinófilos no cólon pela quantificação da atividade da peroxidase de eosinófilos, observa-se uma diminuição destas células no grupo colite + TBT em relação ao grupo colite com tendência à volta a normalidade, apesar de ainda não ter chegado ao nível normal do grupo controle (Figura 18).



**Figura 18** – Análise indireta da presença de eosinófilos no cólon pela quantificação da atividade da enzima peroxidase de eosinófilos. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em unidades arbitrárias. n=14/10/8, teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, p<0,05.

Analisando a presença de neutrófilos no cólon pela quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase, também é observada melhora no grupo colite + TBT, uma vez que a diferença observada entre o grupo colite e controle desaparece quando a tributirina é introduzida (Figura 19).

A diminuição de eosinófilos e neutrófilos indica ação da tributirina na melhora da inflamação causada pela colite experimental.

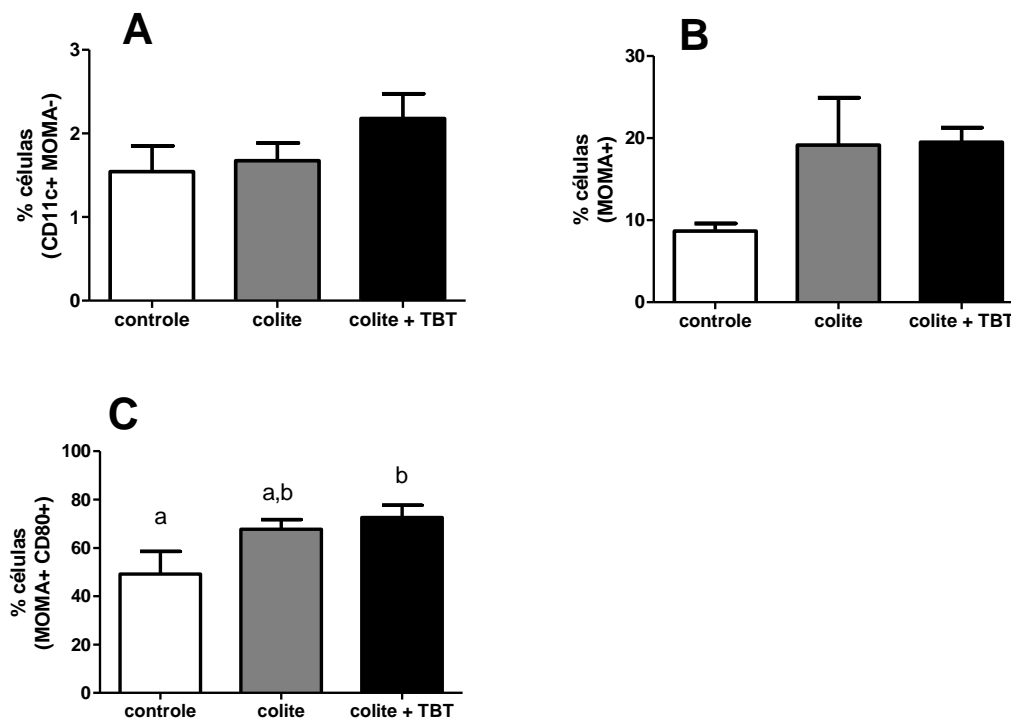


**Figura 19** – Análise indireta da presença de neutrófilos no cólon pela quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase. Grupo controle: AIN-

93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em unidades arbitrárias. n=13/10/7, teste: ANOVA Kruskal-Wallis e Dunns. Letras diferentes representam diferença estatística, p<0,05.

### *Perfil Leucocitário na Lâmina Própria*

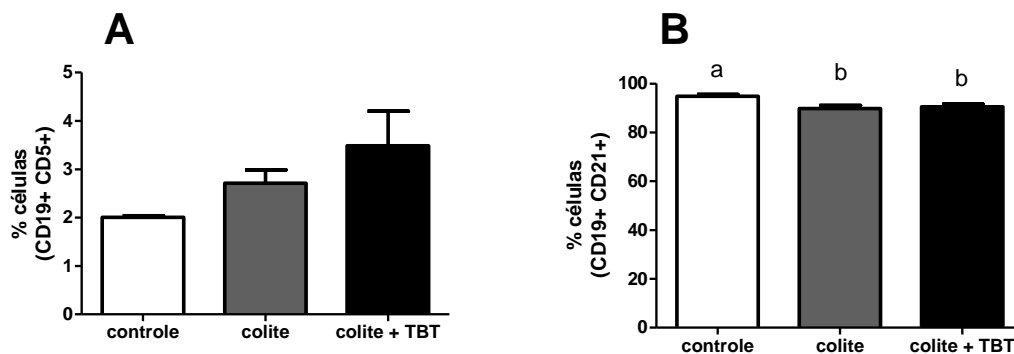
Quanto ao perfil leucocitário na lâmina própria, não houve diferença entre os três grupos estudados na quantidade de célula dendrítica encontrada (marcadores CD11c positivo e MOMA negativo) (Figura 20A) nem na presença de monócitos e macrófagos (marcador MOMA positivo) (Figura 20B). Quanto aos macrófagos ativados (marcadores MOMA positivo e CD80 positivo), observa-se aumento no grupo colite + TBT em relação ao controle, sem diferença, porém, entre os dois grupos com indução da doença (Figura 20C).



**Figura 20** – Porcentagem de células dendríticas (A), de monócitos e macrófagos (B) e de macrófagos ativados (C) na lâmina própria. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em porcentagem de células.

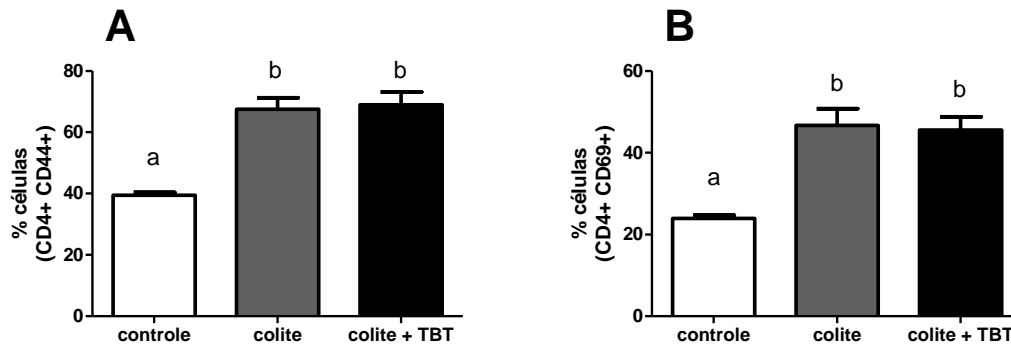
n=5/6/6 para A e n=4/6/6 para B e C. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística,  $p < 0,05$ .

A população de linfócitos B1 (marcadores CD19 positivo e CD5 positivo), relacionados à resposta imune imediata no tubo digestivo, não foi diferente entre os três grupos (Figura 21A). Já os linfócitos B ativados (marcadores CD19 positivo e CD21 positivo) estavam diminuídos nos grupos colite e colite + TBT em relação ao grupo controle (Figura 21B).



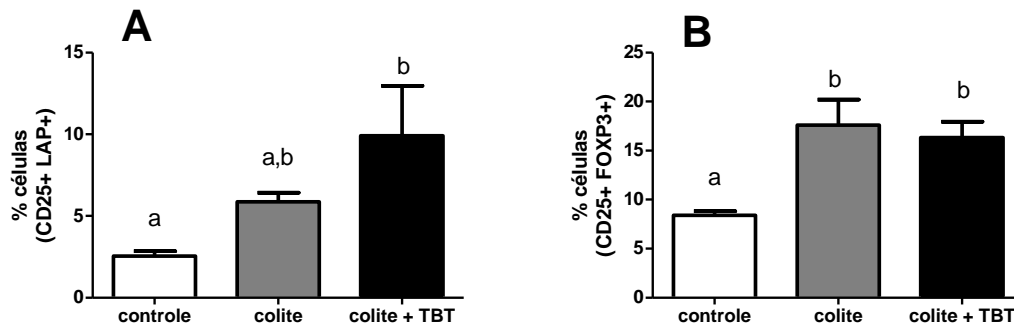
**Figura 21** – Porcentagem de linfócito B1 (A) e de linfócitos B ativados (B) na lâmina própria. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em porcentagem de células. n=5/6/6 para A e B. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística,  $p < 0,05$ .

Os linfócitos T auxiliares de memória (marcadores CD4 positivo e CD44 positivo) foram encontrados em maior quantidade nos grupos colite e colite + TBT em relação ao grupo controle (Figura 22A), mesmo resultado obtido quando linfócitos T auxiliares ativados (marcadores CD4 positivo e CD69 positivo) foram analisados (Figura 22B).



**Figura 22** – Porcentagem de linfócito T auxiliar de memória (A) e de linfócito T auxiliar ativado (B) na lâmina própria. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em porcentagem de células. n=4/6/6 para A e B. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, p<0,05.

Foi analisada também a presença de linfócitos T reguladores, com dois marcadores. Usando o marcador LAP, peptídeo associado à latência (CD25 positivo e LAP positivo), observa-se que o grupo colite + TBT difere do grupo controle, com maior quantidade destas células (Figura 23A), porém sem diferença em relação ao grupo colite. Já analisando o fator de transcrição usado como marcador nuclear de regulação, FOXP3 (Figura 23B), o que se vê é um aumento nos grupos colite e colite + TBT em relação ao controle. O aumento destas células no grupo colite mostra uma tentativa de regulação da inflamação, que, caso não houvesse, levaria a um quadro muito pior da doença nestes animais. O fato de as células LAP positivas estarem aumentadas com a suplementação com tributirina mostra a amplificação desta regulação com o uso deste nutriente.



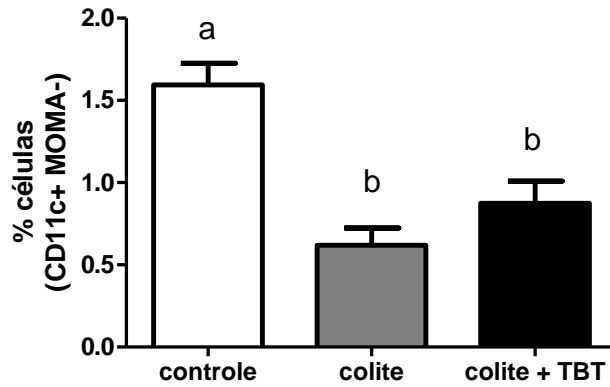
**Figura 23** – Percentagem de linfócito T regulador na lâmina própria. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em porcentagem de células. Quadro A: marcadores CD25 positivo e LAP positivo, n=5/6/6. Quadro B: marcadores CD25 positivo e FOXP3 positivo, n=5/6/6. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística,  $p < 0,05$ .

Em resumo, a indução da doença levou ao aumento de linfócito T auxiliar ativado, linfócito T auxiliar de memória e linfócito T regulador (FOXP3 positivo). A suplementação com tributirina, por sua vez, aumentou a presença de macrófagos ativados e de linfócito T regulador (LAP positivo).

A indução da colite com DSS altera principalmente o cólon mas pode levar a mudanças no sistema imune em outros órgãos como linfonodo cecal e baço. Para avaliarmos estas alterações sistêmicas e a possível ação da tributirina, análises de perfil leucocitário foram realizadas no linfonodo cecal, no baço e no sangue.

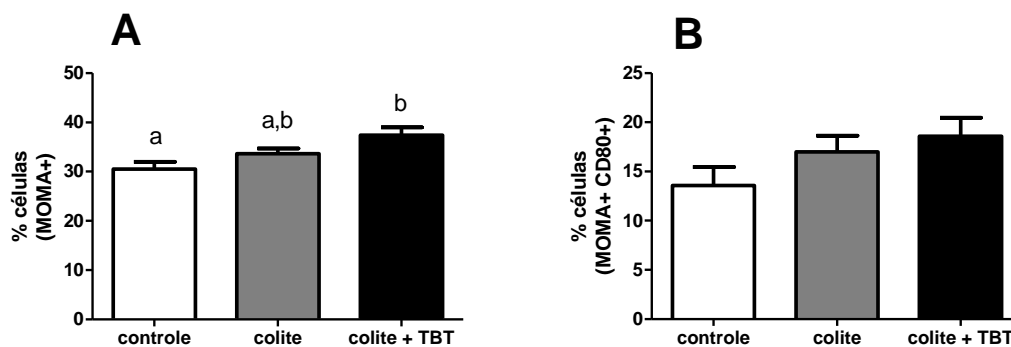
#### *Perfil Leucocitário no Linfonodo Cecal*

A análise de célula dendrítica (marcadores CD11c positivo e MOMA negativo) no linfonodo cecal, órgão imunológico responsável pela primeira drenagem do cólon, mostra uma quantidade diminuída nos grupos colite e colite + TBT em relação ao grupo controle (Figura 24).



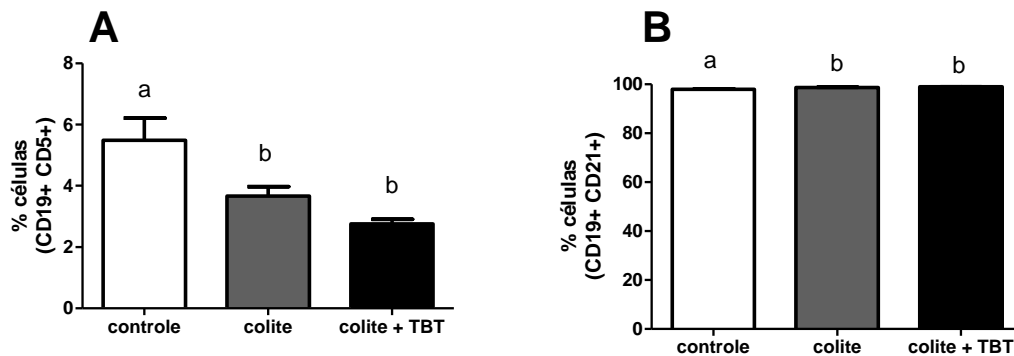
**Figura 24** – Porcentagem de célula dendrítica no linfonodo cecal. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em porcentagem de células. n=5/6/6, teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística,  $p < 0,05$ .

A presença de monócitos e macrófagos (marcador MOMA positivo) neste órgão está aumentada no grupo colite + TBT apenas em relação ao grupo controle (Figura 25A), mas os macrófagos ativados (marcadores MOMA positivo e CD80 positivo) não apresentaram diferença entre os três grupos (Figura 25B).



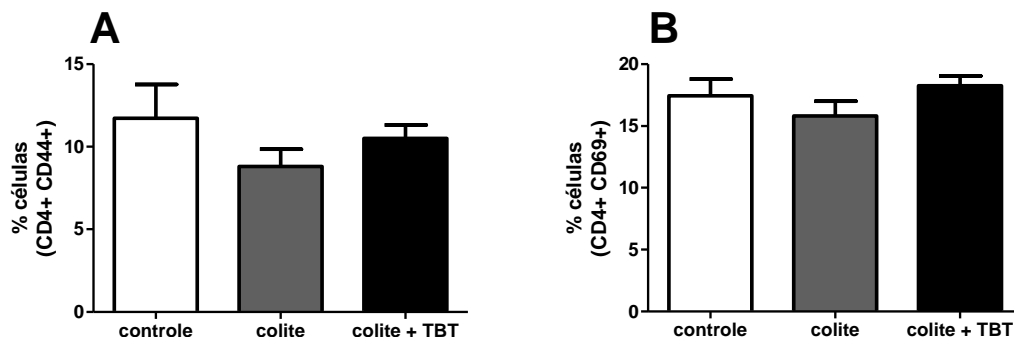
**Figura 25** – Porcentagem de monócitos e macrófagos (A) e de macrófagos ativados (B) no linfonodo cecal. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). n=5/6/6 para A e B. Resultado expresso como média±erro padrão, em porcentagem de células. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística,  $p < 0,05$ .

A presença de linfócitos B1 (marcadores CD19 positivo e CD5 positivo) está diminuída nos grupos colite e colite + TBT em relação ao controle (Figura 26A). Já os linfócitos B ativados (marcadores CD19 positivo e CD21 positivo) se encontram aumentados nos grupos colite e colite + TBT em relação ao controle (Figura 26B).



**Figura 26** – Porcentagem de linfócitos B1 (A) e de linfócitos B ativados (B) no linfonodo cecal. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em porcentagem de células. n=5/6/6 para A e B. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística,  $p < 0,05$ .

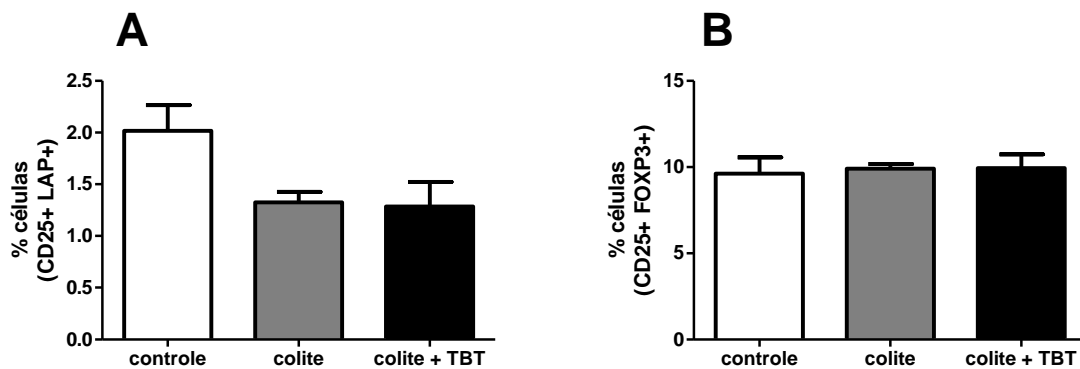
A análise de linfócitos T mostrou que nem a quantidade de linfócitos T auxiliar de memória (marcadores CD4 positivo e CD44 positivo) nem os linfócitos T ativados (marcadores CD4 positivo e CD69 positivo) foram diferentes entre os três grupos analisados (Figura 27A e B).



**Figura 27** – Porcentagem de linfócitos T auxiliar de memória (A) e de linfócitos T auxiliar ativados (B) no linfonodo cecal. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v);

grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em porcentagem de células. n=5/6/6 para A e B. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls, p<0,05.

Este mesmo resultado foi encontrado na análise de linfócitos T reguladores (marcadores CD25 positivo e LAP positivo e também marcadores CD25 positivo e FOXP3 positivo). Nenhum dos três grupos diferiu na porcentagem de células encontradas com estas marcações (Figura 28A e B).



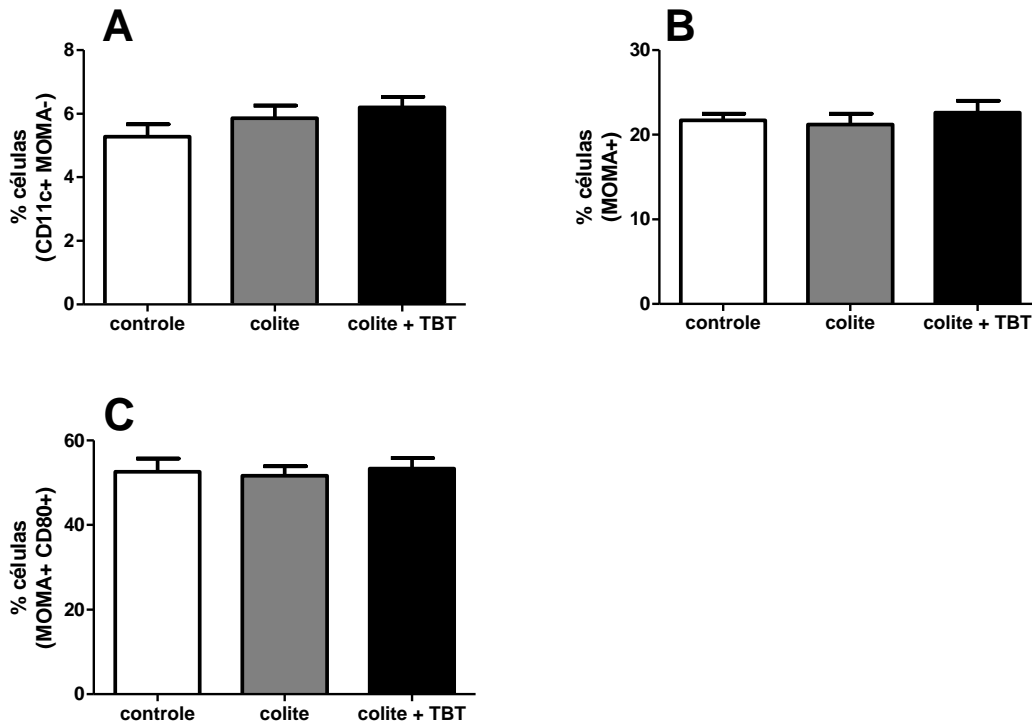
**Figura 28** – Porcentagem de linfócito T regulador no linfonodo cecal. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em porcentagem de células. Quadro A: marcadores CD25 positivo e LAP positivo, n=5/6/6. Quadro B: marcadores CD25 positivo e FOXP3 positivo, n=5/6/6. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls, p<0,05.

Em resumo, no linfonodo cecal houve maior ativação de linfócitos B nos dois grupos com indução de colite experimental e diminuição de célula dendrítica e linfócitos B1. Apenas no grupo colite + TBT houve quantidade de monócitos e macrófagos maior do que no grupo controle.

### *Perfil Leucocitário no Baço*

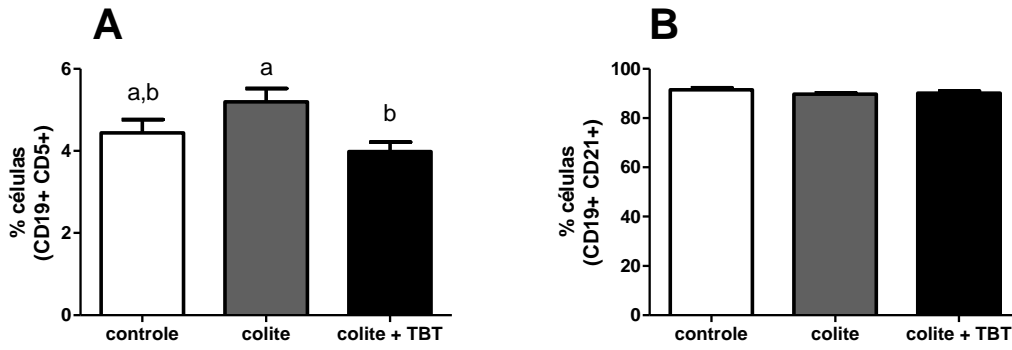
A análise do baço revelou que não houve diferença entre os três grupos estudados quanto a célula dendrítica (CD11c positivo e MOMA negativo),

monócitos e macrófagos (MOMA positivo) e macrófagos ativados (MOMA positivo e CD80 positivo) (Figura 29 A, B e C).



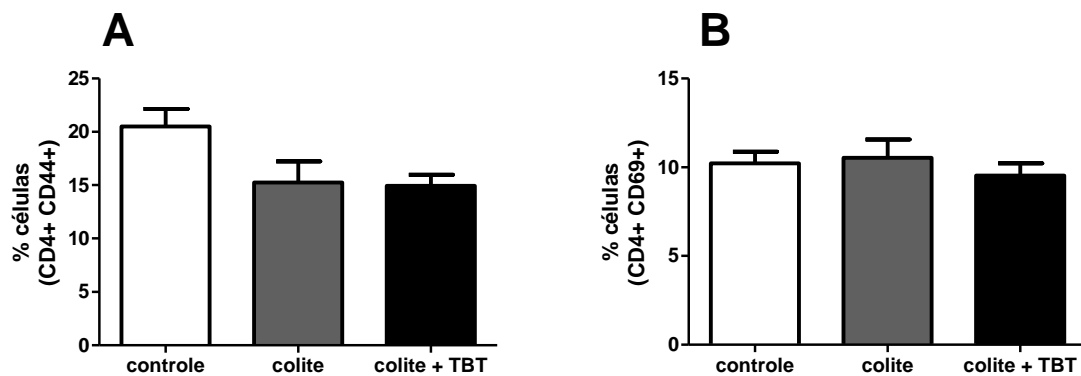
**Figura 29** – Porcentagem de células dendríticas (A), de monócitos e macrófagos (B) e de macrófagos ativados (C) no baço. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em porcentagem de células. n=5/6/6 para A e n=5/5/6 para B e C. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls, p<0,05.

Quanto aos linfócitos B1 (marcadores CD19 positivo e CD5 positivo), houve normalização no grupo colite + TBT, chegando aos níveis do grupo controle (Figura 30A). Já os linfócitos B ativados (CD19 positivo e CD21 positivo) não foram diferentes entre os três grupos experimentais (Figura 30B).



**Figura 30** – Porcentagem de linfócitos B1 (A) e de linfócitos B ativados (B) no baço. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em porcentagem de células. n=5/6/6 para A e B. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, p<0,05.

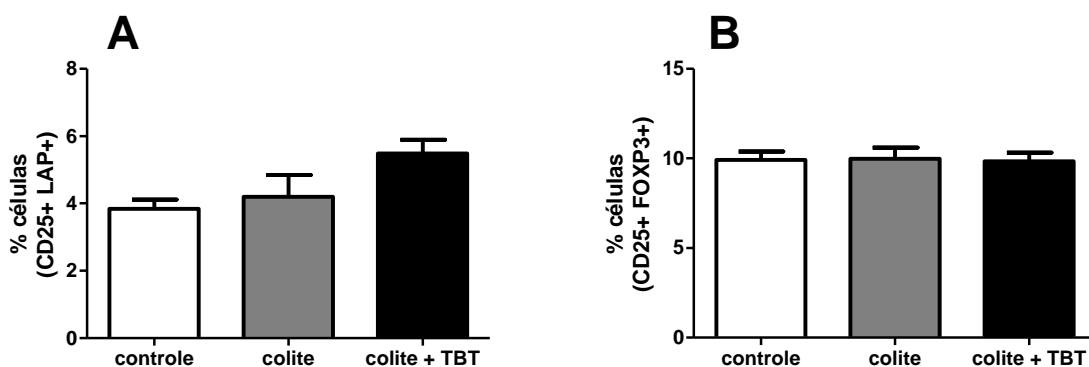
A análise de linfócitos T mostrou que não houve diferença entre os três grupos quanto à presença de linfócito T auxiliar de memória (CD4 positivo e CD44 positivo) e linfócito T auxiliar ativado (CD4 positivo e CD69 positivo) (Figura 31A e B). Este mesmo resultado foi encontrado quanto a linfócitos T reguladores; nenhum dos dois marcadores utilizados (CD25 positivo e LAP positivo e também CD25 positivo e FOXP3 positivo) foi diferente entre os três grupos, mostrando não haver alteração na quantidade destas células neste órgão (Figura 32A e B).



**Figura 31** – Porcentagem de linfócitos T auxiliar de memória (A) e de linfócitos T auxiliar ativados (B) no baço. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite

+ TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em porcentagem de células. n=5/6/6 para A e B. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls, p<0,05.

Em resumo, a única alteração encontrada neste órgão foi na população de linfócitos B1, que estava diminuída no grupo colite + TBT em relação ao grupo colite. Estes resultados sugerem que, no nosso modelo experimental, as alterações sistêmicas são bastante discretas, e que a lesão e a resposta inflamatória são quase totalmente restritas ao cólon dos animais.



**Figura 32** – Porcentagem de linfócito T regulador no baço. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em porcentagem de células. Quadro A: marcadores CD25 positivo e LAP positivo, n=5/6/6. Quadro B: marcadores CD25 positivo e FOXP3 positivo, n=5/6/5. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls, p<0,05.

### *Contagem Total e Diferencial de Leucócitos no Sangue*

As contagens total e diferencial de leucócitos no sangue não apresentaram diferenças entre os três grupos analisados, suportando a ideia de que não há alterações sistêmicas pela indução da doença (Tabela 2).

Tabela 2 – Leucograma do sangue

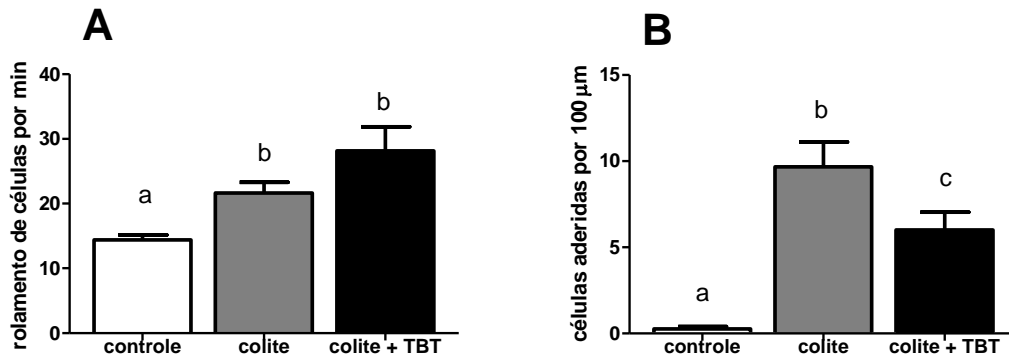
Parâmetro	Grupos		
	Controle	Colite	Colite + TBT
Quantidade Total <sup>a</sup>	17446±3173	16495±1040	17250±1221
Eosinófilo <sup>b</sup>	0,8±0,4	0,5±0,2	0
Neutrófilo <sup>b</sup>	18,5±5,2	14,6±2,3	12,1±2,7
Basófilo <sup>b</sup>	5,6±0,8	6,1±1,7	3,1±1,5
Monócito <sup>b</sup>	2,8±1,3	2,4±0,4	3,1±0,8
Linfócito <sup>b</sup>	72,1±5,5	75,1±2,4	81,5±3,4

Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). n=6/5/6 para quantidade total e monócitos e n=6/6/6 para eosinófilos, neutrófilos, basófilos e linfócitos. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls,  $p < 0,05$ . <sup>a</sup> Resultado expresso como média±erro padrão, em células/mm<sup>3</sup> de sangue. <sup>b</sup> Resultado expresso como média±erro padrão, em porcentagem de células.

#### *Rolamento e Adesão Leucocitários no Cólon*

A diminuição do infiltrado inflamatório, principalmente eosinófilos e neutrófilos, observada com a suplementação com tributirina pode ser influenciada pela migração leucocitária. Para avaliar esta possibilidade, microscopia intravital de cólon foi realizada para contagem de rolamento e adesão de leucócitos neste órgão.

Os resultados mostraram que a suplementação com tributirina não alterou o maior rolamento leucocitário visto com a indução da doença (Figura 33A), mas diminuiu a adesão de leucócitos (Figura 33B), levando a um estado intermediário entre os grupos controle e colite.

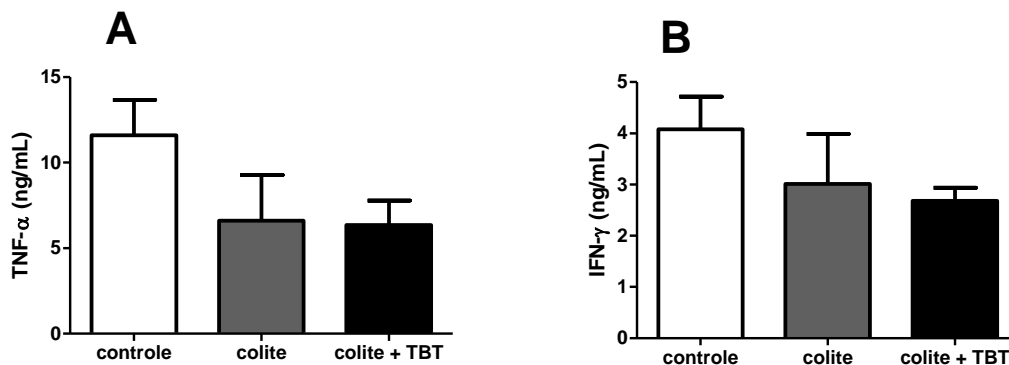


**Figura 33** - Rolamento (A) e adesão (B) leucocitária no cólon. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média $\pm$ erro padrão, em número de células/minuto (A) e em número de células aderidas/ $\mu\text{m}$  (B). n=3/3/3 para A e n=4/3/3 para B. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, p<0,05.

#### *Análise de Citocinas no Cólon*

Outro importante aspecto imune são as citocinas, que podem influenciar negativa ou positivamente no controle da inflamação, de acordo com um perfil pró ou anti-inflamatório. Para avaliação deste perfil, foram medidas concentração de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-17) e de citocinas anti-inflamatórias (TGF- $\beta$  e IL-10) em extrato de cólon dos animais.

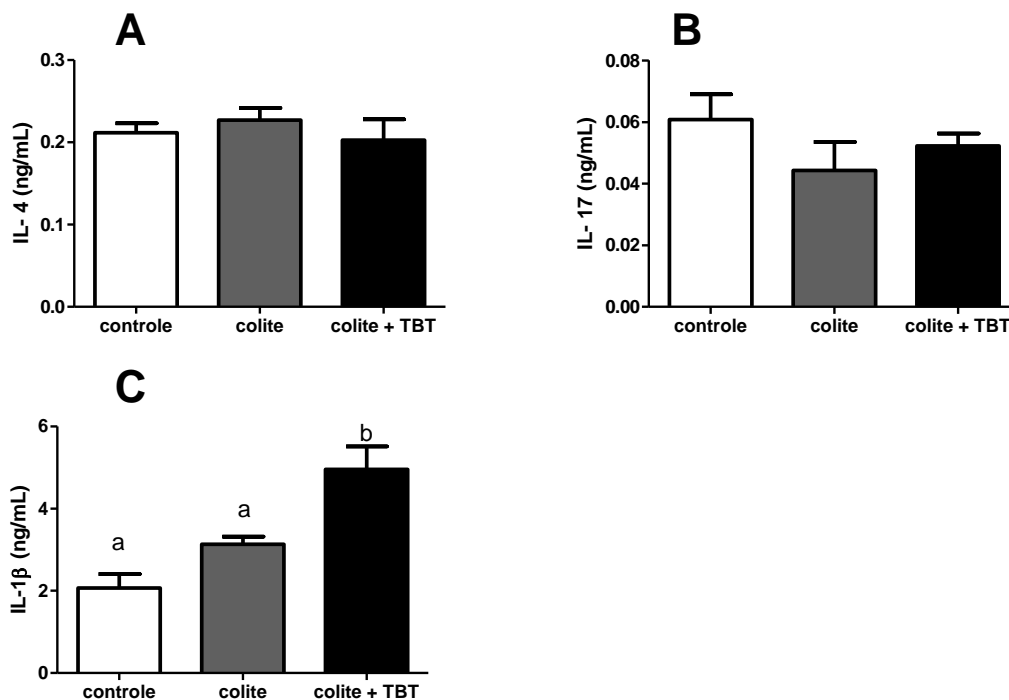
As concentrações de TNF- $\alpha$  e de IFN- $\gamma$  não foram diferentes entre os três grupos experimentais analisados (Figura 34A e B).



**Figura 34** – Concentração das citocinas TNF- $\alpha$  (A) e IFN- $\gamma$  (B) no cólon. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com

indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em ng de citocina/mL de extrato colônico. n=5/5/5 para cada citocina. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls,  $p < 0,05$ .

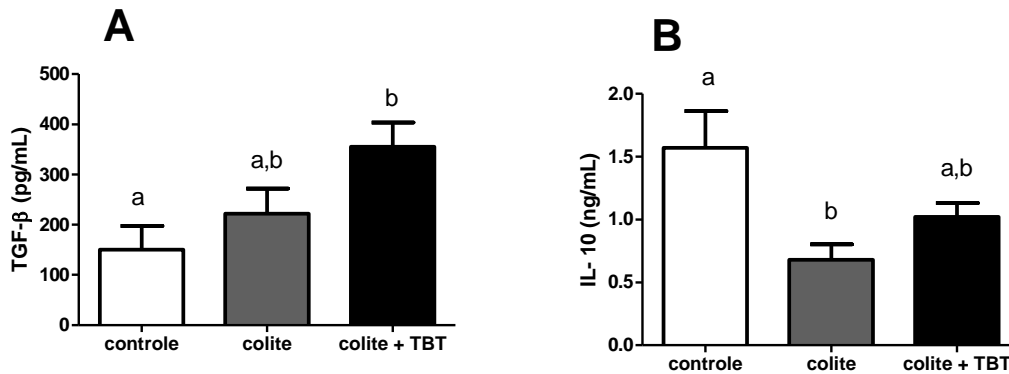
As concentrações de IL-4 e de IL-17 não foram diferentes nos três grupos estudados (Figura 35A e B), e o resultado de IL-1 $\beta$  mostra uma quantidade maior no grupo colite + TBT em relação aos grupos controle e colite (Figura 35C).



**Figura 35** – Concentração das citocinas IL- 4 (A), IL- 17 (B) e IL- 1 $\beta$  (C) no cólon. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). n= 5/5/5 para A e B e n= 6/6/6 para C. Resultado expresso como média±erro padrão, em ng de citocina/mL de extrato colônico. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística,  $p < 0,05$ .

A concentração de TGF- $\beta$  foi maior no grupo com suplementação com tributirina quando comparado ao grupo controle (Figura 36A). A determinação de IL-10 mostrou que o grupo colite apresenta uma quantidade diminuída desta citocina, quando comparado ao grupo controle, e que o grupo colite + TBT possui uma maior concentração desta, se igualando estatisticamente ao grupo

controle (Figura 36B). Este parece ser um efeito anti-inflamatório da tributirina, agindo no aumento destas duas citocinas potencialmente anti-inflamatórias.



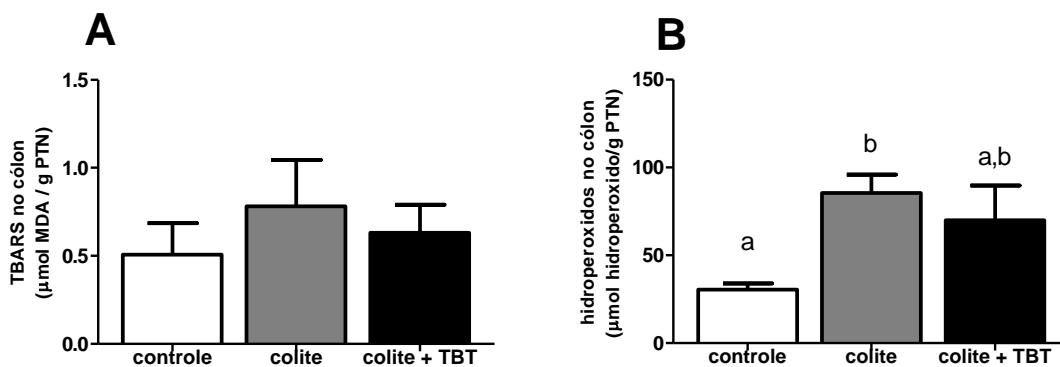
**Figura 36** – Concentração das citocinas TGF-β (A) e IL-10 (B) no cólon. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). n=5/6/6 para A e n=5/4/5 para B. Resultado expresso como média±erro padrão, em ng de citocina/mL de extrato colônico. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, p<0,05.

### Análise de Estresse Oxidativo no Cólon

O aumento do estresse oxidativo no cólon está ligado à inicialização e perpetuação da lesão e da inflamação na colite ulcerativa, e butirato tem potencial na modulação deste parâmetro (Abrahamse *et al.*, 1999; Rosignoli *et al.*, 2001; Damiani *et al.*, 2007; Naito *et al.*, 2007; Rezaie *et al.*, 2007). Como a tributirina teve ação na diminuição de eosinófilos e neutrófilos, células efetoras da inflamação em colite ulcerativa e também responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo pelas enzimas peroxidase de eosinófilos e mieloperoxidase, o próximo passo foi a avaliação do estresse oxidativo no cólon pela peroxidação lipídica, formação de hidroperóxidos e pela atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase.

### *Avaliação da peroxidação lipídica por TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e Dosagem da Concentração de Hidroperóxidos*

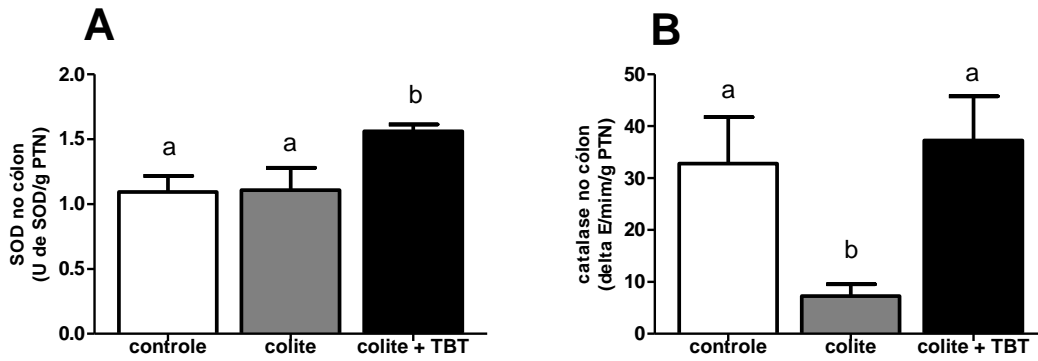
A peroxidação lipídica no cólon, analisada pela técnica de TBARS, não mostrou diferença entre os grupos experimentais (Figura 37A). Já a formação de hidroperóxidos apresentou-se elevada no grupo colite em relação ao controle e a suplementação com tributirina diminuiu este parâmetro, levando a um estado intermediário entre os grupos controle e colite (Figura 37B).



**Figura 37** - Análise da peroxidação lipídica por TBARS (A) e dosagem da concentração de hidroperóxidos (B) no cólon. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão em µmol de MDA/g de proteína (A) e em µmol de hidroperóxido/g de proteína (B). n=5/5/6 para A e n=4/4/4 para B. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, p<0,05.

### *Atividade da Enzima Superóxido Dismutase e Atividade da Enzima Catalase*

A atividade da enzima superóxido dismutase no cólon ficou aumentada no grupo colite + TBT em relação aos grupos controle e colite (Figura 38A), e a atividade da enzima catalase no mesmo órgão foi normalizada com a suplementação com tributirina (Figura 38B).



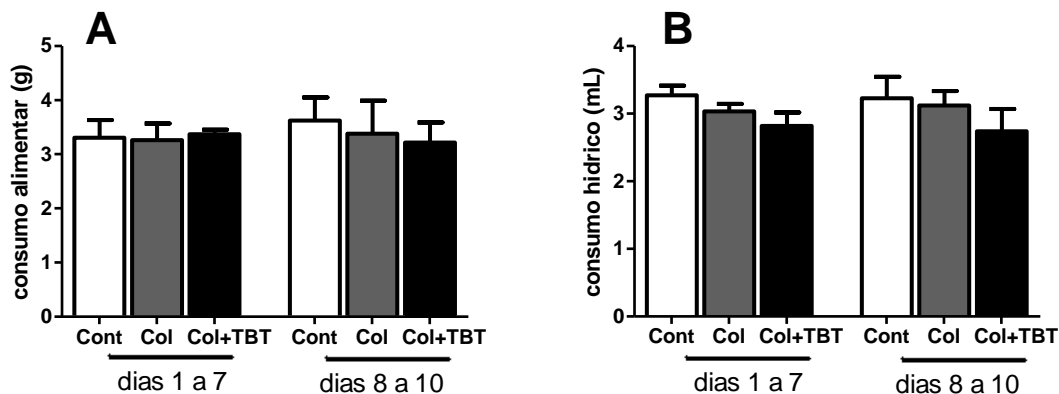
**Figura 38** - Atividade da superóxido dismutase (A) e da catalase (B) no cólon. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão em unidade de SOD/g de proteína (A) e em delta E/minuto/g de proteína (B). n=5/4/5 para A e n=4/5/6 para B. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística,  $p < 0,05$ .

Os resultados obtidos até aqui mostram que a suplementação com tributirina apresenta efeitos positivos na colite experimental, agindo na lesão da mucosa colônica, na diminuição da presença de eosinófilos e neutrófilos, que são importantes células efetoras em doenças inflamatórias intestinais, e também na diminuição do estresse oxidativo colônico, responsável pela perpetuação da inflamação e da lesão encontradas. Mas estes resultados não permitiram afirmar se a ação da tributirina seria na reestruturação da mucosa colônica, ou seja, se haveria lesão no local e a suplementação levaria a uma regeneração da mucosa, ou se a tributirina agiria na proteção desta lesão, impedindo que ela ocorresse. Para a determinação da forma de ação da tributirina foi realizado o experimento com oferecimento de DSS por 3 dias, que tornaria possível a análise da evolução da lesão antes do pico inflamatório, obtido com sete dias de administração de DSS.

## Avaliação da Ação da Tributirina Durante a Indução da Colite Experimental

### Consumo Alimentar e Consumo Hídrico

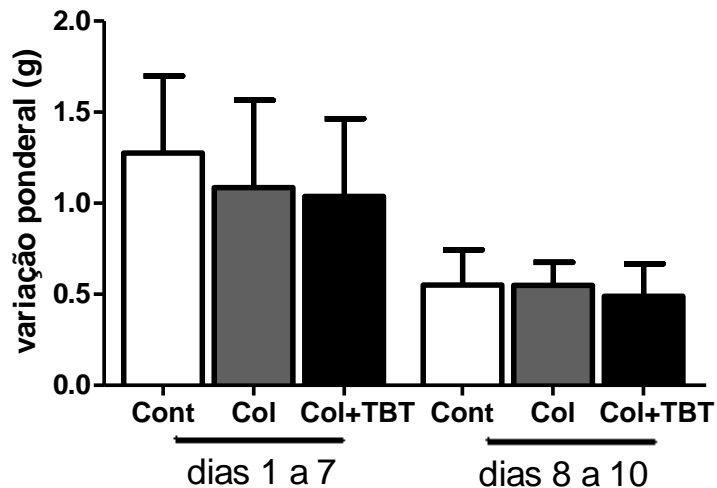
Na avaliação da ação da tributirina na evolução da lesão induzida por DSS não foram encontradas diferenças nos consumos alimentar e hídrico entre os três grupos estudados (Figura 39A e B).



**Figura 39** - Consumo alimentar (A) e consumo hídrico (B) com três dias de DSS. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em g/dia/animal (A) e em mL/dia/animal (B). n=3/3/3 para A e B. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls,  $p < 0,05$ .

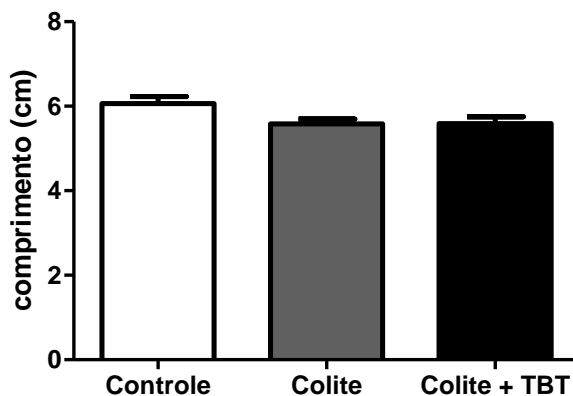
### Varição Ponderal e Comprimento do Cólon

A evolução ponderal dos animais não foi diferente nos três grupos, mostrando que com três dias de DSS ainda não há perda de peso ou menor ganho de peso comparado ao controle (Figura 40). A análise do comprimento do cólon não mostrou diferença entre os três grupos analisados (Figura 41).



**Figura 40-** Variação ponderal com três dias de DSS. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em gramas. n=12/14/14. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls,  $p<0,05$ .

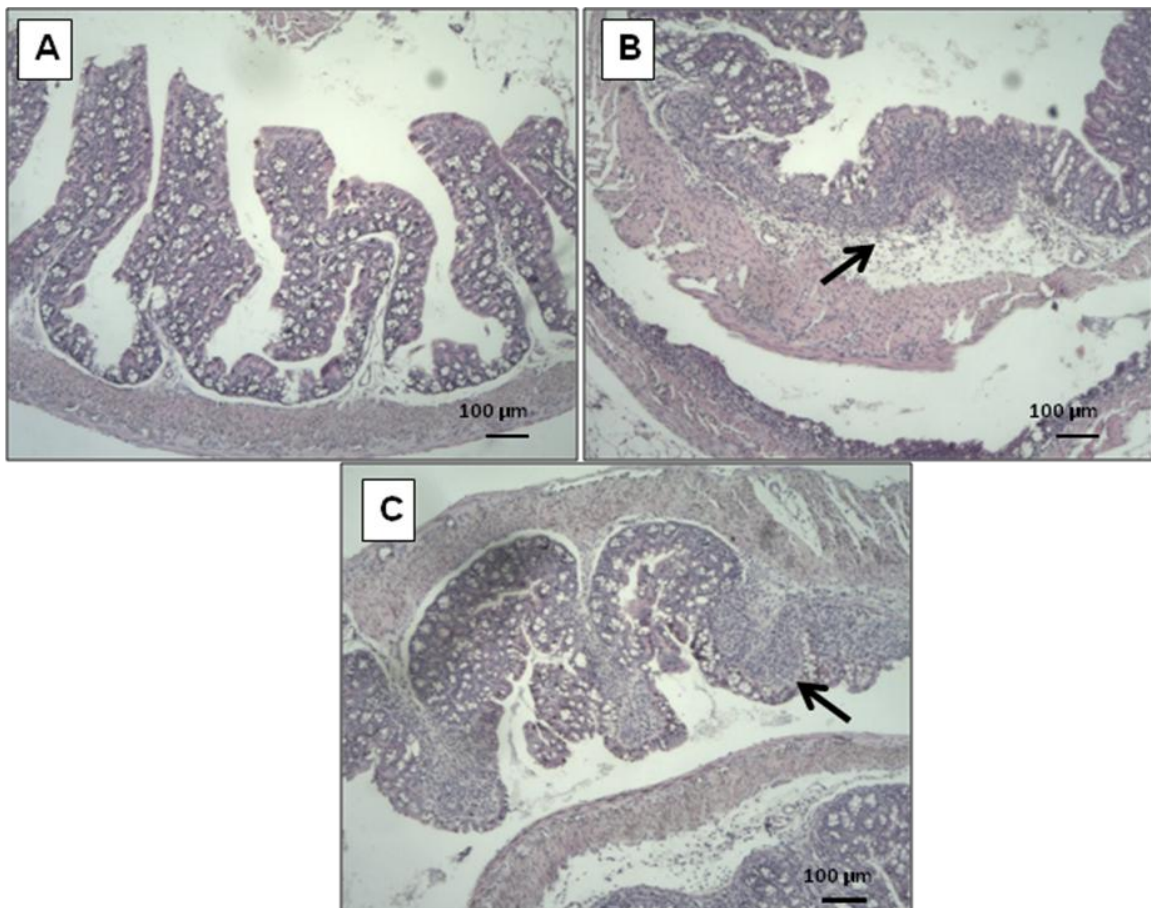
Os sinais clínicos ainda não mostraram indícios de presença da colite experimental. O próximo passo foi a avaliação histopatológica do cólon, que indicaria qual o nível de lesão já existente.



**Figura 41 –** Comprimento do cólon com três dias de DSS. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em centímetros. n=12/14/14. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls,  $p<0,05$ .

### Análise Histológica

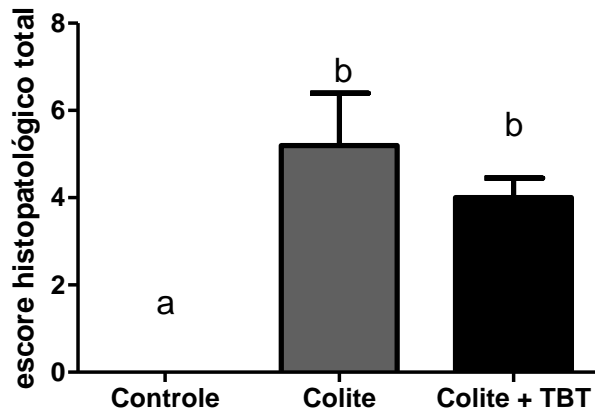
A análise histológica do cólon mostrou presença de lesão leve nos grupos com indução da doença. A Figura 42 apresenta o aspecto morfológico do órgão.



**Figura 42** – Aspecto morfológico do cólon com três dias de DSS. Quadro A: grupo controle, AIN-93M e sem indução de colite; quadro B: grupo colite, AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); quadro C: grupo colite + TBT, AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Aumento de 40 vezes.

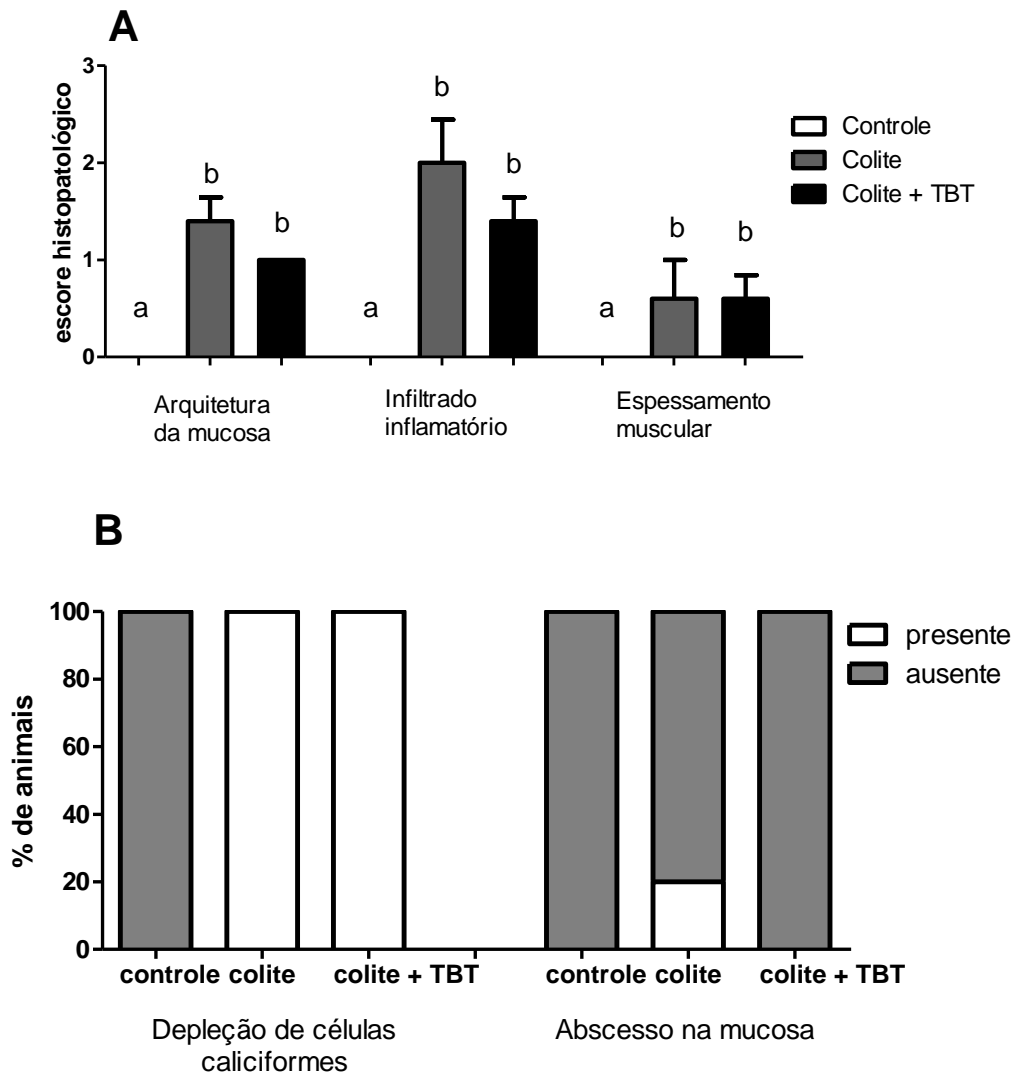
Analisando as imagens, observa-se que o grupo controle estava dentro dos padrões de normalidade, com arquitetura do cólon íntegra, presença de células caliciformes e ausência de infiltrado inflamatório na mucosa e submucosa. Já o grupo colite apresentou áreas com ulceração leve, depleção de células caliciformes em pequenas áreas da mucosa, sem abscessos das criptas, com espessamento da camada muscular, além de infiltrado inflamatório

moderado em algumas partes da mucosa. O grupo colite + TBT também apresentou áreas com ulceração leve e infiltrado inflamatório, indicando que a lesão ocorreu mesmo com a suplementação com tributirina. O escore histopatológico não se mostrou diferente entre os dois grupos com indução da colite experimental (Figura 43).



**Figura 43** – Escore histopatológico total do cólon com três dias de DSS. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média ± erro padrão. n=5/5/5. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística,  $p < 0,05$ .

A Figura 44A e B apresenta os itens usados no escore histopatológico, e o resultado confirma o escore total, no qual os grupos colite e colite + TBT são iguais estatisticamente.

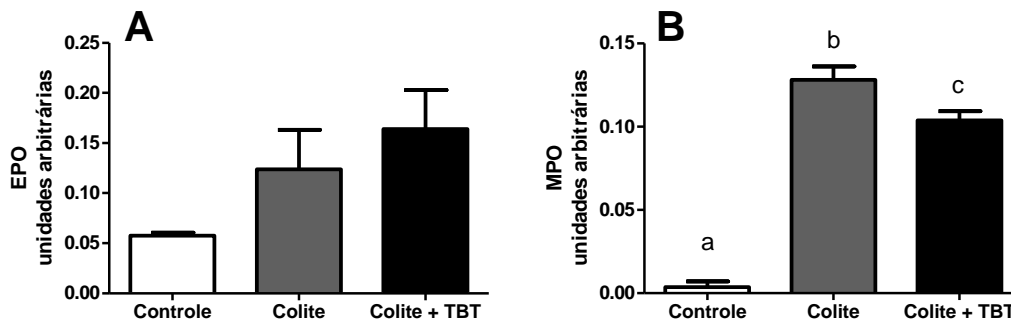


**Figura 44** – Itens usados no escore histopatológico do cólon com três dias de DSS. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão. n=5/5/5 para todos os itens. Teste: ANOVA Kruskal-Wallis e Dunns, p<0,05. Letras diferentes representam diferença estatística.

*Análise Indireta de Eosinófilos e Neutrófilos no Cólon*

A análise neste tempo experimental mostrou que a infiltração de eosinófilos (Figura 45A) não foi diferente entre os grupos, mas a infiltração de neutrófilos apresentou-se aumentada no grupo colite e intermediária no colite + TBT em relação ao controle (Figura 45B). Este resultado mostra que o efeito da

tributirina em neutrófilos é um evento anterior à melhora trófica observada com a suplementação com este nutriente.



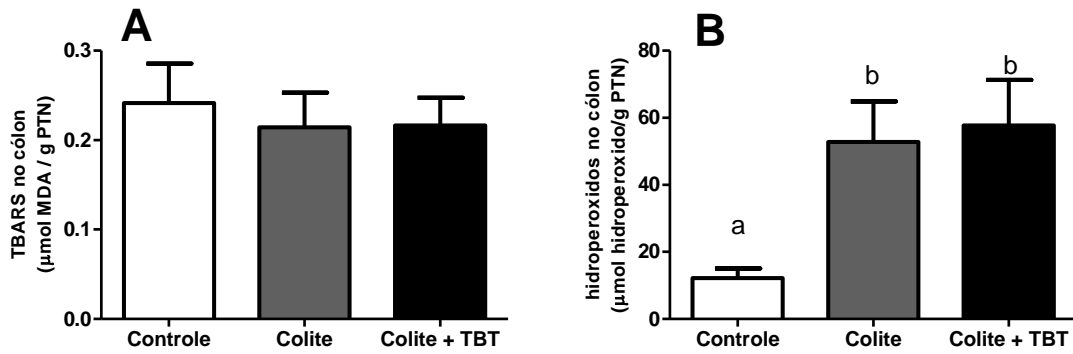
**Figura 45** - Análise indireta da presença de eosinófilos (A) e análise indireta da presença de neutrófilos (B) no cólon com três dias de DSS. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em unidades arbitrárias. n=3/6/6 para A e n=3/3/4 para B. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística,  $p < 0,05$ .

### Análise de Estresse Oxidativo no Cólon

O aumento da mieloperoxidase no cólon está ligado ao aumento do estresse oxidativo. Para avaliação deste parâmetro, foram dosadas, no cólon, peroxidação lipídica, formação de hidroperóxidos e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase.

### *Avaliação da peroxidação lipídica por TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e Dosagem da Concentração de Hidroperóxidos*

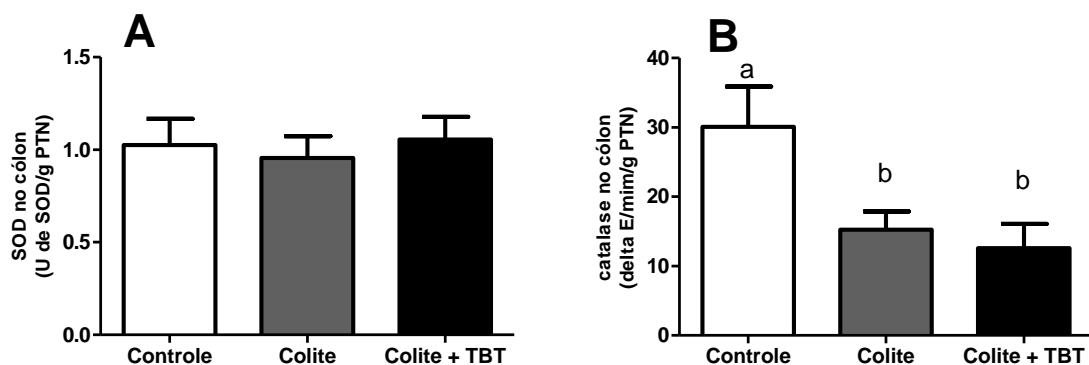
A peroxidação lipídica no cólon não foi diferente entre os grupos experimentais (Figura 46A), e a formação de hidroperóxidos mostrou-se elevada nos grupos com indução da doença em relação ao controle (Figura 46B), o que mostra que o aumento do estresse oxidativo no cólon tem importante papel na indução da lesão.



**Figura 46** - Análise de TBARS (A), e dosagem da concentração de hidroperóxidos (B) no cólon com três dias de DSS. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão, em µmol de MDA/g de proteína (A) e em µmol de hidroperóxidos/g de proteína (B). n=6/6/4 para A e n=5/3/5 para B. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, p<0,05.

*Atividade da Enzima Superóxido Dismutase e Atividade da Enzima Catalase*

A atividade da enzima superóxido dismutase no cólon não se mostrou alterada entre os grupos analisados (Figura 47A), mas a atividade da enzima catalase foi menor nos grupos com indução da colite em relação ao controle (Figura 47B).



**Figura 47** - Atividade da superóxido dismutase (A) e atividade da catalase (B) no cólon com três dias de DSS. Grupo controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 2% p/v); grupo colite + TBT: AIN-93M com suplementação de 0,5% de tributirina e com indução de colite (DSS 2% p/v). Resultado expresso como média±erro padrão em unidade

de SOD/g de proteína (A) e em delta E/minuto/g de proteína (B). n=8/8/8 para A e n=6/8/8 para B. Teste: ANOVA one-way e Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística,  $p < 0,05$ .

Os resultados dos experimentos com oferecimento de DSS por três dias mostram que há indução da lesão colônica no grupo com suplementação com tributirina. Assim, pode-se crer que este composto age na melhora desta lesão, atuando na regeneração da mucosa intestinal pela diminuição do estresse oxidativo e de células inflamatórias efetoras e ainda pelo aumento de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, age também por apresentar um efeito trófico, levando a metabolismo energético aumentado e maior divisão celular, uma vez que o butirato é a principal fonte energética para os colonócitos (Hallert *et al.*, 2003; Menzel *et al.*, 2004; Hamer *et al.*, 2008).

# Efeitos e Mecanismos de Ação da Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano

---

**Discussão**

### Discussão

Estudos mostram as ações positivas do butirato em diversas situações patológicas como câncer e doenças inflamatórias já há diversas décadas, mas seu uso clínico oral é extremamente limitado, se não ausente, por suas peculiaridades, que trazem odor incômodo, sabor amargo, náuseas, anorexia e, assim, baixíssima aceitabilidade (Pomare *et al.*, 1985; Jankowski *et al.*, 1994; Hallert *et al.*, 2003; Menzel *et al.*, 2004; Dianzani *et al.*, 2006; Gassull, 2006; Hamer *et al.*, 2008). Além disso, o butirato, tendo metabolismo rápido e meia vida curta, dificultaria a manutenção da concentração ideal no lúmen intestinal e obrigaria a ingestão diversas vezes ao dia, assim como é observado com o uso de enemas (Dianzani *et al.*, 2006; Gassull, 2006; Hamer *et al.*, 2008).

A tributirina, objeto de análise neste estudo, mostra ações positivas tanto quanto o butirato e possui a grande vantagem de, fisicamente, ser um óleo, o que facilitaria sua introdução via oral no uso clínico (Watkins *et al.*, 1999; Edelman *et al.*, 2003; Dianzani *et al.*, 2006; Gassull, 2006; Hamer *et al.*, 2008).

A colite experimental induzida por DSS tem como sinais clínicos perda ponderal, anorexia, redução do comprimento do cólon e sangramento anal (Okayasu *et al.*, 1990; Elson *et al.*, 1995; Wirtz & Neurath, 2007). Com o protocolo experimental de 15 dias, nossos dados mostram menor ganho de peso dos animais nos grupos com DSS na segunda semana de experimento, mas não foi observada alteração da ingestão alimentar, sugerindo que esta alteração ponderal foi pela indução da doença, que poderia ter levado a maior catabolismo devido à lesão e inflamação intestinal, como já demonstrado (Fukata *et al.*, 2007; Melgar *et al.*, 2007).

Os animais com indução de colite experimental apresentaram encurtamento de cólon semelhante, independente da suplementação com tributirina. Um estudo com camundongos que foram alimentados com dieta contendo fibra (3%) e inoculados com a bactéria *Eubacterium limosum*, capaz de aumentar a produção de butirato, mostrou melhora neste parâmetro clínico. Apesar de não termos encontrado este mesmo resultado, é preciso levar em conta que enquanto a nossa forma de administração foi oral, o estudo citado levou a produção local de butirato, o que justifica esta diferença encontrada (Kanauchi *et al.*, 2006).

Os resultados da análise histopatológica mostram o efeito trófico da tributirina no cólon, melhorando a estrutura colônica, diminuindo o tamanho e a intensidade da lesão. Como estudos mostram este mesmo efeito com o uso de butirato, (Scheppach, 1996; Ramos *et al.*, 1997; Kanauchi *et al.*, 1999a; Vieira *et al.*, 2011), a tributirina parece agir da mesma forma.

A análise histológica sugere que houve uma lesão inicial e que a suplementação com tributirina levou à regeneração da mucosa, uma vez que a parte apical da mucosa ainda apresenta algumas lesões e a parte basal se encontra íntegra. Como o butirato é a principal fonte de energia para os colonócitos e possui importante ação trófica, nossos resultados sugerem que o butirato foi usado para que houvesse metabolismo celular aumentado, maior divisão celular e, assim, reconstrução da mucosa lesada (Kanauchi *et al.*, 1999b; Videla *et al.*, 2001; Saemann *et al.*, 2002a; Hallert *et al.*, 2003; Menzel *et al.*, 2004; van Nuenen *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2008).

Juntamente com a ação trófica, observamos melhora na permeabilidade intestinal. O DTPA é usado para análise da permeabilidade paracelular, e observa-se que, com a reconstrução colônica e a melhora na arquitetura da mucosa obtida com a suplementação com tributirina, esta permeabilidade paracelular está se reconstituindo. Esta reconstrução pode ser pelo aumento, induzido pela tributirina, da expressão das proteínas das junções firme (Ohata *et al.*, 2005). A diminuição da permeabilidade intestinal com o uso de butirato já foi descrita, sempre ligada a seu efeito trófico (Kanauchi *et al.*, 1999b; Videla *et al.*, 2001; Kinoshita *et al.*, 2002; Saemann *et al.*, 2002a; Menzel *et al.*, 2004; van Nuenen *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2007; Hamer *et al.*, 2008).

Na análise do infiltrado inflamatório no cólon, observamos que a maior infiltração de eosinófilos e neutrófilos decorrente da indução da colite experimental foi atenuada pela suplementação com tributirina. Eosinófilos apresentam ação rápida na resposta imune, e por isso são chamados de sentinelas imunes efectoras, mas também estão envolvidos com efeitos deletérios em síndromes de hipersensibilidade, incluindo asma, dermatites e rinites alérgicas (Rothenberg *et al.*, 2001; Rothenberg, 2004; Barthel *et al.*, 2008). Em desordens intestinais, a maior parte das evidências demonstra acúmulo de eosinófilos no trato gastrointestinal, e este número aumentado está associado à perda de peso, má absorção, mudanças na arquitetura da mucosa

como achatamento das vilosidades e diminuição das criptas do cólon (Torpier *et al.*, 1988; Talley *et al.*, 1992; Rothenberg *et al.*, 2001; Rothenberg, 2004). Levando em consideração a importância deste tipo celular no aumento da inflamação e do estresse oxidativo, pela enzima peroxidase de eosinófilos, a diminuição obtida no grupo colite + TBT mostra a ação eficiente da tributirina na diminuição da inflamação local, que levaria à melhora da mucosa, lesada pela presença de DSS.

Neutrófilos são outro importante tipo celular com ação efetora no trato gastrointestinal e agem através da liberação de componentes tóxicos, como a enzima mieloperoxidase, causando a morte de patógenos (Naito *et al.*, 2007; Vinolo *et al.*, 2011). Apesar desta importante ação na proteção do trato gastrointestinal, estudos com colite experimental induzida por DSS mostram grande migração de neutrófilos no cólon e demonstram que estas células são responsáveis pelo extensivo dano tissular, devido à liberação dos mesmos componentes tóxicos e radicais livres usados na morte de patógenos (Elson *et al.*, 1995; Naito *et al.*, 2007; Wirtz & Neurath, 2007). Assim, diminuição deste tipo celular no cólon com colite é bom prognóstico. Nossos dados mostram efeito da tributirina em neutrófilos, sendo capaz de diminuir sua presença neste estudo. Este resultado está de acordo com vários estudos, que mostram efeito do butirato neste tipo celular. Analisando isquemia e reperfusão intestinal em ratos wistar, a infusão intraluminal de ácidos graxos de cadeia curta protegeu a mucosa e diminuiu o infiltrado de neutrófilos na lâmina própria do cólon após 15 minutos de isquemia (Aguilar-Nascimento *et al.*, 2006). Outro estudo mostrou que o tratamento com enemas de butirato, após indução de colite experimental por DSS em ratos, reduziu o número de neutrófilos na lâmina própria (Venkatraman *et al.*, 2003). Estudo em nosso laboratório também mostrou efeito do butirato via oral neste tipo celular, melhorando inflamação e dano da mucosa (Vieira *et al.*, 2011).

A migração de leucócitos para o foco inflamatório é dependente do rolamento e da adesão das células inflamatórias no endotélio vascular. Nossos resultados mostram uma menor adesão leucocitária nos vasos do cólon nos animais do grupo colite + TBT comparado com os não suplementados. A adesão de leucócitos a receptores específicos nos vasos endoteliais, como selectinas, VCAM-1 e ICAM-1, fazem com que os leucócitos se fixem com

firmeza ao endotélio e migrem através dos espaços interendoteliais até o foco da inflamação (Abbas *et al.*, 2008). Em concordância com nossos resultados, vários estudos mostram que o número destas moléculas de adesão está aumentado na colite ulcerativa. Além disso, estudos mostram também que a ação do butirato na adesão celular está ligada a sua capacidade de diminuição da expressão de moléculas de adesão como VCAM-1 e ICAM-1 (Viney *et al.*, 1996; Connor *et al.*, 1999; Menzel *et al.*, 2004; Zapolska-Downar *et al.*, 2004). Nossos resultados mostram que apesar de a suplementação com tributirina não ter normalizado o rolamento leucocitário, foi capaz de diminuir a adesão celular, o que possivelmente contribuiu para a redução de neutrófilos e eosinófilos no cólon.

Macrófagos, além de terem importantes funções de fagocitose de microorganismos, são apresentadores de antígenos essenciais no sistema digestivo e ainda apresentam papel interessante na fagocitose do DSS na colite experimental, retirando este composto do meio intestinal (Okayasu *et al.*, 1990). A análise do perfil leucocitário da lâmina própria mostrou que a tributirina teve efeito no aumento de macrófagos ativados em relação ao controle, que pode ajudar no controle da inflamação pelo maior sequestro de DSS do meio colônico, diminuindo o efeito tóxico deste composto na mucosa intestinal.

Macrófagos também são produtores de IL-1 $\beta$ , o que justifica a maior concentração desta citocina no grupo colite + TBT. Esta citocina, apesar de importante mediadora pró-inflamatória, apresenta também efeitos na diferenciação celular e no remodelamento tissular (Ligumsky *et al.*, 1990; Al-Sadi & Ma, 2007). Assim, o aumento da concentração de IL-1 $\beta$  no grupo colite + TBT além dos níveis observados no grupo colite, associado à menor inflamação e maior integridade do cólon sugerem que a função da IL-1 $\beta$  seria principalmente na reestruturação da mucosa intestinal e não como agente pró-inflamatório.

Nossos resultados mostram maior presença de linfócito T regulador FOXP3 positivo na lâmina própria de animais com colite experimental, independente da suplementação com tributirina. Este subtipo de células T é muito importante para manutenção da homeostase intestinal e para controle de distúrbios inflamatórios (Singh *et al.*, 2001; Round & Mazmanian, 2010). Estas

células agem suprimindo células apresentadoras de antígenos, seja por ação citotóxica ou pela produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$  (Dejaco *et al.*, 2005; Izcue *et al.*, 2006). Assim, o aumento da população positiva para FOXP3 nos grupos com colite experimental sugere uma tentativa do organismo de controlar a inflamação estabelecida.

Além das células FOXP3 positivas, nós avaliamos também aquelas LAP positivas, e observamos que a suplementação com tributirina aumentou a porcentagem de células com este marcador na lâmina própria. As células T reguladoras LAP positivas são induzidas pela presença de TGF- $\beta$ , pois o LAP faz parte da molécula de pró-TGF- $\beta$  (Oida & Weiner, 2010). O TGF- $\beta$ , por sua vez, é uma citocina pleiotrópica produzida por quase todos os tipos celulares. Acreditamos que um dos mecanismos anti-inflamatórios da tributirina seja a indução de TGF- $\beta$  no cólon, levando, assim, ao aumento dos linfócitos T reguladores LAP positivo. O TGF- $\beta$  apresenta importantes ações no controle da inflamação, incluindo supressão de resposta Th1 e de linfócitos citotóxicos, e inibição da proliferação e diferenciação de linfócitos T CD4. Todas estas ações contribuem para a prevenção e o controle de doenças inflamatórias intestinais (Becker *et al.*, 2006; Oida & Weiner, 2010).

Juntamente com o aumento de TGF- $\beta$ , houve aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 para níveis semelhantes aos do grupo controle. Nossos dados estão de acordo com estudos publicados, que mostram modulação desta citocina com o uso do butirato (Serpe *et al.*, 2010; Vinolo *et al.*, 2011). Esta citocina apresenta inúmeras ações anti-inflamatórias como inibição de produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , inibição da apresentação de antígenos e da proliferação de linfócitos T CD4 (Li & He, 2004). Além disso, IL-10 é crucial para a integridade colônica, uma vez que animais nocautes para esta citocina desenvolvem naturalmente o quadro de colite ulcerativa (McCafferty *et al.*, 2000; Specht *et al.*, 2006).

No nosso estudo não foram detectadas alterações significativas nas citocinas pro-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-4 entre os grupos analisados. Porém, um estudo anterior demonstrou aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em colite experimental induzida em coelhos (Kaneda *et al.*, 2011). Estudo anterior do nosso grupo também acena para o aumento destas citocinas, porém em modelo de colite experimental crônica

induzida por DSS e não em colite aguda como descrito no atual estudo. Neste estudo com colite experimental crônica, o aumento destas citocinas ocorreu após dois períodos de administração de DSS e não apenas um, como ocorreu no atual estudo (Teixeira *et al.*, 2011). Estas diferenças entre os modelos de colite podem ser os responsáveis pela falta de concordância entre os resultados.

Alguns estudos mostram a ação do butirato na redução de IL-8, IL-12 e TNF- $\alpha$ , esta última dosada também no nosso estudo (Huang *et al.*, 1997; Saemann *et al.*, 2000; Sanderson, 2004; Serpe *et al.*, 2010; Vinolo *et al.*, 2011). Esses estudos foram feitos em sua maioria em culturas *in vitro* de um único tipo celular (em geral neutrófilos) após estimulação com LPS. Talvez nossos dados sejam discrepantes dos encontrados na literatura por características do comportamento *in vivo* das células do sistema imune devido às interações entre elas, assim como pelo tempo experimental usado, ou ainda por diferenças nos métodos utilizados.

Nossos dados mostram estabelecimento do estresse oxidativo no grupo colite, com aumento da presença de hidroperóxidos, aumento da atividade da mieloperoxidase de neutrófilos e da peroxidase de eosinófilos, e ainda diminuição da atividade da catalase. Eosinófilos e neutrófilos são células efetoras com importância fundamental na colite ulcerativa (Rothenberg *et al.*, 2001; Forbes *et al.*, 2004; Rothenberg, 2004; Naito *et al.*, 2007; Xavier & Podolsky, 2007). Estas células, primeiras a serem ativadas pelo sistema imune, migram até o local da lesão e, pelo *burst* respiratório, aumentam a quantidade de oxigênio no meio, que, por ação da NADPH oxidase, produz ânions superóxidos. Estes, por sua vez, reagem com a enzima superóxido dismutase, levando à produção de peróxido de hidrogênio. Em condições normais, em que não há este *burst* respiratório, essas reações ocorrem, em menor intensidade, e o peróxido de hidrogênio é catalisado, via catalase ou glutathione peroxidase, em água e oxigênio, levando à manutenção do equilíbrio entre produção de espécies reativas e sistema antioxidante. Porém, em condições patológicas, que levam à infiltração de neutrófilos e eosinófilos, este peróxido de hidrogênio, na presença de íons cloro ou bromo, é catalisado pelas enzimas do sistema peroxidase, como mieloperoxidase e peroxidase de eosinófilos, levando a produção de ácido hipocloroso (HOCl) ou ácido hipobromoso (HOBr), potentes

oxidantes de membranas. Esse é um dos mecanismos de ação destas células na defesa contra patógenos, que serão atacados por esses radicais livres e terão as membranas celulares danificadas, levando-os à morte (Martins, 2010). Mas, nas grandes infiltrações, como na colite ulcerativa, esses radicais livres atacam também as membranas das células colônicas, levando a aumento do dano tissular, o que leva também a aumento da inflamação, perpetuando a condição patológica (Rothenberg *et al.*, 2001; Rothenberg, 2004; Naito *et al.*, 2007). A tributirina teve ação importante no controle desse estresse oxidativo, com diminuição das enzimas mieloperoxidase e peroxidase de eosinófilos, diminuição na formação de hidroperóxidos e ainda aumento da atividade da superóxido dismutase e normalização da atividade da catalase. Estudos mostram o potencial efeito do butirato no controle do estresse oxidativo. Este efeito parece ser por controle gênico, via acetilação de histonas, aumentando transcrição das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase, não analisada neste estudo, e catalase, que levaria à diminuição da produção de HOCl<sup>-</sup> possivelmente por competição direta por substrato, resultando em menor dano tissular. Além disso, esta modulação gênica garantiria maior acesso às enzimas de reparo ao DNA, diminuindo e evitando danos e erros no funcionamento e na estrutura celular (Abrahamse *et al.*, 1999; Rosignoli *et al.*, 2001; Yin *et al.*, 2001; Sauer *et al.*, 2007; Kien *et al.*, 2008).

Os resultados discutidos até agora mostram a melhora da colite experimental aguda com a suplementação com tributirina, com melhora da lesão da mucosa colônica, efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Estes resultados poderiam abrir as possibilidades de aplicação deste nutriente para uso terapêutico em pacientes com colite ulcerativa.

Nosso próximo passo foi a determinação da forma de ação da tributirina nesta doença inflamatória intestinal. A primeira pergunta nesta etapa do trabalho foi quanto à lesão presente no cólon; apesar dos achados histológicos indicarem uma lesão prévia seguida da reestruturação da mucosa, ainda existia a dúvida se a tributirina teria efeito na proteção, evitando que essa lesão ocorresse como no grupo colite, ou se a tributirina teria efeito terapêutico, induzindo a mais rápida regeneração da mucosa, reestruturando-a após a lesão. A segunda pergunta foi quanto ao parâmetro modulado por esta suplementação; como a tributirina mostrou um efeito muito interessante na

melhora dos parâmetros de estresse oxidativo e da infiltração de neutrófilos e eosinófilos, essas mesmas análises foram realizadas com este segundo protocolo experimental.

O protocolo de colite experimental aguda com ingestão de DSS por sete dias mostra que este é um período ideal para a indução da lesão, instalação da inflamação e aparecimento de sinais clínicos observados em humanos. O período experimental com 3 dias de oferecimento de DSS foi escolhido para que os animais tivessem suplementação com tributirina anterior à indução da doença pelo mesmo tempo do primeiro protocolo, e tivessem ingestão de DSS por três dias, ou seja, a lesão na mucosa estaria no início, e a inflamação e o estresse oxidativo ainda não estariam totalmente instalados. Isso nos permitiria avaliar a evolução da doença e a ação da suplementação com tributirina nesta evolução.

Estudos anteriores mostram que os sinais clínicos da colite experimental induzida por DSS começam a se estabelecer já no primeiro dia de ingestão deste composto culminando por volta do quinto dia de ingestão de DSS, quando a perda de peso e as alterações do comprimento do cólon podem ser notadas (Okayasu *et al.*, 1990; Fritsch Fredin *et al.*, 2007; Melgar *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2009). Nossos resultados mostram concordância com estes estudos, uma vez que a evolução ponderal e o comprimento do cólon estavam alterados após 7 dias, mas não após 3 dias de DSS.

A análise histopatológica após três dias de DSS comprovou que há desenvolvimento de lesão tanto no grupo colite quanto no grupo com suplementação, indicando que a tributirina não evitou que a lesão intestinal ocorresse, agindo na reconstrução e não na preservação da mucosa colônica.

Em relação ao estresse oxidativo, após três dias de DSS já ocorrem aumento de hidróperóxidos, da atividade de mieloperoxidase e diminuição da atividade da catalase em ambos os grupos com indução de colite experimental. Os dados sugerem que, além do estresse oxidativo ter papel essencial no aparecimento e na perpetuação da lesão, a ação efetiva da tributirina se dá após a instalação da lesão através da modulação deste parâmetro, iniciando com a redução da mieloperoxidase e, conseqüentemente, a menor migração de neutrófilos, e da normalização da atividade da catalase.

# Efeitos e Mecanismos de Ação da Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano

---

**Conclusão**

### Conclusão

A suplementação com tributirina na colite experimental aguda apresentou efeitos positivos no cólon, diminuindo infiltrado inflamatório de eosinófilos e neutrófilos e também a adesão leucocitária, aumentando população de linfócito T regulador LAP positivo, aumentando citocinas anti-inflamatórias TGF- $\beta$  e IL-10, e ainda aumentando atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase. Estes efeitos culminaram na melhora da arquitetura da mucosa e diminuição da permeabilidade intestinal.

Além disso, nós mostramos que a tributirina não protege a mucosa da lesão por DSS, mas age na reestruturação e reconstrução da mucosa lesada através da modulação do estresse oxidativo, agindo no aumento das enzimas antioxidantes, e através da modulação do infiltrado inflamatório, agindo na diminuição da presença de eosinófilos e neutrófilos.

# Efeitos e Mecanismos de Ação da Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano

---

## Referências Bibliográficas

### Referências Bibliográficas

- Abbas AK, Lichtman AH & Pillai S (2008) *Imunologia celular e molecular*, 6 ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Abrahamse SL, Pool-Zobel BL & Rechkemmer G (1999) Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis* **20**, 629-634.
- Aguilar-Nascimento JE, Salomao AB, Nochi RJ, Jr., Nascimento M & Neves Jde S (2006) Intraluminal injection of short chain fatty acids diminishes intestinal mucosa injury in experimental ischemia-reperfusion. *Acta Cir Bras* **21**, 21-25.
- Al-Sadi RM & Ma TY (2007) IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol* **178**, 4641-4649.
- Allison TJ & Garboczi DN (2002) Structure of gammadelta T cell receptors and their recognition of non-peptide antigens. *Molecular Immunology* **38**, 1051-1061.
- Anderson JD, Lowary PT & Widom J (2001) Effects of histone acetylation on the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *J Mol Biol* **307**, 977-985.
- Andres PG & Friedman LS (1999) Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* **28**, 255-281, vii.
- Andriamihaja M, Tome D & Blachier FCP (2008) Butyrate metabolism in human colon carcinoma cells: Implications concerning its growth-inhibitory effect. *Journal of Cellular Physiology* **218**, 58-65.
- Aratani Y (2006) [Role of myeloperoxidase in the host defense against fungal infection]. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* **47**, 195-199.
- Archer SY & Hodin RA (1999) Histone acetylation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 171-174.
- Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL & Powrie F (1999) An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* **190**, 995-1004.
- Baeuerle PA (1998) IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control. *Cell* **95**, 729-731.
- Banerjee D, Kumar PA, Kumar B, Madhusoodanan UK, Nayak S & Jacob J (2002) Determination of absolute hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method. *Current Science* **83**.
- Barcelo A, Claustre J, Moro F, Chayvialle J, Cuber J & Plaisancie P (2000) Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut* **46**, 218-224.
- Barthel SR, Johansson MW, McNamee DM & Mosher DF (2008) Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *J Leukoc Biol* **83**, 1-12.
- Becker C, Fantini MC & Neurath MF (2006) TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**, 97-106.
- Berg DJ, Zhang J, Weinstock JV, Ismail HF, Earle KA, Alila H, Pamukcu R, Moore S & Lynch RG (2002) Rapid development of colitis in NSAID-treated IL-10-deficient mice. *Gastroenterology* **123**, 1527-1542.
- Bischoff SC, Mayer J, Nguyen QT, Stolte M & Manns MP (1999) Immunohistological assessment of intestinal eosinophil activation in patients with eosinophilic

- gastroenteritis and inflammatory bowel disease. *The American Journal of Gastroenterology* **94**, 3513.
- Blumberg RS, Saubermann LJ & Strober W (1999) Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol* **11**, 648-656.
- Blumberg RS & Strober W (2001) Prospects for research in inflammatory bowel disease. *JAMA* **285**, 643-647.
- Bouma G & Strober W (2003) The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* **3**, 521-533.
- Breuer RI, Soergel KH, Lashner BA, Christ ML, Hanauer SB, Vanagunas A, Harig JM, Keshavarzian A, Robinson M, Sellin JH, Weinberg D, Vidican DE, Flemal KL & Rademaker AW (1997) Short chain fatty acid rectal irrigation for left-sided ulcerative colitis: a randomised, placebo controlled trial. *Gut* **40**, 485-491.
- Buege JA & Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* **52**, 302-310.
- Cara DC, Negrao-Correa D & Teixeira MM (2000) Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance in vivo. *Histol Histopathol* **15**, 899-920.
- Cavaglieri CR, Nishiyama A, Fernandes LC, Curi R, Miles EA & Calder PC (2003) Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sci* **73**, 1683-1690.
- Chai F, Evdokiou A, Young GP & Zalewski PD (2000) Involvement of p21(Waf1/Cip1) and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate. *Carcinogenesis* **21**, 7-14.
- Chakravorty D, Koide N, Kato Y, Sugiyama T, Mu MM, Yoshida T & Yokochi T (2000) The inhibitory action of butyrate on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 murine macrophage cells. *J Endotoxin Res* **6**, 243-247.
- Connor EM, Eppihimer MJ, Morise Z, Granger DN & Grisham MB (1999) Expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in acute and chronic inflammation. *J Leukoc Biol* **65**, 349-355.
- Cook SI & Sellin JH (1998) Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther* **12**, 499-507.
- Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, Uhlig HH & Powrie F (2005) Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunological Reviews* **204**, 184-194.
- Cotran RS, Kumar V & Robbins SL (1996) *Patologia estrutural e funcional*, 5ª ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Crinelli R, Bianchi M, Gentilini L, Magnani M & Hiscott J (1999) Activation of the ubiquitin proteolytic system in murine acquired immunodeficiency syndrome affects IkappaBalpha turnover. *Eur J Biochem* **263**, 202-211.
- Damiani CR, Benetton CA, Stoffel C, Bardini KC, Cardoso VH, Di Giunta G, Pinho RA, Dal-Pizzol F & Streck EL (2007) Oxidative stress and metabolism in animal model of colitis induced by dextran sulfate sodium. *J Gastroenterol Hepatol* **22**, 1846-1851.
- Davie JR (1997) Nuclear matrix, dynamic histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Mol Biol Rep* **24**, 197-207.
- Dejaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B & Schirmer M (2005) Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune disease. *Immunobiology* **117**, 289-300.
- Diakos C, Prieschl EE, Saemann MD, Bohmig GA, Csonga R, Sobanov Y, Baumruker T & Zlabinger GJ (2006) n-Butyrate inhibits Jun NH(2)-terminal kinase

- activation and cytokine transcription in mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* **349**, 863-868.
- Dianzani C, Cavalli R, Zara GP, Gallicchio M, Lombardi G, Gasco MR, Panzanelli P & Fantozzi R (2006) Cholesteryl butyrate solid lipid nanoparticles inhibit adhesion of human neutrophils to endothelial cells. *Br J Pharmacol* **148**, 648-656.
- Dieterich S, Bieligk U, Beulich K, Hasenfuss G & Prestle J (2000) Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* **101**, 33-39.
- Dohi T & Fujihashi K (2006) Type 1 and 2 T helper cell-mediated colitis. *Curr Opin Gastroenterol* **22**, 651-657.
- dos Santos MP, Schwartzmann G, Roesler R, Brunetto AL & Abujamra AL (2009) Sodium butyrate enhances the cytotoxic effect of antineoplastic drugs in human lymphoblastic T-cells. *Leuk Res* **33**, 218-221.
- Dourado LP, Noviello Mde L, Alvarenga DM, Menezes Z, Perez DA, Batista NV, Menezes GB, Ferreira AV, de Souza Dda G & Cara DC (2011) Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice. *Cell Immunol* **270**, 198-206.
- Dubuquoy L, Rousseaux C, Thuru X, Peyrin-Biroulet L, Romano O, Chavatte P, Chamaillard M & Desreumaux P (2006) PPAR-gamma as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut* **55**, 1341-1349.
- Duncan SH, Barcenilla A, Stewart CS, Pryde SE & Flint HJ (2002) Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA):acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5186-5190.
- Edelman MJ, Bauer K, Khanwani S, Tait N, Trepel J, Karp J, Nemieboka N, Chung EJ & Van Echo D (2003) Clinical and pharmacologic study of tributyrin: an oral butyrate prodrug. *Cancer Chemother Pharmacol* **51**, 439-444.
- Egorin MJ, Yuan ZM, Sentz DL, Plaisance K & Eiseman JL (1999) Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats. *Cancer Chemother Pharmacol* **43**, 445-453.
- Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS & Riddell RH (1995) Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **109**, 1344-1367.
- Finnie IA, Dwarakanath AD, Taylor BA & Rhodes JM (1995) Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut* **36**, 93-99.
- Forbes E, Murase T, Yang M, Matthaeki KI, Lee JJ, Lee NA, Foster PS & Hogan SP (2004) Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. *The Journal of Immunology* **172**, 5664-5675.
- Fritsch Fredin M, Elgbratt K, Svensson D, Jansson L, Melgar S & Hultgren Hornquist E (2007) Dextran sulfate sodium-induced colitis generates a transient thymic involution--impact on thymocyte subsets. *Scand J Immunol* **65**, 421-429.
- Fukata M, Chen A, Vamadevan AS, Cohen J, Breglio K, Krishnareddy S, Hsu D, Xu R, Harpaz N, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K, Cooper HS, Itzkowitz SH & Abreu MT (2007) Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology* **133**, 1869-1881.
- Gardner E, Gray DJ & O'Rahilly. (1971) *Anatomia - Estudo Regional do Corpo Humano*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Garside P, Mowat AM & Khoruts A (1999) Oral tolerance in disease. *Gut* **44**, 137-142.
- Gassull MA (2006) Review article: the intestinal lumen as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **24**, 90-95.

- Haller D (2006) Intestinal epithelial cell signalling and host-derived negative regulators under chronic inflammation: to be or not to be activated determines the balance towards commensal bacteria. *Neurogastroenterol Motil* **18**, 184-199.
- Hallert C, Bjorck I, Nyman M, Pousette A, Granno C & Svensson H (2003) Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet: controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis* **9**, 116-121.
- Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ & Brummer RJ (2008) Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* **27**, 104-119.
- Hatakeyama S, Kitagawa M, Nakayama K, Shirane M, Matsumoto M, Hattori K, Higashi H, Nakano H, Okumura K, Onoe K & Good RA (1999) Ubiquitin-dependent degradation of IkappaBalpha is mediated by a ubiquitin ligase Skp1/Cul 1/F-box protein FWD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3859-3863.
- Heerdt BG, Houston MA & Augenlicht LH (1994) Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res* **54**, 3288-3293.
- Hendrickson BA, Gokhale R & Cho JH (2002) Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* **15**, 79-94.
- Hinnebusch BF, Meng S, Wu JT, Archer SY & Hodin RA (2002) The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr* **132**, 1012-1017.
- Hond ED, Hiele M, Evenepoel P, Peeters M, Ghos Y & Rutgeerts P (1998) In vivo butyrate metabolism and colonic permeability in extensive ulcerative colitis. *Gastroenterology* **115**, 584-590.
- Hove H & Mortensen PB (1995) Influence of intestinal inflammation (IBD) and small and large bowel length on fecal short-chain fatty acids and lactate. *Dig Dis Sci* **40**, 1372-1380.
- Huang N, Katz JP, Martin DR & Wu GD (1997) Inhibition of IL-8 gene expression in Caco-2 cells by compounds which induce histone hyperacetylation. *Cytokine* **9**, 27-36.
- Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard AK, Rosenberg DW & Giardina C (2000) The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* **118**, 724-734.
- Isono A, Katsuno T, Sato T, Nakagawa T, Kato Y, Sato N, Seo G, Suzuki Y & Saito Y (2007) Clostridium butyricum TO-A culture supernatant downregulates TLR4 in human colonic epithelial cells. *Dig Dis Sci* **52**, 2963-2971.
- Izcue A, Coombes JL & Powrie F (2006) Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev* **212**, 256-271.
- Janeway CA, Travers P, Walport M & Shlomchik MJ (2002) *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. Porto Alegre: Artmed.
- Jankowski JA, Goodlad RA & Wright NA (1994) Maintenance of normal intestinal mucosa: function, structure, and adaptation. *Gut* **35**, S1-4.
- Jeziorska M, Haboubi N, Schofield P & Woolley DE (2001) Distribution and activation of eosinophils in inflammatory bowel disease using an improved immunohistochemical technique. *J Pathol* **194**, 484-492.
- Kanauchi O, Andoh A, Iwanaga T, Fujiyama Y, Mitsuyama K, Toyonaga A & Bamba T (1999a) Germinated barley foodstuffs attenuate colonic mucosal damage and mucosal nuclear factor kappa B activity in a spontaneous colitis model. *J Gastroenterol Hepatol* **14**, 1173-1179.

- Kanauchi O, Fukuda M, Matsumoto Y, Ishii S, Ozawa T, Shimizu M, Mitsuyama K & Andoh A (2006) Eubacterium limosum ameliorates experimental colitis and metabolite of microbe attenuates colonic inflammatory action with increase of mucosal integrity. *World J Gastroenterol* **12**, 1071-1077.
- Kanauchi O, Iwanaga T, Mitsuyama K, Saiki T, Tsuruta O, Noguchi K & Toyonaga A (1999b) Butyrate from bacterial fermentation of germinated barley foodstuff preserves intestinal barrier function in experimental colitis in the rat model. *J Gastroenterol Hepatol* **14**, 880-888.
- Kaneda K, Saitoh F, Shibusawa H, Maegawa H, Saniabadi AR, Kashiwagi N & Matsukawa A (2011) Correlation of neutrophil and monocyte derived interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 with colitis severity in the rabbit. *Cytokine* **56**, 508-514.
- Kang SS, Bloom SM, Norian LA, Geske MJ, Flavell RA, Stappenbeck TS & Allen PM (2008) An antibiotic-responsive mouse model of fulminant ulcerative colitis. *PLoS Med* **5**, e41.
- Kanufre CC (2002) PPAR - Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma: um receptor nuclear para ácidos graxos. In *Entendendo a gordura - os ácidos graxos.*, pp. 227-248 [R Curi, C Pompéia, CK Miyasaka and J Procópio, editors]. São Paulo: Manole.
- Kato K, Ishii Y, Mizuno S, Sugitani M, Asai S, Kohno T, Takahashi K, Komuro S, Iwamoto M, Miyamoto S, Takayama T & Arakawa Y (2007) Usefulness of rectally administering [1-13C]-butyrate for breath test in patients with active and quiescent ulcerative colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **42**, 207-214.
- Kawamata K, Hayashi H & Suzuki Y (2007) Propionate absorption associated with bicarbonate secretion in vitro in the mouse cecum. *Pflugers Arch* **454**, 253-262.
- Keshavarzian A, Saverymuttu SH, Tai PC, Thompson M, Barter S, Spry CJ & Chadwick VS (1985) Activated eosinophils in familial eosinophilic gastroenteritis. *Gastroenterology* **88**, 1041-1049.
- Kien CL, Peltier CP, Mandal S, Davie JR & Blauwiekel R (2008) Effects of the in vivo supply of butyrate on histone acetylation of cecum in piglets. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **32**, 51-56.
- Kinoshita M, Suzuki Y & Saito Y (2002) Butyrate reduces colonic paracellular permeability by enhancing PPARgamma activation. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 827-831.
- Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kapsoritakis A, Spanoudakis S, Roussomoustakaki M, Mouzas IA, Kouroumalis EA & Manousos ON (1999) Appendectomy, tonsillectomy, and risk of inflammatory bowel disease: case-controlled study in Crete. *Dis Colon Rectum* **42**, 225-230.
- Koyama Y, Adachi M, Sekiya M, Takekawa M & Imai K (2000) Histone deacetylase inhibitors suppress IL-2-mediated gene expression prior to induction of apoptosis. *Blood* **96**, 1490-1495.
- Krishnan S, Ramakrishna BS & Binder HJ (1999) Stimulation of sodium chloride absorption from secreting rat colon by short-chain fatty acids. *Dig Dis Sci* **44**, 1924-1930.
- Kumar A, Wu H, Collier-Hyams LS, Kwon YM, Hanson JM & Neish AS (2009) The bacterial fermentation product butyrate influences epithelial signaling via reactive oxygen species-mediated changes in cullin-1 neddylation. *J Immunol* **182**, 538-546.

- Lakatos L & Lakatos PL (2007a) [Changes in the epidemiology of inflammatory bowel diseases]. *Orv Hetil* **148**, 223-228.
- Lakatos L & Lakatos PL (2007b) [Medical therapy of inflammatory bowel diseases: Crohn's disease]. *Orv Hetil* **148**, 1107-1114.
- Lakatos L & Lakatos PL (2007c) [Medical therapy of inflammatory bowel diseases: ulcerative colitis]. *Orv Hetil* **148**, 1163-1170.
- Li MC & He SH (2004) IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **10**, 620-625.
- Ligumsky M, Simon PL, Karmeli F & Rachmilewitz D (1990) Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease--enhanced production during active disease. *Gut* **31**, 686-689.
- Loftus EV, Jr. (2004) Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* **126**, 1504-1517.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Luhrs H, Gerke T, Muller JG, Melcher R, Schaubert J, Boxberger F, Scheppach W & Menzel T (2002) Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* **37**, 458-466.
- MacDonald TT, Monteleone G & Pender SL (2000) Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* **51**, 2-9.
- Madi K, Zaltman C & Takiya CM (2001) Arquitetura da mucosa intestinal e sua plasticidade. In *Imunologia da mucosa intestinal da bancada ao leito* [CCS Elia and HSP Souza, editors]. Belo Horizonte: Atheneu.
- Mahan LK & Escott-Stump S (2002) *Krause, Alimentos, Nutrição e Dietoterapia*, 10<sup>a</sup> ed. ed. São Paulo: Roca.
- Maier S, Reich E, Martin R, Bachem M, Altug V, Hautmann RE & Gschwend JE (2000) Tributyrin induces differentiation, growth arrest and apoptosis in androgen-sensitive and androgen-resistant human prostate cancer cell lines. *Int J Cancer* **88**, 245-251.
- Malle E, Marsche G, Panzenboeck U & Sattler W (2006) Myeloperoxidase-mediated oxidation of high-density lipoproteins: fingerprints of newly recognized potential proatherogenic lipoproteins. *Arch Biochem Biophys* **445**, 245-255.
- Mandal M, Olson DJ, Sharma T, Vadlamudi RK & Kumar R (2001) Butyric acid induces apoptosis by up-regulating Bax expression via stimulation of the c-Jun N-terminal kinase/activation protein-1 pathway in human colon cancer cells. *Gastroenterology* **120**, 71-78.
- Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P, Shanahan F, Wilson ID & Wang Y (2007) Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res* **6**, 546-551.
- Marini M, Bamias G, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, Hoang SB, Ross WG, Pizarro TT & Cominelli F (2003) TNF-alpha neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8366-8371.
- Márquez LR (2003) *A fibra terapêutica*. São Paulo: Laboratório Madaus.
- Martins AB (2010) Concentração e atividade sérica da mieloperoxidase em indivíduos tabagistas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- McCafferty DM, Sihota E, Muscara M, Wallace JL, Sharkey KA & Kubes P (2000) Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G90-99.

- Melgar S, Bjursell M, Gerdin AK, Svensson L, Michaelsson E & Bohlooly YM (2007) Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G165-172.
- Menzel T, Luhrs H, Zirlik S, Schaubert J, Kudlich T, Gerke T, Gostner A, Neumann M, Melcher R & Scheppach W (2004) Butyrate inhibits leukocyte adhesion to endothelial cells via modulation of VCAM-1. *Inflamm Bowel Dis* **10**, 122-128.
- Miller TL & Wolin MJ (1979) Fermentations by saccharolytic intestinal bacteria. *Am J Clin Nutr* **32**, 164-172.
- Moreau NM, Martin LJ, Toquet CS, Laboisse CL, Nguyen PG, Siliart BS, Dumon HJ & Champ MM (2003) Restoration of the integrity of rat caeco-colonic mucosa by resistant starch, but not by fructo-oligosaccharides, in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Br J Nutr* **90**, 75-85.
- Morrison DJ, Mackay WG, Edwards CA, Preston T, Dodson B & Weaver LT (2006) Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate? *Br J Nutr* **96**, 570-577.
- Naito Y, Takagi T & Yoshikawa T (2007) Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis. *J Clin Biochem Nutr* **41**, 18-26.
- Nelson DL & Cox MM (2002) *Princípios de bioquímica de Lehninger*. São Paulo: Sarvier.
- Nelson DP & Kiesow LA (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution in the UV). *Analytical Biochemistry* **49**, 474-478.
- Nightingale JM, Lennard-Jones JE, Gertner DJ, Wood SR & Bartram CI (1992) Colonic preservation reduces need for parenteral therapy, increases incidence of renal stones, but does not change high prevalence of gall stones in patients with a short bowel. *Gut* **33**, 1493-1497.
- Nordgaard I, Hove H, Clausen MR & Mortensen PB (1996) Colonic production of butyrate in patients with previous colonic cancer during long-term treatment with dietary fibre (*Plantago ovata* seeds). *Scand J Gastroenterol* **31**, 1011-1020.
- Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J & Wolff SP (1994) Measurement of plasma determination concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay conjunction with triphenylphosphine. *Analytical Biochemistry* **220**, 403-409.
- Odze RD, Wershil BK, Leichtner AM & Antonioli DA (1995) Allergic colitis in infants. *J Pediatr* **126**, 163-170.
- Ohata A, Usami M & Miyoshi M (2005) Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cells via lipoxygenase activation. *Nutrition* **21**, 838-847.
- Ohkusa T, Okayasu I, Ogihara T, Morita K, Ogawa M & Sato N (2003) Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* **52**, 79-83.
- Oida T & Weiner HL (2010) TGF-beta induces surface LAP expression on murine CD4 T cells independent of Foxp3 induction. *PLoS One* **5**, e15523.
- Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y & Nakaya R (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* **98**, 694-702.
- Oliveira HR & Gazzola J (2002) Absorção dos ácidos graxos. In *Entendendo a gordura - os ácidos graxos.*, pp. 49-58 [R Curi, C Pompéia, CK Miyasaka and J Procopio, editors]. São Paulo: Manole.

- Oshima T, Jordan P, Grisham MB, Alexander JS, Jennings M, Sasaki M & Manas K (2001) TNF-alpha induced endothelial MAdCAM-1 expression is regulated by exogenous, not endogenous nitric oxide. *BMC Gastroenterol* **1**, 5.
- Pallis AG, Vlachonikolis IG & Mouzas IA (2002) Assessing health-related quality of life in patients with inflammatory bowel disease, in Crete, Greece. *BMC Gastroenterol* **2**, 1.
- Parsons DS & Paterson CR (1965) Fluid and solute transport across rat colonic mucosa. *Experimental Physiology* **50**, 220-231.
- Patz J, Jacobsohn WZ, Gottschalk-Sabag S, Zeides S & Braverman DZ (1996) Treatment of refractory distal ulcerative colitis with short chain fatty acid enemas. *Am J Gastroenterol* **91**, 731-734.
- Peng L, He Z, Chen W, Holzman IR & Lin J (2007) Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. *Pediatr Res* **61**, 37-41.
- Place RF, Noonan EJ & Giardina C (2005) HDAC inhibition prevents NF-kappa B activation by suppressing proteasome activity: down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I kappa B alpha. *Biochem Pharmacol* **70**, 394-406.
- Pomare EW, Branch WJ & Cummings JH (1985) Carbohydrate fermentation in the human colon and its relation to acetate concentrations in venous blood. *J Clin Invest* **75**, 1448-1454.
- Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB & Coffman RL (1993) Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* **5**, 1461-1471.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S & Medzhitov R (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **118**, 229-241.
- Ramakrishna BS & Mathan VI (1993) Colonic dysfunction in acute diarrhoea: the role of luminal short chain fatty acids. *Gut* **34**, 1215-1218.
- Ramos MG, Bambirra EA, Cara DC, Vieira EC & Alvarez-Leite JI (1997) Oral administration of short-chain fatty acids reduces the intestinal mucositis caused by treatment with Ara-C in mice fed commercial or elemental diets. *Nutr Cancer* **28**, 212-217.
- Ramos MG, Bambirra EA, Nicoli JR, Cara DC, Vieira EC & Alvarez-Leite J (1999) Protection by short-chain fatty acids against 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-induced intestinal lesions in germfree mice. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 950-953.
- Ramos MG, Rabelo FL, Brumatti G, Bueno-da-Silva AE, Amarante-Mendes GP & Alvarez-Leite JI (2004) Butyrate increases apoptosis induced by different antineoplastic drugs in monocytic leukemia cells. *Chemotherapy* **50**, 221-228.
- Ramos MG, Rabelo FL, Duarte T, Gazzinelli RT & Alvarez-Leite JI (2002) Butyrate induces apoptosis in murine macrophages via caspase-3, but independent of autocrine synthesis of tumor necrosis factor and nitric oxide. *Braz J Med Biol Res* **35**, 161-173.
- Reeves PG, Nielsen FH & Fahey GC, Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**, 1939-1951.
- Resnick MB & Weller PF (1993) Mechanisms of eosinophil recruitment. *Am J Respir Cell Mol Biol* **8**, 349-355.

## Referências Bibliográficas

---

- Rezaie A, Parker RD & Abdollahi M (2007) Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Dig Dis Sci* **52**, 2015-2021.
- Roberfroid MB (2005) Introducing inulin-type fructans. *Br J Nutr* **93 Suppl 1**, S13-25.
- Roediger WE (1994) Famine, fiber, fatty acids, and failed colonic absorption: does fiber fermentation ameliorate diarrhea? *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* **18**, 4-8.
- Roediger WE & Moore A (1981) Effect of short-chain fatty acid on sodium absorption in isolated human colon perfused through the vascular bed. *Digestive Diseases and Sciences* **26**, 100-106.
- Roediger WE (1980) The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *The Lancet* **11**, 712-715.
- Rombeau JL & Kripke SA (1990) Metabolic and intestinal effects of short-chain fatty acids. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **14**, 181S-185S.
- Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, Spinozzi F, Agea E, Pelli MA & Morozzi G (2001) Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis* **22**, 1675-1680.
- Rothenberg ME (2004) Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). *J Allergy Clin Immunol* **113**, 11-28; quiz 29.
- Rothenberg ME, Mishra A, Brandt EB & Hogan SP (2001) Gastrointestinal eosinophils. *Immunol Rev* **179**, 139-155.
- Round JL & Mazmanian SK (2010) Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12204-12209.
- Ruppin H, Bar-Meir S, Soergel KH, Wood CM & Schmitt MG, Jr. (1980) Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology* **78**, 1500-1507.
- Saemann MD, Bohmig GA, Osterreicher CH, Burtscher H, Parolini O, Diakos C, Stockl J, Horl WH & Zlabinger GJ (2000) Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *FASEB J* **14**, 2380-2382.
- Saemann MD, Bohmig GA & Zlabinger GJ (2002a) Short-chain fatty acids: bacterial mediators of a balanced host-microbial relationship in the human gut. *Wien Klin Wochenschr* **114**, 289-300.
- Saemann MD, Parolini O, Bohmig GA, Kelemen P, Krieger PM, Neumuller J, Knarr K, Kammlander W, Horl WH, Diakos C, Stuhlmeier K & Zlabinger GJ (2002b) Bacterial metabolite interference with maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* **71**, 238-246.
- Saitoh O, Kojima K, Sugi K, Matsuse R, Uchida K, Tabata K, Nakagawa K, Kayazawa M, Hirata I & Katsu K (1999) Fecal eosinophil granule-derived proteins reflect disease activity in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **94**, 3513-3520.
- Sanderson IR (2004) Short chain fatty acid regulation of signaling genes expressed by the intestinal epithelium. *J Nutr* **134**, 2450S-2454S.
- Sanderson IR (2007) Dietary modulation of GALT. *J Nutr* **137**, 2557S-2562S.
- Sangfelt P, Carlson M, Thorn M, Loof L & Raab Y (2001) Neutrophil and eosinophil granule proteins as markers of response to local prednisolone treatment in distal ulcerative colitis and proctitis. *Am J Gastroenterol* **96**, 1085-1090.
- Santiago AF, Alves AC, Oliveira RP, Fernandes RM, Paula-Silva J, Assis FA, Carvalho CR, Weiner HL & Faria AM (2011) Aging correlates with reduction in

- regulatory-type cytokines and T cells in the gut mucosa. *Immunobiology* **216**, 1085-1093.
- Sauer J, Richter KK & Pool-Zobel BL (2007) Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *J Nutr Biochem* **18**, 736-745.
- Scheppach W (1996) Treatment of distal ulcerative colitis with short-chain fatty acid enemas. A placebo-controlled trial. German-Austrian SCFA Study Group. *Dig Dis Sci* **41**, 2254-2259.
- Scheppach W, Bartram P, Richter A, Richter F, Liepold H, Dusel G, Hofstetter G, Ruthlein J & Kasper H (1992a) Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **16**, 43-48.
- Scheppach W, Sommer H, Kirchner T, Paganelli GM, Bartram P, Christl S, Richter F, Dusel G & Kasper H (1992b) Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* **103**, 51-56.
- Scheppach W & Weiler F (2004) The butyrate story: old wine in new bottles? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **7**, 563-567.
- Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM & Galmiche JP (2000) Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* **47**, 397-403.
- Serpe L, Canaparo R, Daperno M, Sostegni R, Martinasso G, Muntoni E, Ippolito L, Vivenza N, Pera A, Eandi M, Gasco MR & Zara GP (2010) Solid lipid nanoparticles as anti-inflammatory drug delivery system in a human inflammatory bowel disease whole-blood model. *Eur J Pharm Sci* **39**, 428-436.
- Sgarbieri VC & Pacheco MT (1999) Revisão: Alimentos Funcionais Fisiológicos. *Brazilian Journal of Food Technology* **2**, 7-19.
- Shils ME, Moshe-Shike JAO & Ross CAT (2006) *Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença*. São Paulo: Manole.
- Singh B, Read S, Asseman C, Malmstrom V, Mottet C, Stephens LA, Stepankova R, Tlaskalova H & Powrie F (2001) Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev* **182**, 190-200.
- Soderberg LS, Boger S, Fifer EK & Gilbert KM (2004) Macrophage production of inflammatory mediators is potently inhibited by a butyric acid derivative demonstrated to inactivate antigen-stimulated T cells. *Int Immunopharmacol* **4**, 1231-1239.
- Song M, Xia B & Li J (2006) Effects of topical treatment of sodium butyrate and 5-aminosalicylic acid on expression of trefoil factor 3, interleukin 1beta, and nuclear factor kappaB in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. *Postgrad Med J* **82**, 130-135.
- Souza HSP (2001) Imunoregulação e mediadores inflamatórios. In *Imunologia da mucosa intestinal da bancada ao leito* [E C.C.S. and HSP Souza, editors]. Belo Horizonte: Atheneu.
- Specht S, Arriens S & Hoerauf A (2006) Induction of chronic colitis in IL-10 deficient mice requires IL-4. *Microbes Infect* **8**, 694-703.
- Spencer AU, Yang H, Haxhija EQ, Wildhaber BE, Greenson JK & Teitelbaum DH (2007) Reduced severity of a mouse colitis model with angiotensin converting enzyme inhibition. *Dig Dis Sci* **52**, 1060-1070.
- Steinhart AH, Hiruki T, Brzezinski A & Baker JP (1996) Treatment of left-sided ulcerative colitis with butyrate enemas: a controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* **10**, 729-736.

- Stewart ML & Slavin JL (2006) Molecular weight of guar gum affects short-chain fatty acid profile in model intestinal fermentation. *Mol Nutr Food Res* **50**, 971-976.
- Strober W, Fuss I & Mannon P (2007) The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* **117**, 514-521.
- Talley NJ, Kephart GM, McGovern TW, Carpenter HA & Gleich GJ (1992) Deposition of eosinophil granule major basic protein in eosinophilic gastroenteritis and celiac disease. *Gastroenterology* **103**, 137-145.
- Taylor PM, Thomas DB & Mills KHG (1987) In vitro culture and T cell lines and clones. In *Lymphocytes: A Practical Approach* [GGB Klaus, editor]. Washington, DC.
- Teixeira LG, Leonel AJ, Aguilar EC, Batista NV, Alves AC, Coimbra CC, Ferreira AV, de Faria AM, Cara DC & Alvarez Leite JI (2011) The combination of high-fat diet-induced obesity and chronic ulcerative colitis reciprocally exacerbates adipose tissue and colon inflammation. *Lipids Health Dis* **10**, 204.
- Topping DL & Clifton PM (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* **81**, 1031-1064.
- Torpier G, Colombel JF, Mathieu-Chandelier C, Capron M, Dessaint JP, Cortot A, Paris JC & Capron A (1988) Eosinophilic gastroenteritis: ultrastructural evidence for a selective release of eosinophil major basic protein. *Clin Exp Immunol* **74**, 404-408.
- Uhlig HH & Powrie F (2003) Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses. *J Clin Invest* **112**, 648-651.
- Van Deun K, Pasmans F, Van Immerseel F, Ducatelle R & Haesebrouck F (2008) Butyrate protects Caco-2 cells from *Campylobacter jejuni* invasion and translocation. *Br J Nutr* **100**, 480-484.
- van Nuenen MH, de Ligt RA, Doornbos RP, van der Woude JC, Kuipers EJ & Venema K (2005) The influence of microbial metabolites on human intestinal epithelial cells and macrophages in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol* **45**, 183-189.
- Velazquez OC, Lederer HM & Rombeau JL (1997) Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol* **427**, 123-134.
- Velazquez OC & Rombeau JL (1997) Butyrate. Potential role in colon cancer prevention and treatment. *Adv Exp Med Biol* **427**, 169-181.
- Venkatraman A, Ramakrishna BS, Shaji RV, Kumar NS, Pulimood A & Patra S (2003) Amelioration of dextran sulfate colitis by butyrate: role of heat shock protein 70 and NF-kappaB. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G177-184.
- Vernia P, Annese V, Bresci G, d'Albasio G, D'Inca R, Giaccari S, Ingrosso M, Mansi C, Riegler G, Valpiani D & Caprilli R (2003) Topical butyrate improves efficacy of 5-ASA in refractory distal ulcerative colitis: results of a multicentre trial. *Eur J Clin Invest* **33**, 244-248.
- Videla S, Vilaseca J, Antolin M, Garcia-Lafuente A, Guarner F, Crespo E, Casalots J, Salas A & Malagelada JR (2001) Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. *Am J Gastroenterol* **96**, 1486-1493.
- Vieira EL, Leonel AJ, Sad AP, Beltrao NR, Costa TF, Ferreira TM, Gomes-Santos AC, Faria AM, Peluzio MC, Cara DC & Alvarez-Leite JI (2011) Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis. *J Nutr Biochem*.
- Viney JL, Jones S, Chiu HH, Lagrimas B, Renz ME, Presta LG, Jackson D, Hillan KJ, Lew S & Fong S (1996) Mucosal addressin cell adhesion molecule-1: a

- structural and functional analysis demarcates the integrin binding motif. *J Immunol* **157**, 2488-2497.
- Vinolo MAR, Rodrigues HG, Hatanaka E, Sato FT, Sampaio SC & Curi R (2011) Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *Journal of Nutrition Biochemistry* **22**, 849-855.
- Wachtershauser A, Loitsch SM & Stein J (2000) PPAR-gamma is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 380-385.
- Watkins SM, Carter LC, Mak J, Tsau J, Yamamoto S & German JB (1999) Butyric acid and tributyrin induce apoptosis in human hepatic tumour cells. *J Dairy Res* **66**, 559-567.
- Werner U & Szelenyi I (1992) Measurement of MPO activity as model for detection of granulocyte infiltration in different tissues. *Agents Actions Spec No:C101-3*.
- Winter HS, Madara JL, Stafford RJ, Grand RJ, Quinlan JE & Goldman H (1982) Intraepithelial eosinophils: a new diagnostic criterion for reflux esophagitis. *Gastroenterology* **83**, 818-823.
- Wirtz S & Neurath MF (2007) Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev* **59**, 1073-1083.
- Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A & Jenkins DJ (2006) Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* **40**, 235-243.
- Wu GD, Huang N, Wen X, Keilbaugh SA & Yang H (1999) High-level expression of I kappa B-beta in the surface epithelium of the colon: in vitro evidence for an immunomodulatory role. *J Leukoc Biol* **66**, 1049-1056.
- Xavier RJ & Podolsky DK (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**, 427-434.
- Yan Y, Kolachala V, Dalmasso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV & Merlin D (2009) Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One* **4**, e6073.
- Yin L, Laevsky G & Giardina C (2001) Butyrate suppression of colonocyte NF-kappa B activation and cellular proteasome activity. *J Biol Chem* **276**, 44641-44646.
- Zapolska-Downar D, Siennicka A, Kaczmarczyk M, Kolodziej B & Naruszewicz M (2004) Butyrate inhibits cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in cultured endothelial cells: the role of NF-kappaB and PPARalpha. *J Nutr Biochem* **15**, 220-228.

# Efeitos e Mecanismos de Ação da Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano

---

**Anexos**

## Anexo 1 - Protocolo de Aceitação do CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

## CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 223/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Mecanismos de ação do butirato de sódio na proteção da colite ulcerativa experimental**", que tem como responsável(is) **Jacqueline Isaura Alvarez Leite**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **12/ 11/2008**.

Este certificado expira-se em **12/ 11/ 2013**.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 223/2008**, related to the project entitled "**Mecanism of action of the sodium butyrate in the protection of experimental ulcerative colitis**", under the supervisors of **Jacqueline Isaura Alvarez Leite**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **November 12, 2008**.

This certificate expires in **November 12, 2013**.

Belo Horizonte, 14 de Novembro de 2008.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

(Mod. Cert. v1.0)

# RECIBO

(O N° do Protocolo é reservado ao CETEA) → PROTOCOLO N°

ADENDO  
223/2008

(Preencha os itens abaixo, de acordo com a Identificação do Projeto)

**Título do Projeto:** MECANISMO DE AÇÃO DA TRIBUTIRINA NA PROTEÇÃO DA COLITE  
ULCERATIVA EXPERIMENTAL (ADENDO AO PROJETO 223/2008)

**Responsável Principal:** **PROFA. JACQUELINE I. ALVAREZ-LEITE**

<http://lattes.cnpq.br/2226590630777569>

**E-mail:** [juscelineleonel@yahoo.com.br](mailto:juscelineleonel@yahoo.com.br)

**Telefone:** (31) 3409 2629 - **FAX:** (31) 3409 - 2614

**Recebido em:** 27, 06 / 11

(Rubrica do funcionário)

Francis



**Anexo 2 - Publicação Científica**

**Anexo 3 - Artigo Submetido para Publicação Científica**