



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS GRADUAÇÃO  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

VIVIANE PINHEIRO ALVES DE ALMEIDA

**EPIISOPILOTURINA ATENUA OS EFEITOS PRÓ INFLAMATÓRIOS DA COLITE  
EXPERIMENTAL ATRAVÉS DO RECEPTOR M1**

PARNAÍBA  
2020

VIVIANE PINHEIRO ALVES DE ALMEIDA

**EPIISOPILOTURINA ATENUA OS EFEITOS PRÓ INFLAMATÓRIOS DA COLITE  
EXPERIMENTAL ATRAVÉS DO RECEPTOR M1**

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

Linha de pesquisa: Farmacologia

Orientador: André Luiz dos Reis Barbosa

Co - orientador: Tarcisio Vieira de Brito

PARNAÍBA  
2020

A447e Almeida, Viviane Pinheiro Alves de.

Epiisopiloturina atenua os efeitos pró inflamatórios da colite experimental através do receptor M1. [recurso eletrônico] / Viviane Pinheiro Alves de Almeida. – 2020.

1 Arquivo em pdf.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2020.

Orientação: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.

VIVIANE PINHEIRO ALVES DE ALMEIDA

**EPIISOPILOTURINA ATENUA OS EFEITOS PRÓ INFLAMATÓRIOS DA COLITE  
EXPERIMENTAL ATRAVÉS DO RECEPTOR M1**

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

Aprovada: 06/02/2020

BANCA EXAMINADORA:



Dr. André Luiz dos Reis Barbosa

Universidade Federal do Piauí - UFPI

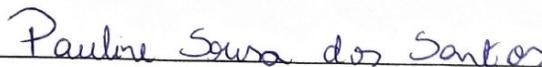
(Orientador)



Dra. Leiz Maria Costa Veras

Universidade Federal do Piauí - UFPI

(Membro interno)



Dra. Pauline Sousa dos Santos

Centro Universitário Maurício de Nassau - UNINASSAU

(Membro externo)

PARNAÍBA

2020

**Dedico,**

A minha família, fonte de força e amor  
incondicional.

Aos meus amigos, pelo subsídio emocional e  
sentimental.

Ao grupo Laffex, pelo companheirismo, presteza e  
comprometimento.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e suas possibilidades. Por seus caminhos serem sempre maiores e melhores que os meus. Por ter me carregado no colo, todas as vezes que minhas pernas cansaram. A Ele tudo que tenho, tudo que sou, e o que vier a ser.

Aos meus pais, por todo o apoio financeiro e sentimental. Em especial a minha mãe, minha fonte de força diária. Gratidão por sempre me mostrar que quando a luta é grande a vitória é maior. A vocês todo o meu amor e dedicação.

Aos meus irmãos Max Vinicius e Max Daylle, minhas cunhadas Jayza e Lorena, e meus sobrinhos Davi e Ana Vitória/Vitor, por serem fonte de apoio, força, afeto e amor.

A toda minha família, por sempre vibrarem com as minhas conquistas. Em especial aos meus avôs e avós, que do céu ou da terra sempre foram e serão fonte de inspiração.

A todos os meus amigos, por terem sido torcida e força em todos os momentos dessa caminhada. Por acreditarem mais em mim que eu mesma. Em especial as minhas amigas irmãs, Renata, Viliane e Sarah, por sempre serem acolhida pra minha alma, e por dividirem as angustias e multiplicarem as alegrias.

Gratidão ao meu orientador André Luiz, pela partilha do conhecimento, pela orientação do caminho a trilhar em cada passo desse mestrado, e por toda presteza e comprometimento com o meu projeto.

Ao meu co-orientador Tarcísio Vieira, por ter sido fonte de inspiração para que eu não desistisse dessa caminhada. A sua defesa salvou a minha. Obrigada por todo apoio, orientação e dedicação.

Aos meu amigo e companheiro nessa jornada, Tino Marcos. Minha eterna gratidão por ter sido meus braços e minhas pernas nesse projeto. Por toda sua dedicação como aluno de iniciação científica e como amigo. Sem você esse caminho teria sido bem mais difícil de trilhar.

Ao Laboratório de Físio-Farmacologia experimental, Laffex, por todo companheirismo e comprometimento com o meu projeto. Em especial a Cynthia, Diva, Jalles, Fernando, e Kleiton, por toda ajuda na execução dos meus experimentos e partilha do conhecimento.

Gratidão a professora Leiz Veras e professora Pauline Santos, por terem aceitado o convite para compor a minha banca de defesa, e por toda a contribuição que darão ao projeto. Vocês me inspiram como mulheres pesquisadoras e docentes.

Ao professor Daniel Rufino, por prontamente ter cedido o seu laboratório para execução de parte dos experimentos.

Ao Kaio Figueiredo, pela importante ajuda com parte do projeto.

Ao professor Daniel Vasconcelos e ao laboratório de Análise e Processamento Histológico, pela parceria e contribuição com a minha pesquisa.

Ao Laboratório de Estudos da Físio-Farmacologia Gastrointestinal, Leffag, na pessoa do professor Pedro Soares, pela contribuição na pesquisa, e pela parceria. E em especial ao Carlos e Álvaro por toda presteza.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFPI, e a todo o seu corpo docente, pela contribuição com a minha formação como mestre.

A FAPEPI pelo apoio financeiro na execução desta pesquisa.

## EPÍGRAFE

*Não sei quantas almas tenho.*

*Cada momento mudei.*

*Continuamente me estranho.*

*Nunca me vi nem achei.*

*De tanto ser, só tenho alma.*

*Quem tem alma não tem calma.*

*Quem vê é só o que vê,*

*Quem sente não é quem é.*

*Atento ao que sou e vejo,*

*Torno-me eles e não eu.*

*Cada meu sonho ou desejo*

*É do que nasce e não meu.*

*Sou minha própria paisagem,*

*Assisto à minha passagem,*

*Diverso, móbil e só,*

*Não sei sentir-me onde estou.*

*Por isso, alheio, vou lendo*

*Como páginas, meu ser.*

*O que segue não prevendo,*

*O que passou a esquecer.*

*Noto à margem do que li*

*O que julguei que senti.*

*Releio e digo: «Fui eu?»*

*Deus sabe, porque o escreveu.*

*Fernando Pessoa*

## RESUMO

**Introdução:** A colite ulcerativa é uma doença crônica que acomete o cólon e o reto, caracterizada por ulcerações da mucosa e submucosa do cólon sem afetar as camadas mais profundas da parede intestinal. Atualmente, as terapias convencionais utilizadas no tratamento da colite ulcerativa apresentam como objetivo o controle da inflamação, o alívio da dor abdominal e a manutenção da remissão da doença. No entanto, estas terapias estão associadas com uma variedade de efeitos colaterais que dificultam o seu uso. Uma alternativa é a utilização de compostos naturais com propriedades promissoras para o tratamento dessa patologia. Um dos principais alcaloides extraídos do jaborandi é a epiisopiloturina, que possui estrutura química similar a pilocarpina, e tem demonstrado ser um alcalóide promissor quanto aos seus efeitos anti-inflamatórios demonstrados em estudos anteriores, sendo importante estudar por qual via esse efeito acontece. **Objetivo:** O presente trabalho tem como objetivo avaliar a participação do receptor muscarínico M1 na resposta anti-inflamatória da epiisopiloturina 17 horas após a indução da colite induzida por ácido acético. **Métodos:** Foi realizado inicialmente um estudo de docagem molecular da epiisopiloturina com o receptor muscarínico M1. A atividade anti-inflamatória da Epiisopiloturina no curso da colite induzida por ácido acético foi avaliado administrando-se a substância nas doses de 0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg via intraperitoneal. Para analisar a participação do sistema colinérgico, mas especificamente do receptor muscarínico M1 no mecanismo de ação anti-inflamatória da epiisopiloturina na colite por ácido acético sua ação foi bloqueada usando pirenzepina (antagonista do receptor M1). Foram avaliados os escores macroscópicos e microscópicos, os parâmetros bioquímicos da lesão (dosagem de MPO, MDA, GSH, NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>), bem como a mensuração de citocinas e a imunoexpressão por western blot. **Resultados e discussão:** No estudo inicial de docagem molecular a epiisopiloturina demonstrou afinidade de ligação com o receptor muscarínico M1. A epiisopiloturina na dose de 0,1mg/kg demonstrou um melhor efeito anti-inflamatório ao diminuir parâmetros inflamatórios, no curso da colite induzida por ácido acético. Já os grupos de animais tratados simultaneamente com a epiisopiloturina na dose de 0,1 mg/kg e cotratados com o antagonista colinérgico pirenzepina, apresentaram uma redução dos efeitos anti-inflamatórios da epiisopiloturina, demonstrando assim o bloqueio da ação da mesma pela pirenzepina. **Conclusão:** Através dos resultados obtidos, o presente trabalho infere que a epiisopiloturina tem sua ação anti-inflamatória através do receptor muscarínico M1, visto que o bloqueio do receptor com o antagonista farmacológico reduziu os efeitos anti-inflamatórios da droga no curso da colite experimental, apontando que a molécula é uma alternativa promissora para o tratamento da colite ulcerativa.

**Palavras-chave:** doenças inflamatórias intestinais, via colinérgica, epiisopiloturina;

## ABSTRACT

**Introduction:** Ulcerative colitis is a chronic disease that affects the colon and rectum, characterized by ulcerations of the mucosa and submucosa of the colon without affecting the deeper layers of the intestinal wall. Currently, the conventional therapies used to treat ulcerative colitis aim to control inflammation, relieve abdominal pain and maintain remission of the disease. However, these therapies are associated with a variety of side effects that hinder their use. An alternative is the use of natural compounds with promising properties for the treatment of this pathology. One of the main alkaloids extracted from jaborandi is epiisopiloturine, which has a chemical structure similar to pilocarpine, and has been shown to be a promising alkaloid in terms of its anti-inflammatory effects demonstrated in previous studies, it is important to study which way this effect happens. **Objective:** This study aims to evaluate the participation of the muscarinic M1 receptor in the anti-inflammatory response of epiisopiloturine 17 hours after induction of acetic acid-induced colitis. **Methods:** A molecular docking study of epiisopiloturine with the M1 muscarinic receptor was initially carried out. The anti-inflammatory activity of Epiisopiloturine in the course of colitis induced by acetic acid was evaluated by administering the substance in doses of 0.01; 0.1 and 1.0 mg / kg intraperitoneally. To analyze the participation of the cholinergic system, but specifically of the muscarinic M1 receptor in the mechanism of anti-inflammatory action of epiisopiloturine in acetic acid colitis, its action was blocked using pirenzepine (M1 receptor antagonist). The macroscopic and microscopic scores, the biochemical parameters of the lesion (MPO, MDA, GSH, NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>) were evaluated, as well as the measurement of cytokines and immunoexpression by western blot. **Results and discussion:** In the initial study of molecular docking, epiisopiloturine demonstrated a link affinity with the muscarinic receptor M1. Epiisopiloturine at a dose of 0.1 mg / kg showed a better anti-inflammatory effect by decreasing inflammatory parameters, in the course of colitis induced by acetic acid. The groups of animals treated simultaneously with epiisopiloturine at a dose of 0.1 mg / kg and co-treated with the cholinergic antagonist pirenzepine, showed a reduction in the anti-inflammatory effects of epiisopiloturine, thus demonstrating the blocking of its action by pirenzepine. **Conclusion:** Based on the results obtained, the present study infers that epiisopiloturine has its anti-inflammatory action through the M1 muscarinic receptor, since blocking the receptor with the pharmacological antagonist reduced the anti-inflammatory effects of the drug in the course of experimental colitis, pointing out that the molecule is a promising alternative for the treatment of ulcerative colitis.

**Key words:** inflammatory bowel diseases, cholinergic pathway, epiisopiloturine;

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AA** – Ácido acético;
- ACh** – Acetilcolina;
- ADT** - Autodock Tools
- ANOVA** - Análise de variância estatística;
- CEEA** - Comitê de Ética em Experimentação Animal;
- COBEA** - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;
- COX-2** - Ciclo-oxigenase-2
- CU** - Colite Ulcerativa.
- DC** - Doença de Crohn;
- DEXA** - Dexametasona;
- DFT** - Teoria da Densidade Funcional;
- DIIs** - Doenças Inflamatórias Intestinais;
- DMSO** – Dimetilsulfóxido;
- DTNB** - Ácido 5,5'-Ditiobis-(2-nitrobenzoico);
- ELISA** - Ensaio Imunoenzimático;
- EPI** - Epiisopiloturina
- EROs** - Espécies Reativas de Oxigênio
- GSH** - Glutathione;
- HTAB** - Tampão de Hexadeciltrimetilamônio;
- IFN- $\gamma$**  - Interferon Gama;
- IL-6** - Interleucina 6;
- IL-12** - Interleucina 12;
- IL-1 $\beta$**  - Interleucina 1 Beta;
- IL-6** - Interleucina 6;
- iNOS** - Óxido Nítrico Sintetase Induzível;
- KCL** - Cloreto de Potássio
- Ki** - Constante de inibição
- MCN- A- 343** - M-clorofenil-carbamoióxi-2-butiniltrimetilamônio cloreto
- MDA** - Ácido Malonildialdeído;
- MPO** - Mieloperoxidase;

**NADPH** - Nicotinamida dinucleotídio fosfato;

**NF-KB** - Fator de ativação nuclear K;

**NO** - Óxido Nítrico;

**PBS** - Tampão Fosfato de Sódio;

**RCU** - Retocolite Ulcerativa

**SAL** – Salina

**SNA** - Sistema Nervoso Autônomo

**TCA** - Ácido Tricloroacético;

**THC** - D9-tetra-hidrocanabinol

**Th1** - Células T helper 1;

**Th2** - Células T helper 2;

**Th17** - Células T helper 17;

**TNBS** - Ácido Trinitrobenzenossulfônico

**TNF- $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral Alpha;

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Jaborandi – <i>Pilocarpus microphyllus</i> .....	27
Figura 2. Estrutura química da Epiisopiloturina .....	29
Figura 3. Representação esquemática do protocolo experimental de avaliação da resposta anti-inflamatória da epiisopiloturina na da colite por ácido acético.....	36
Figura 4. Representação esquemática do protocolo experimental de avaliação da participação do receptor M1 na resposta anti-inflamatória da epiisopiloturina no curso colite por ácido acético.....	42
Figura 5. Epiisopiloturina reduz escores macroscópicos de lesões.....	46
Figura 6. Epiisopiloturina reduz o peso úmido do cólon de camundongos.....	47
Figura 7. Epiisopiloturina reduz danos microscópicos do cólon de camundongos....	49
Figura 8. Epiisopiloturina reduz atividade da mieloperoxidase (MPO) do cólon de camundongos.....	51
Figura 9. Epiisopiloturina reduz a concentração de MDA do cólon de camundongos .....	52
Figura 10. Epiisopiloturina previne a depleção dos níveis de glutathiona (GSH) do cólon de camundongos.....	53
Figura 11. Epiisopiloturina reduz NO <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub> do cólon de camundongos.....	54
Figura 12. Epiisopiloturina reduz os níveis de interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) do cólon de camundongos.....	55
Figura 13. Interação da Epiisopiloturina com o receptor muscarínico M1.....	56
Figura 14. Epiisopiloturina reduz escores macroscópicos de lesão através do receptor muscarínico M1.....	58
Figura 15. Epiisopiloturina reduz o peso úmido do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1.....	59
Figura 16. Epiisopiloturina reduz dano microscópico no cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1.....	61

Figura 17. Epiisopiloturina reduz atividade da mieloperoxidase (MPO) do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1. ....	63
Figura 18. Epiisopiloturina reduz a concentração de MDA do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1.....	64
Figura 19. Epiisopiloturina previne a depleção dos níveis de GSH do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1.....	65
Figura 20. Epiisopiloturina reduz NO <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub> do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1.....	66
Figura 21 Epiisopiloturina reduz os níveis de interleucina 1 beta (IL-1β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1. ....	67
Figura 22. Epiisopiloturina reduz a imunoexpressão de NFκB, iNOS e COX-2 em tecido do cólon através do receptor muscarínico M1.....	69
Figura 23: Mecanismo de ação anti-inflamatório da Epiisopiloturina na colite experimental por ácido acético.....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escores Macroscópicos.....	37
Tabela 2. Escores Microscópicos.....	37
Tabela 3: Epiisopiloturina reduz escores microscópicos de lesão.....	50
Tabela 4: Epiisopiloturina reduz escores microscópicos de lesão através do receptor muscarínico M1.....	62

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>21</b>
2.1. Colite Ulcerativa.....	21
2.2. Modelos experimentais de doenças inflamatórias intestinais.....	22
2.3. Terapêutica da Colite Ulcerativa.....	24
2.4. Plantas medicinais aplicadas ao tratamento das Doenças Inflamatórias Intestinais.....	25
2.5. Jaborandi como fonte de alcaloides com propriedades terapêuticas.....	27
2.6. Epiisopiloturina e uso terapêutico.....	28
1.7 A via colinérgica intestinal.....	29
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
3.1. Geral:.....	32
3.2. Específicos:.....	32
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>33</b>
4.1. Animais.....	33
4.2. Considerações Éticas.....	33
4.3. Avaliação ação anti-inflamatória da epiisopiloturina na colite induzida por ácido acético.....	34
4.4. Análise de parâmetros inflamatórios.....	35
4.4.1. Mensuração do peso úmido do cólon dos animais.....	35
4.4.2. Avaliação dos escores macroscópicos e microscópicos de lesão.....	35
4.4.3. Ensaio de Mieloperoxidase (MPO).....	37
4.4.4. Dosagem dos níveis de malonildialdeído (MDA) na mucosa intestinal.....	37
4.4.5. Dosagem dos níveis de Glutathione (GSH) na mucosa intestinal.....	37
4.4.6. Determinação de nitrato (NO <sub>3</sub> ) e nitrito (NO <sub>2</sub> ) na mucosa intestinal.....	38
4.4.7. Mensuração de Citocinas.....	38
4.5. Estudo de Docagem Molecular.....	39
4.5.1. Avaliação das interações de acoplamento molecular da molécula de Epiisopiloturina com o receptor Muscarínico M1.....	39
4.5.2. Preparação dos receptores alvo.....	40
4.5.3. Estudo de ancoragem molecular.....	40
4.6. Avaliação da participação do sistema colinérgico na ação anti-inflamatória da epiisopiloturina na colite induzida por ácido acético.....	41

4.6.1. Análise dos parâmetros inflamatórios .....	42
4.6.2. Western blot para NFκB, COX-2 e iNOS.....	42
4.6.9. Análise estatística .....	43
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1 Epiisopiloturina reduz parâmetros inflamatórios da colite induzida por ácido acético .....</b>	<b>44</b>
5.1.1 Epiisopiloturina reduz escores macroscópicos de lesões .....	44
5.1.2 Epiisopiloturina reduz o peso úmido do cólon de camundongos .....	45
5.1.3 Epiisopiloturina reduz escores histológicos de dano intestinal .....	46
5.1.4. Epiisopiloturina reduz atividade da mieloperoxidase (MPO) do cólon de camundongos. ....	49
5.1.5. Epiisopiloturina reduz a concentração de ácido malondialdeído (MDA) do cólon de camundongos .....	50
5.1.6. Epiisopiloturina previne a depleção dos níveis de glutathiona (GSH) do cólon de camundongos .....	51
5.1.7. Epiisopiloturina reduz NO <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub> do cólon de camundongos .....	52
5.1.8. Epiisopiloturina reduz os níveis IL-1β e TNF-α do cólon de camundongos .....	53
<b>5.2. Interação da Epiisopiloturina com o receptor muscarínico M1 por docagem molecular.. .....</b>	<b>55</b>
<b>5.3. Epiisopiloturina reduz parâmetros pró-inflamatórios da colite através da participação do receptor muscarínico M1 .....</b>	<b>55</b>
5.3.1 Epiisopiloturina reduz os escores macroscópicos de lesões através do receptor muscarínico M1 .....	55
5.3.2. Epiisopiloturina reduz o peso úmido do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1 .....	57
5.3.3. Epiisopiloturina reduz o dano histológico do cólon através do receptor muscarínico M1 .....	58
5.3.4. Epiisopiloturina reduz atividade da MPO do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1 .....	61
5.3.5. Epiisopiloturina reduz a concentração de MDA do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1 .....	62
5.3.6. Epiisopiloturina previne a depleção dos níveis de GSH do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1 .....	63

5.3.7. Epiisopiloturina reduz $\text{NO}_3/\text{NO}_2$ do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1 .....	64
5.3.8. Epiisopiloturina reduz os níveis IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1.....	65
5.3.9. Epiisopiloturina reduz a expressão de NF $\kappa$ B e iNOS e COX-2 em tecido do cólon de camudongos através do receptor muscarínico M1 .....	67
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>
<b>Anexo 1. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPI. ....</b>	<b>96</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII's) são um grupo de doenças do trato gastrointestinal representadas principalmente pela doença de Crohn (DC) e colite ulcerativa (CU). A colite ulcerativa é uma doença crônica que acomete o cólon e reto, caracterizada por ulcerações da mucosa e submucosa do cólon sem afetar as camadas mais profundas da parede intestinal. Essa doença apresenta como sintomas: dor abdominal, diarreias, febre, tenesmo, fadiga, perda de peso e anemia (CONRAD et al., 2014; HINDRYCKX et al., 2016).

De acordo com os dados epidemiológicos a prevalência mundial das DII's variara de acordo com a região geográfica. Observa-se uma incidência de colite ulcerativa > 7,71 /100.000 habitantes-ano no norte europeu e América do Norte e de 0,68 /100.000 habitantes-ano no Sudeste da Ásia. No Brasil, houve uma variação da incidência de CU entre 1,86 a 3,09 /100.000 habitantes por ano, e no período de 1988 a 2012, foi observada um aumento de 14,9% (i.c. 95% - 10,4 a 19,6) dos casos, o que aponta um aumento significativo da sua incidência (NG, et. al.,2017; FROES et al., 2018; KOTZE et al., 2019).

A etiologia da colite permanece desconhecida, mas evidências mostram que esta doença pode resultar de uma resposta imune desregulada (CETINKAYA et al., 2005; HILL e ARTIS, 2010), sendo caracterizada pelo aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, elevado infiltrado inflamatório com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na mucosa do cólon (DAMIANI et al., 2007; REIFEN et al., 2004; ROBERTS-THOMSON et al., 2011).

Na perspectiva da elucidação dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia e no tratamento da CU foram criados os modelos experimentais que fizessem uma alusão à fisiopatologia da doença. O modelo experimental de indução da colite pela administração intracolônica de ácido acético é um método simples, reproduzível, de baixo custo e apresenta similaridades com a colite ulcerativa em humanos. Por ser um modelo de características agudas é possível investigar os componentes envolvidos na inflamação, bem como avaliar a eficácia de novas drogas (GUAZELLI et al., 2013).

Atualmente, as terapias convencionais utilizadas na colite ulcerativa apresentam como objetivo o controle da inflamação, alívio da dor abdominal e

manutenção da remissão da doença. Geralmente os medicamentos mais utilizados são os aminosalicilatos, corticosteroides, imunomoduladores e modificadores da resposta biológica (BURGER; TRAVIS 2011; MEIER; STURM 2011; YADAV; LIU 2009). No entanto, estas terapias estão associadas com uma variedade de efeitos colaterais que incluem dor abdominal, náuseas, vômitos, perda de apetite, dentre outros. A alta incidência de efeitos colaterais limita o uso de tais medicamentos, fazendo-se necessário, e indispensável, o desenvolvimento de substâncias com baixos efeitos colaterais e que sejam eficazes no tratamento da colite ulcerativa. Uma alternativa é o uso de compostos naturais derivados de plantas com propriedades medicinais (PLATT, 2013; SOBCZAK et al., 2014).

Existem várias espécies de plantas com propriedades medicinais catalogadas no Brasil. Dentre elas, destacam-se o jaborandi, da espécie *Pilocarpus microphyllus*, a qual é utilizada para o isolamento de alcaloides como propriedades farmacológicas. Um dos principais alcaloides extraídos da folha do jaborandi é a pilocarpina, utilizada para o tratamento do glaucoma e xerostomia. A partir da extração da pilocarpina, é gerado um resíduo industrial que apresenta como alcalóide majoritário o composto imidazólico epiisopiloturina, que possui estrutura química similar a pilocarpina, tornando-a um alcaloide promissor quanto as suas propriedades farmacológicas. (VERAS et al., 2013; LIMA et al., 2017.)

A epiisopiloturina teve seu efeito anti-inflamatório comprovado em estudos de inflamação geral e doença de Chron (VERAS, DE CARVALHO), mostrando-se promissora como alternativa terapêutica para tal patologia, tornando-se importante o estudo da via bioquímica de ação desse composto nas doenças inflamatórias intestinais. Nos últimos anos, estudos verificaram a relação do sistema nervoso autônomo (SNA) com a resolução do processo inflamatório no trato gastrointestinal (PAVLOV E TRACEY, 2005; GHIA et al., 2009).

O processo inflamatório pode ser regulado por estímulo vagal eferente através de uma via denominada via anti-inflamatória colinérgica, regulada principalmente pelo neurotransmissor acetilcolina. Esta via possui regulação periférica e central e apresenta potencial implicação terapêutica modulada por células imunológicas, tornando-se assim base para possível alvo de tratamento de doenças inflamatórias.

Nossa hipótese é que a epiisopiloturina atue na colite ulcerativa por meio da ativação da via anti-inflamatória colinérgica, especificamente no receptor muscarínico M1 presente no cólon, uma vez que a molécula é derivada e similar estruturalmente a

pilocarpina, um agente colinérgico de ação parassimpática que age como agonista em receptores muscarínicos.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1. Colite Ulcerativa**

A DC e a CU representam os dois principais tipos de doenças inflamatórias intestinais. A colite ulcerativa é uma doença crônica, que se caracteriza por úlceras na mucosa intestinal, sangramento retal, diarreia e dor abdominal (BAUMGART; SANDBORN, 2007; HINDRYCKX et al., 2016).

A CU consiste na inflamação que envolve a mucosa e submucosa do cólon e do reto, de modo contínuo, podendo ser limitada ao reto ou ao retossigmóide, e geralmente afeta a camada superficial do epitélio formando úlceras. Se caracteriza ainda pela presença de abscessos nas criptas intestinais e infiltrado de células inflamatórias (ISKANDAR; CIORBA, 2012). Dependendo da extensão anatômica da colite ulcerativa, ela pode ser classificada como proctite, em que a inflamação limita-se ao reto (11% dos casos), colite do lado esquerdo, que afeta o reto e o lado esquerdo do cólon (27% dos casos) ou pancolite, que afeta todo o cólon (62% dos casos) (BAUMGART; SANDBORN 2007; SOBCHAK et al., 2014).

A CU é caracterizada por formas clínicas graves, com ocorrência de recidiva e remissões em aproximadamente 50-80% dos pacientes. Além disso, há intensa correlação da gravidade com a extensão da doença (ISKANDAR; CIORBA, 2012). As manifestações extra intestinais comuns e clinicamente importantes em pacientes com CU, são as artropatias inflamatórias e a colangite esclerosante primária, que atingem aproximadamente 11% e 75% dos pacientes, respectivamente (VELOSO, 2011).

Estudos sistemáticos relatam que a incidência e prevalência das DII estão em crescimento na América Latina (KOTZE, et. al., 2019). No Brasil, a prevalência de CU subiu de 0,24/100.000 entre os anos de 1986 a 1990 para 14,1/100.000 em 2014. MOREIRA, et. al, 2019, descreve a epidemiologia da DII no Brasil a partir de dados do DATASUS. O autor identificou 162.894 pacientes com DII, sendo que destes 59% são portadores de CU. A prevalência da RCU foi descrita como sendo de 46 casos por 100.000 habitantes. Os estudos mostram ainda que as taxas de incidência das DII triplicaram de 2008 para 2017 e que a distribuição da prevalência demonstrou um gradiente Norte-Sul, com prevalência maior ao Sul-sudeste do Brasil (KOTZE, et. al., 2019; MOREIRA, et.al. 2019).

Os pacientes com colite ulcerativa necessitam frequentemente de tratamento contínuo ou intermitente em todo o curso da doença, e 40% dos pacientes necessitam de intervenção cirúrgica (COHEN et al., 2010). Aproximadamente 20% dos pacientes têm pelo menos uma exacerbação aguda grave da doença durante a sua vida, que, geralmente requer hospitalização (HINDRYCKX et al., 2016).

De acordo com alguns estudos, os indivíduos com colite ulcerativa são mais propensos a ter câncer colorretal variando de 0,2 a 34%, dependendo do tempo de diagnóstico, extensão e duração da doença (EADEN et al., 2001; MALTZMAN; KORETZKY et al., 2003). A incidência de câncer colorretal em pacientes com colite ulcerativa é de 1,6% após 10 anos, 8,3% após 20 anos e 18,4% após 30 anos de duração da doença (MEYER et al., 2016). Dessa maneira, a prevenção da recidiva e o tratamento eficaz se fazem necessário, como uma forma de melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos.

Nos Estados Unidos e países ocidentais, a colite ulcerativa representa uma doença onerosa combinada com a perda de produtividade. O sistema de cuidado de saúde nos Estados Unidos gasta de 3,4 a 8,6 bilhões dólares com a CU e de 5,4 a 12,6 milhões de euros na União Europeia, sendo a perda financeira com a hospitalização a principal despesa direta da saúde (COHEN et al., 2010). Não há na literatura científica o custo financeiro no Brasil com o tratamento dos pacientes com RCU.

## **2.2. Modelos experimentais de doenças inflamatórias intestinais.**

Os modelos experimentais de doenças inflamatórias podem ser desenvolvidos de diferentes maneiras, uma vez que os riscos oriundos da pesquisa em humanos são grandes. Cada modelo pode ser classificado de acordo com suas características, como em casos agudos e crônicos de colite e com formas diferentes de indução, por via oral ou retal, podendo ser tóxicas, imunomediadas, infecciosas e espontâneas (DE SMET, 2007).

Os modelos químicos de colite têm muitas semelhanças com a CU em humanos, e tornaram-se ferramentas úteis para estudar a patologia das doenças. A colite nos modelos animais tem início definido e são caracterizadas pela desregulação de citocinas com potencial para a caracterização da modulação imunológica e

inflamatória na iniciação e perpetuação da patogênese da DII (ABDEL-SALAM et al., 2009; SILVA et al., 2018).

Os modelos experimentais de colite auxiliam na investigação de diferentes aspectos relacionados ao processo inflamatório do cólon. Inúmeros trabalhos foram publicados demonstrando a eficácia dos modelos experimentais de colite para o estudo dessa doença, avaliando aspectos da biologia molecular, fisiologia, uso de drogas, protetores ou indutoras de colite e também de estresse oxidativo (MIRANDA et al., 2007).

Dentre estes modelos, o de indução tóxica pelo ácido acético tem sido muito utilizado pela praticidade e apresentação aguda da doença. Existem vários métodos de administração do ácido acético: (1) aplicação tópica na serosa; (2) injeção intraluminal através de ceco previamente isolado e lavado com uma solução tamponada (3) instilação em um segmento colônico exteriorizado por duas colostomias ou (4) através de enemas por cateter introduzido de 3,0 a 8,0 cm da borda anal (AMARAL et al., 2001). As concentrações e os volumes de ácido acético variam de 4 a 50% e de 1,0 a 2,0 mL, respectivamente, enquanto os tempos de permanência do ácido também variam de segundos até horas. A concentração utilizada determina a intensidade das lesões observadas. As lesões apresentam-se mais intensas, tanto macro como microscopicamente, na primeira semana, apresentando recuperação praticamente completa ao final da segunda semana (ZAHAVI et al., 1995).

Embora seja um modelo claramente tóxico, é provável que a resposta inflamatória resultante seja devida ao produto do influxo de conteúdo luminal para a lâmina própria decorrente da destruição das células epiteliais com perda da barreira epitelial entre as células imunológicas da lâmina própria e os antígenos do lúmen. Como a colite induzida é precoce e aguda, é possível a utilização deste modelo no estudo da fase aguda da doença, a fim de investigar qual ou quais componentes da doença inflamatória intestinal são produtos de um componente inflamatório agudo, bem como avaliar a eficácia farmacológica de novas drogas nesta fase da doença. Foi observado que a eficácia da ciclosporina no tratamento de RCU induzida por ácido acético, tendo como parâmetros de avaliação as alterações macro e microscópicas da mucosa colônica, bem como as modificações no peso, ingesta alimentar e características das fezes. (AMARAL et al., 2001).

### 2.3. Terapêutica da Colite Ulcerativa

Atualmente, as terapias clínicas disponíveis para a colite ulcerativa baseiam-se principalmente no controle da inflamação, alívio da dor abdominal, manter a remissão da doença e fornecer uma melhor qualidade de vida para os pacientes. No entanto, a falta de um tratamento eficaz e com menos efeitos colaterais, representa um importante problema de saúde pública, uma vez que a patologia gera um impacto significativo na qualidade de vida dos indivíduos (BURGER; TRAVIS, 2011; YADAV; LIU, 2009).

Os principais agentes terapêuticos utilizados na CU, de média a moderada, são os aminosalicilatos, ácido 5-aminossalicílico (mesalazina) e seu derivado, a sulfassalazina, que exibe potencial analgésico e anti-inflamatório (TRAVIS et al., 2008). O mecanismo de ação da sulfassalazina consiste em reduzir a produção de interleucinas, a migração de leucócitos polimorfonucleares, a lipoxigenase das células e na produção dos leucotrienos pró-inflamatórios (LTB4 e 5-HETE) pelos macrófagos da parede intestinal e produção de prostaglandinas (PODOLSKY, 2002). Porém, pode causar alguns efeitos colaterais como dor abdominal, náuseas, vômitos, além de reações alérgicas em mais de um terço dos indivíduos que recebem dose de manutenção do fármaco e em metade dos que recebem doses terapêuticas (GISBERT, 2002; YADAV; LIU, 2009).

Uma alternativa de tratamento para pacientes com colite ulcerativa, que não respondem à terapia com os aminosalicilatos, são os corticosteroides, sendo a prednisolona o medicamento mais utilizado. Os corticosteroides inibem o desenvolvimento da fase precoce do processo inflamatório por reduzirem a cascata de citocinas inflamatórias e pela inibição da migração de leucócitos (GIRLICH et al., 2012). No entanto, quase 25% dos pacientes que utilizam os fármacos esteroides torna-se dependente após 1 ano de uso (FAUBION et al., 2001). O uso prolongado ou com altas doses desse fármaco estão relacionados a efeitos adversos que limitam seu uso, entre eles: complicações cutâneas, oculares, endócrinas, músculo-esqueléticas, gastrointestinais e infecciosas (ARDIZZONE; PORRO, 2002; PEARSON, 2004).

Os medicamentos imunossupressores também podem ser utilizados na terapia dos pacientes com colite ulcerativa, como a azatioprina e seu metabolito ativo 6-mercaptopurina, antimetabólitos estruturais das purinas, que são essenciais para a formação de ácidos nucléicos. A azatioprina e 6-mercaptopurina inibem a síntese de

DNA, causando à inibição da proliferação das células que participam da resposta imune como os linfócitos T e B (AL HADITHY et al., 2005; MALTZMAN, et al., 2003; PAOLUZI, et al., 2002). Porém, a utilização desses medicamentos causa muitos efeitos adversos ao organismo, como supressão da medula óssea, aumento progressivo dos níveis das enzimas hepáticas e pancreatite, sendo muitas vezes necessário o cancelamento imediato do tratamento (MEIER; STURM, 2011).

Outra opção terapêutica é a terapia biológica, reservado para indivíduos com CU moderada ou severa, ou para pacientes não tolerantes ou não responsivos ao tratamento com tiopurinas), sendo bastante utilizado o Infiximabe, um anticorpo monoclonal que neutraliza a citocina TNF- $\alpha$  produzida pelo sistema imunológico (BURGER; TRAVIS, 2011. Foi relatada uma significativa melhora dos sintomas apresentado pelos pacientes com DII's em aproximadamente dois terços dos indivíduos após uma única dose intravenosa de infliximabe, e um terço dos pacientes obtiverem remissão completa da doença (CASSINOTTI; TRAVIS, 2009). No entanto, a utilização desse medicamento apresenta efeitos indesejáveis que incluem náuseas, cefaleia, febre, dor abdominal e pode aumentar o risco de infecções graves (CASSINOTTI; TRAVIS, 2009; GENERINI et al., 2004; SOBCZAK et al., 2014).

Uma vez que a farmacoterapia para colite ulcerativa apresenta significativos efeitos colaterais associados a sua utilização que comprometem a adesão e progressão ao tratamento, se faz necessário o estudo e desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para esta doença, que atuem em vias bioquímicas específicas, a fim de aumentar a eficácia do tratamento, diminuir os efeitos adversos e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

## **2.4. Plantas medicinais aplicadas ao tratamento das Doenças Inflamatórias Intestinais.**

O uso dos medicamentos convencionais por períodos prolongados pode levar ao aparecimento de sérios efeitos colaterais e assim limitar seu uso. Por essa razão, o desenvolvimento de novas substâncias que combinem eficácia e baixos efeitos colaterais no tratamento das afecções inflamatórias intestinais configura uma alternativa indispensável (PLATT, 2013).

Vários estudos mostram o uso de plantas e seus compostos bioativos como alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias. Por exemplo,

efeitos benéficos de diferentes compostos antioxidantes em modelos experimentais de colite induzida por TNBS em ratos têm sido relatados. Wu et al. (2011), estudaram o efeito protetor de extrato de antocianinas de *Vaccinium ashei*, popularmente conhecida como mirtilo ou uva-do-monte, em modelo de DII induzida por injeção intracolônica de 0,5 mg de TNBS dissolvido em etanol a 50%, em ratos, que demonstrou um considerável efeito protetor contra os danos no cólon a uma dose de 40 mg/Kg de extrato, prevenindo a perda de peso e a diarreia, e reduzindo os níveis da enzima mieloperoxidase (MPO), a concentração de óxido nítrico (NO), IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

Outro manuscrito publicado em periódico de circulação internacional, demonstrou que o ácido taurohioideoxicólico (THDCA) extraído de *Pulvis Fellis Suis* foi capaz de reverter parâmetros da inflamação colônica induzida por TNBS, como por exemplo, a atividade da enzima MPO, a concentração de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6), além de atenuar os danos gerados na mucosa do cólon de animais com colite (HE et al., 2011).

Alguns medicamentos botânicos, bem como seus mecanismos e os compostos ativos, foram avaliados em ensaios clínicos na DII humana, dentre os quais estão *Aloe vera*, *Andrographis paniculata*, *Artemisia absinthium*, *Boswellia serrata*, *Cannabis sativa* e *Curcuma longa* (ALGIERI et al., 2013). A planta *Cannabis sativa* foi relatada em vários estudos como portadora de efeitos benéficos para pacientes com doenças inflamatórias do intestino. Naftali et al. (2013) realizaram um estudo prospectivo em 21 pacientes com idade média de 40 anos, portadores da DC ativa, os quais foram tratados com a planta contendo 115 mg de D9-tetra-hidrocanabinol (THC) durante 8 semanas. Neste estudo, o efeito da planta na remissão da doença não foi superior ao placebo, mas produziu benefícios clínicos por diminuir efeitos colaterais.

Essa tentativa da descoberta de produtos de origem vegetal como alternativa de tratamentos das doenças inflamatórias intestinais se torna crescente. Mesmo sabendo que o número de ensaios experimentais para tal fim cresce constantemente, ainda não foi possível propor um novo fitoterápico para a prevenção e controle da inflamação que ocorre durante o desenvolvimento da CU. Assim, o nosso estudo busca elucidar a via de ação de uma nova substância com esse potencial terapêutico.

## 2.5. Jaborandi como fonte de alcaloides com propriedades terapêuticas

Existem várias espécies de plantas com propriedades medicinais catalogadas no Brasil. Dentre as espécies medicinais produtoras de princípios ativos de grande interesse, destacam-se as plantas conhecidas pela denominação jaborandi, que incluem várias espécies nativas e cultivadas no Brasil, sobretudo a *Pilocarpus microphyllus*. Esta espécie é utilizada como matéria prima para isolamento de alcalóides com propriedades farmacológicas. Os alcalóides são uma importante classe de compostos estruturalmente diversificados que possuem átomos de nitrogênio no anel heterocíclico e são derivados de aminoácidos (LIMA et al., 2015).

*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holmes, é uma planta arbustiva de pequeno porte, pertencente à família *Rutaceae*, que possui uma morfologia bem característica: folhas pequenas com formato de cachos compactos e seus frutos formam cachos brancos dispostos em cápsulas de cor acinzentada e lisa. No território brasileiro, essa espécie pode ser encontrada na região leste amazônica e nas regiões Centro e sul nordestino, sendo largamente distribuída no Piauí e Maranhão (LIMA et al., 2015).

**Figura 1: Jaborandi – *Pilocarpus microphyllus***



Fonte: <https://www.vegetall.com.br/>

A partir das espécies de jaborandi (*Pilocarpus sp*), já foram identificados os seguintes alcaloides: pilocarpina, isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina,

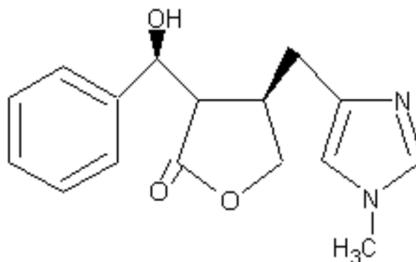
epiisopilosina, epiisopiloturina. Alguns deles já tiveram as suas estruturas químicas determinadas, porém ainda sem descrição de atividade farmacológica, podendo ser promissores como o objetivo de pesquisa pré-clínica, para a medicina humana e veterinária. (SANTOS; MORENO, 2004; SAWAYA; COSTA; MAZZADERA, 2015; VERAS et al., 2013).

O gênero *Pilocarpus*, enfaticamente a espécie *Pilocarpus microphyllus* tem grande importância econômica e industrial e estabelece perspectivas futuras na descoberta de novas aplicações farmacológicas e biotecnológicas dos demais alcaloides que até o momento permanecem desconhecidas (LIMA et al., 2015). A pilocarpina é considerada como o protótipo dos alcalóides que são extraídos da biomassa do jaborandi e esse alcalóide colinérgico é encontrada em altas concentrações nas folhas dessa planta. Sua estrutura trata-se de uma amina terciária, que apresenta ações nicotínicas e muscarínicas, porém com predominância das ações muscarínicas e possui efeitos discretos sobre o coração e o trato gastrointestinal (VITAL; ACOO, 2006).

## **2.6. Epiisopiloturina e uso terapêutico**

Um dos principais alcaloides extraídos do jaborandi é a epiisopiloturina. Sua estrutura química (Figura 2) é semelhante a pilocarpina, devido a presença de um anel imidazólico ligado a um ciclopentano heterocíclico através de uma ligação C-C, diferindo apenas pela presença de um grupamento hidrobenzílico ao invés de um etílico. A semelhança estrutural entre as estruturas moleculares destes dois compostos torna a epiisopiloturina um alcaloide promissor quanto as suas propriedades farmacológicas (VERAS et al., 2013). Acredita-se que as propriedades biologicamente ativas da epiisopiloturina, são devido a presença do anel imidazólico, pois a literatura é consistente ao mostrar que moléculas que contém anéis imidazólicos apresentam potencias propriedades farmacológicas (RANI; SHARMA; SINGH, 2013).

**Figura 2 – Estrutura química da Epiisopiloturina**



Fonte: SANTOS; MORENO, 2004.

VERAS et al. (2012), mostrou em seu estudo que a epiisopiloturina possui efeito antiparasitário, sendo capaz de inibir o crescimento e proliferação do parasita *Schistosoma mansoni* em diferentes estágios do seu desenvolvimento, sem toxicidade em células mamárias. O tratamento *in vivo* contra o parasita em fase juvenil com uma dose de 40 mg/Kg apresentou uma redução de 50,2% da carga parasitária total em ratos, e com DL50 de 8000 mg/Kg avaliado em cortes histológicos de fígado, baço, pulmão e rim (GUIMARÃES et al., 2015).

Em outro estudo envolvendo a epiisopiloturina, verificou-se que esse alcaloide foi capaz de inibir o processo inflamatório agudo gerado em modelos clássicos de inflamação (SILVA et al., 2013). A atividade anti-inflamatória da molécula foi avaliada usando o modelo de peritonite e edema de pata induzido por vários agentes em camundongo Swiss, e foi verificado que o pré-tratamento com a molécula (0,1; 0,3; e 1 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina, além do que a dose de 1 mg/kg inibiu efetivamente o edema induzido por dextrana, serotonina e bradicinina (SILVA et al., 2013). Adicionalmente, reduziu a migração leucocitária, a atividade de MPO e os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na cavidade peritoneal, neste mesmo estudo.

Uma formulação lipossomal também já foi proposto para a epiisopiloturina, devido seu caráter apolar, com difícil solubilidade AQUOSA, sendo que os lipossomas carregados com o alcaloide (300  $\mu$ g/ml) foram capazes de eliminar 100% do *Schistosoma mansoni in vitro* (GUIMARÃES et al., 2015).

### 1.7 A via colinérgica intestinal

A ação da acetilcolina no epitélio colônico pela estimulação de receptores muscarínicos é bem conhecido (HIROTA; MCKAY, 2006). Existem diferentes subtipos de receptores muscarínicos, com diferente distribuição tecidual, que vão de M1 a M5.

No trato gastrointestinal, estão presentes os receptores muscarínicos do subtipo M1 que localizam-se em neurônios entéricos que modificam indiretamente a função intestinal, por meio da alteração da liberação de neurotransmissores (HARRINGTON et al. 2010; BADER et al. 2014).

A diversidade de receptores muscarínicos nos neurônios do sistema nervoso autônomo é bem conhecido. Por exemplo, neurônios submucosos expressam receptores muscarínicos M1 pós-sinápticos, que, na estimulação, levam a uma despolarização da membrana (EGLEN, 2001; HAGA, 2013). A cascata de sinalização iniciada pela estimulação de receptores muscarínicos M1 e M3 consistem na mediada pela proteína Gq, com estimulação da fosfolipase C, seguida da produção de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e liberação de  $Ca^{2+}$  de armazenamentos intracelulares (WESSLER, 2008; KHAN, 2013; ).

No epitélio intestinal, a consequência funcional é uma forte estimulação da secreção de  $Cl^-$ , mediada principalmente pela ativação de canais de  $K^+$  dependentes de  $Ca^{2+}$ , o que leva a hiperpolarização da membrana favorecendo indiretamente o efluxo de cloreto. Isto é suportado por uma abertura transitória de canais  $Cl^-$  apicais dependentes de  $Ca^{2+}$  (STRABEL; DIENER, 1995; SCHULTHEISS et al., 2005; Delmas & Brown, 2005).

A ACh é um importante regulador dos fluxos iônicos eletrogênicos que governam os movimentos direcionais da água no intestino. Identificação dos subtipos de receptores de ACh envolvidos nesse processo, nem sempre foi simples, e isso é parcialmente atribuível à falta de agonistas farmacológicos e antagonistas com alta especificidade para subtipos de receptores. Na maioria das vezes, no entanto, é geralmente aceito que o controle colinérgico do transporte iônico intestinal é realizado predominantemente via ativação de receptores M1 e M3 em neurônios e enterócitos, respectivamente (HABERBERGER et al., 2006; HIROTA; MCKAY, 2006).

Ao se comparar a eficiência do bloqueio de diferentes antagonistas muscarínicos, é evidente que em alguns tecidos, como por exemplo, cólon de rato, não apenas bloqueadores de receptores muscarínicos M3 mas também antagonistas M1, como pirenzepina ou telenzepina, inibem a secreção de cloreto induzida por acetilcolina ou por estimulação elétrica, que estimula a liberação de neurotransmissores de neurônios entéricos (FIGUEROA, 2010; MITCHELSON, 2012).

Do ponto de vista patológico, a infecção intestinal e a inflamação, afeta profundamente as funções absorptivas e/ou secretórias do intestino, alterando o balanço hídrico, levando a diarreia ou constipação. No entanto, e aparentemente paradoxalmente, a disfunção intestinal é frequentemente caracterizada por uma hiporresponsividade geral e prósecretória à agentes, incluindo os colinomiméticos. Em algumas patologias inflamatórias, tal hiporresponsividade poderia simplesmente refletir na falta de integridade epitelial, embora não seja uma explicação adequada para a maioria das patologias intestinais. De fato, há evidências significativas que implicam em vários mecanismos específicos na hiporresponsividade colinérgica associado com a infecção intestinal e inflamação (AMARAL et al., 2001; HABERBERGER et al., 2006).

Um estudo de modulação da via inflamatória intestinal foi realizado em camundongos com colite induzida por ácido acético e tratados com o agonista muscarínico MCn-A-343, e com o antagonista muscarínico do receptor M1, pirenzepina, que inferiu que receptor muscarínico M1 está envolvido na resposta anti-inflamatória e antioxidante no modelo de colite induzida experimentalmente, onde essa ação foi comprovada e inibida pela administração do antagonista muscarínico do receptor M1, pirenzepina. Tal estudo demonstrou a importância de uma via endógena no combate a injúria intestinal (MAGALHÃES, 2017).

O alcalóide epiisopiloturina mostrou ter propriedades anti-inflamatórias e efeitos antioxidantes em um modelo de DC experimental induzida por ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) em ratos, em um estudo que concluiu que a epiisopiloturina foi capaz de diminuir critérios de inflamação, incluindo a macroscopia e critérios microscópicos de lesão, liberação de MPO, IL-1 $\beta$  e redução de danos associados à oxidação tecidual, bem como a restauração de concentrações endógenas de GSH e redução da expressão elevada de enzimas pró-inflamatórias, como iNOS e COX-2. (CARVALHO et al., 2018).

Foi mostrado as propriedades anti-inflamatórias da epiisopiloturina no trato gastrointestinal, porém não sabe-se ainda por qual via esse mecanismo ocorre. Devido a participação já evidenciada do sistema colinérgico nas injúrias intestinais, e da comprovação das propriedades anti-inflamatórias da epiisopiloturina, é relevante estudar por qual via ela proporciona esse efeito, considerando-se a via colinérgica muscarínica, como possível via de ação da mesma.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral:

✓ Verificar a participação do receptor muscarínico M1 no efeito anti-inflamatório da epiisopiloturina na colite ulcerativa experimental.

#### 3.2. Específicos:

✓ Verificar a interação molecular da EPI com o receptor M1 através de cálculos computacionais e aproximações empíricas.

✓ Avaliar os escores macroscópicos e microscópicos de lesão, peso úmido do cólon de camundongos tratados ou não com epiisopiloturina e pirenzepina na colite induzida por ácido acético;

✓ Averiguar a concentração da enzima mieloperoxidase (MPO), dos indicadores de peroxidação lipídica, tais como glutathione (GSH) e malondialdeído (MDA) no cólon de camundongos tratados ou não com epiisopiloturina e pirenzepina na colite induzida por ácido acético;

✓ Determinar os níveis de nitrato e nitrito na mucosa do cólon de camundongos tratados ou não com epiisopiloturina e pirenzepina na colite induzida por ácido acético;

✓ Mensurar a concentração de IL-1 $\beta$ , e TNF- $\alpha$  mucosa do cólon de camundongos tratados com epiisopiloturina ou pirenzepina durante colite induzida por ácido acético;

✓ Verificar a participação do receptor muscarínico M1 durante a ação anti-inflamatória da epiisopiloturina na colite ulcerativa experimental, através de todos os marcadores acima citados, no cólon de camundongos durante a colite induzida por ácido acético;

✓ Verificar a participação do receptor M1 na ação anti-inflamatória da epiisopiloturina sobre a expressão proteica via Western Blot para NF $\kappa$ B, COX-2 e iNOS durante a colite induzida por ácido acético.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Animais

Para estudo experimental usando o modelo de colite por ácido acético *in vivo*, foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (25–30g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram transportados em carro oficial da UFPI, dotados de sistema de refrigeração e foram alocados em gaiolas de polipropileno com grades, ração e água. Durante todo o transporte os animais foram acompanhados pela veterinária do *Campus* Ministro Reis Velloso e foram mantidos no *Campus* Ministro Reis Velloso no Laboratório de Fisiologia-Farmacologia Experimental- LAFEX até a realização dos experimentos. Para cada experimento foi utilizado um número de 7 animais por grupo (n=7). A quantidade de animais por grupo, se dá devido a utilização de substâncias químicas durante os procedimentos experimentais, o que pode levar alguns animais a óbito, e a quantidade de testes que será realizado com os segmentos intestinais dos animais, que são de tamanho pequeno, sendo necessário repetir os protocolos para se obter amostras suficientes. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro (12/12h) controlados. Além disso, até o momento da realização dos experimentos os animais permanecerão com ração apropriada e água *ad libitum*. Todos os tratamentos e procedimentos realizados estão de acordo com o Guia de Cuidado em Uso de Animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 4.2. Considerações Éticas

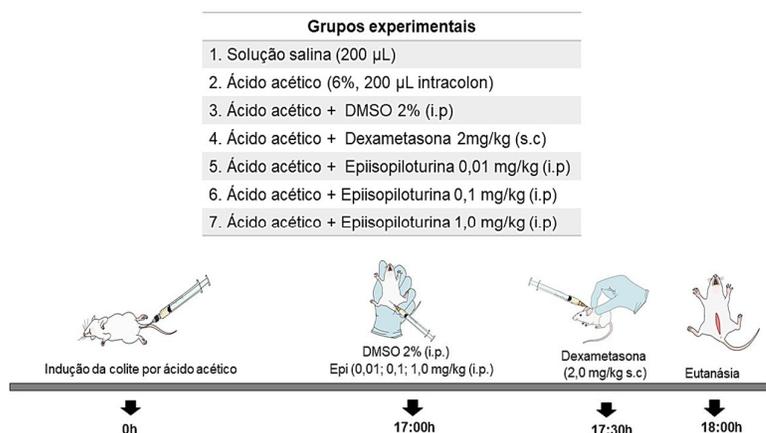
Os procedimentos e protocolos experimentais usados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Piauí sob o número de protocolo 464/18 (Anexo 1). Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionalmente aceitas para utilização de animais em projetos de pesquisa e do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

### **4.3. Avaliação ação anti-inflamatória da epiisopiloturina na colite induzida por ácido acético.**

A colite foi induzida por ácido acético de acordo com método descrito por Guazelli et al., (2013) com modificações. Os animais foram mantidos em jejum durante 16 horas para indução da colite e anestesiados com uma associação de xilazina (8 mg/kg) e quetamina (60 mg/kg) via intraperitoneal. Após, foi realizada a lavagem do cólon com 100 µL de solução salina, e administrado uma única dose intracolônica de solução salina a 0,9% ou uma com pH a 2,5 no volume de 200 µL. Os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para ser introduzido por via retal uma sonda de polietileno com 3 centímetros de comprimento para administração das soluções de ácido acético ou salina. Cada animal permaneceu suspenso pela cauda por 30 segundos para evitar o retorno das soluções. Os animais foram eutanasiados 18 horas após a indução da colite e retirado um segmento de 5 cm do cólon para análise dos parâmetros inflamatórios.

A atividade anti-inflamatória da epiisopiloturina no curso da colite induzida por ácido acético foi avaliado administrando-se a substância nas doses de 0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg (diluída em DMSO a 2%), via intraperitoneal, 17 horas após a indução da colite, para determinação da melhor dose de epiisopiloturina capaz de diminuir os parâmetros inflamatórios. O protocolo experimental foi realizado com 7 grupos de animais, cada um contendo 6 animais, conforme figura 3.

**Figura 3. Representação esquemática do protocolo experimental de avaliação da resposta anti-inflamatória da epiisopiloturina no curso da colite por ácido acético.**



Fonte: Autoria própria.

#### 4.4. Análise de parâmetros inflamatórios

Após a eutanásia dos animais submetidos aos protocolos experimentais de tratamento, os segmentos do cólon foram retirados para avaliação do peso úmido, parâmetros macroscópicos e microscópicos, dosagem de MPO, GSH, MDA, Nitrito e Nitrito, citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ).

##### 4.4.1. Mensuração do peso úmido do cólon dos animais

Os animais foram eutanasiados pela utilização de uma dose letal de Quetamina (240 mg/kg) combinado com Xilazina (30 mg/kg) de acordo com a dose anestésica utilizada por Guazelli et al. (2013). Em seguida, foi realizada uma incisão mediana com abertura da cavidade peritoneal. Após a identificação do cólon, foi isolado uma extensão de 5 cm do intestino dos animais. A peça foi aberta longitudinalmente, lavada com soro fisiológico e pesada em balança de precisão afim de determinar o peso úmido do cólon. Os resultados foram expressos em porcentagem de aumento de peso do cólon (g) em comparação com um grupo controle normal, sem colite.

##### 4.4.2. Avaliação dos escores macroscópicos e microscópicos de lesão

Os animais foram eutanasiados, pela utilização de uma dose letal de Quetamina (240 mg/kg) combinado com Xilazina (30 mg/kg) de acordo com a dose

anestésica utilizada por Guazelli et al. 2013, após indução e/ou indução e tratamento da colite, obedecendo o protocolo de tratamento de cada grupo. Em seguida, foi realizada uma incisão mediana com abertura na cavidade peritoneal. Após a identificação do cólon, foi isolado uma extensão de 5 cm. A peça foi aberta longitudinalmente, lavada com soro fisiológico e distendida sobre uma superfície plana para uma avaliação do escore macroscópico (tabela 1) seguindo a técnica descrita por Morris (1989) e do escore microscópico (tabela 2) seguindo a técnica descrita por Appleyard e Wallace (1995).

**Tabela 1. Escores Macroscópicos**

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

Fonte: Morris (1989).

**Tabela 2. Escores Microscópicos**

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

Fonte: Appleyard e Wallace (1995)

#### **4.4.3. Ensaio de Mieloperoxidase (MPO)**

Este ensaio foi realizado para avaliar a infiltração de neutrófilos na mucosa intestinal induzida por ácido acético de acordo com protocolo estabelecido por Bradley e colaboradores (1982). Para mensurar a concentração dessa enzima, foi utilizado 50-100 mg do cólon dos animais que foram colocados em tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Posteriormente, foram maceradas em um macerador Polytron (13000 rpm) e centrifugado durante 15 minutos a 3000 rpm em uma centrífuga refrigerada (4°C). Logo em seguida, do sobrenadante foi pipetado numa placa (10µl) em seguida foram acrescentados nessa placa 200µl da solução de leitura (27 ml de H<sub>2</sub>O + 5 mg de O-dianisidina em 3 ml de fosfato de potássio + 15 µl de peróxido de hidrogênio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Em seguida a placa foi lida em um leitor de ELISA a 450nm. O resultado foi expresso em UMPO/mg de tecido.

#### **4.4.4. Dosagem dos níveis de malonildialdeído (MDA) na mucosa intestinal**

Os níveis de MDA na mucosa intestinal foram determinados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978). Os fragmentos da mucosa intestinal foram homogeneizados com KCl gelado 1,15% para o preparo do homogenato a 10% e macerados em um macerador Polytron (13000 rpm). Meio mililitro (0.25ml) desse homogenato foi pipetado dentro de um tubo de centrífuga de 10 ml. Foi acrescentado a esse homogenato 1,5 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1%) e 0,5 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0.6%). Os tubos foram aquecidos por 45 minutos em um banho de água fervendo e a mistura reacional então resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 2 ml de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 1 minuto com um misturador "vortex", centrifugados a 1200rpm por 10 minutos e a absorbância da camada orgânica foi mensurada em 520 e 535nm. Os resultados foram expressos em mmol de MDA/g de tecido.

#### **4.4.5. Dosagem dos níveis de Glutathiona (GSH) na mucosa intestinal**

Para avaliação dos níveis de GSH foi utilizado o método de Sedlak e Lindsay (1968). Em suma, os fragmentos de tecido do cólon foram macerados em um macerador Polytron e centrifugados a 1500rpm por 15 min a 4°C. Na sequência,

alíquotas de 400µL do homogeneizado foram misturadas a 320µL de água destilada e a 80µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Este material foi novamente centrifugado a 3.000rpm por 15 min a 4°C. Foi retirado 400µL do sobrenadante, adicionado 800µL de tampão Tris 0,4M (pH 8.9) e 20µL de DTNB 0,01M (Reagente de Ellman). A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância lida a 412nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em µg de NP-GSH/mL de tecido.

#### **4.4.6. Determinação de nitrato (NO<sub>3</sub>) e nitrito (NO<sub>2</sub>) na mucosa intestinal**

O homogenato do tecido do cólon dos animais foi incubado em uma microplaca com nitrato redutase durante 12 h para converter nitrato (NO<sub>3</sub>) em nitrito (NO<sub>2</sub>). A produção de óxido nítrico foi determinada por medição das concentrações de nitrito no leitor de placas de ELISA a 540 nm, utilizando o método de Green (1982). Os resultados foram expressos como micromol de nitrito utilizando a curva interna padrão. Para a determinação das concentrações colônicas de nitrato e nitrito traves do método de Griess será, inicialmente, preparada uma solução contendo 0,5 unidades por ml de nitrato redutase (Sigma) em um tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> contendo NADPH. Para o preparo da reação de Griess será armazenada separadamente a 4°C em frascos de vidro e protegidos da luz, uma solução contendo Sulfanilamida a 1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 2,5% e outra solução de NEED a 0,1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 2,5%. Depois de preparadas as soluções, as amostras processadas de tecido colônico dos animais, serão incubadas numa microplaca com nitrato redutase (0,016L por poço) durante 12 horas para a conversão de NO<sub>3</sub> (nitrato) em NO<sub>2</sub> (nitrito). A produção de óxido nítrico será determinada medindo as concentrações de nitrito em um leitor de placas de ELISA a 540 nm, utilizando o método de Griess (GREEN et al.,1982). Os resultados serão expressos como micromoles (µM) de nitrito.

#### **4.4.7. Mensuração de Citocinas**

Os fragmentos do cólon dos animais foram retirados para dosagem das citocinas TNF- α, IL-1β. Os fragmentos foram adicionados em um tampão inibidor de protease (500µL de tampão para cada 100 mg de tecido) e depois processados em um homogeneizador de tecido e centrifugado a 3000 rpm a 4°C por 10 minutos.

Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e incubado com 2µg/ml de anticorpo (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2), 100µL por poço por 24 horas a 4°C. A placa foi lavada com PBS -Tween20 a 0,1%. A reação foi bloqueada com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem (100µL por poço por 2 horas à temperatura ambiente). Depois a placa foi novamente lavada usando a mesma solução. A placa foi então incubada com a curva padrão das citocinas (TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8) diluídas em tampão de lavagem e com as amostras de tecido do estômago a serem dosados (100µL por poço por 24 horas a 4°C). A placa foi novamente lavada e depois incubada com o anticorpo biotilado (1:1000) diluído em tampão de lavagem contendo 1% de soro de carneiro por 1h à temperatura ambiente. Novamente a placa foi lavada e depois incubada com avidina peroxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem, (100µL por poço) por 15 minutos à temperatura ambiente. A placa foi lavada e incubada com o-fenilenediaminadiidrocloreto (OPD) em tampão substrato, 100µL por poço, no escuro à temperatura ambiente por um período que de 5 a 20 minutos. A reação foi parada com 150µL por poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro a 490nm e os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM da quantidade de TNF –  $\alpha$ , e IL - 1 $\beta$  em pg/ml (TAVARES-MURTA et al., 2008).

#### **4.5. Estudo de Docagem Molecular**

##### **4.5.1. Avaliação das interações de acoplamento molecular da molécula de Epiisopiloturina com o receptor Muscarínico M1**

O estudo dos descritores moleculares da epiisopiloturina foi realizado utilizando o software Gaussian 09 (<http://gaussian.com/products/>) (FRISCH et al., 2010). O GaussView 5.0.8 foi utilizado para obter as estruturas 3D das moléculas (DENNINGTON et al., 2008). Os cálculos teóricos para a otimização da geometria de equilíbrio da molécula no vácuo foram realizados usando PM6 semi-empírico combinado com o conjunto de bases 6-311 ++G (d,p). Após essa etapa, outra otimização foi realizada, utilizando a Teoria da Densidade Funcional (DFT) e a função híbrida B3LYP, mas com o conjunto de bases 6-31g (d, p). No final, as moléculas foram convertidas para o formato .pdb para uso no estudo do encaixe molecular.

#### 4.5.2. Preparação dos receptores alvo.

A estrutura 3D do receptor muscarínico M1 (cod. pdb 6OIL) foi obtida no banco de dados do Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) (BERMAN et al., 2000). Os arquivos de proteínas foram preparados removendo todas as moléculas de água e outros grupos, como íons, usando CHIMERA v.13.1 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (PETTERSEN et al., 2004).

#### 4.5.3. Estudo de ancoragem molecular

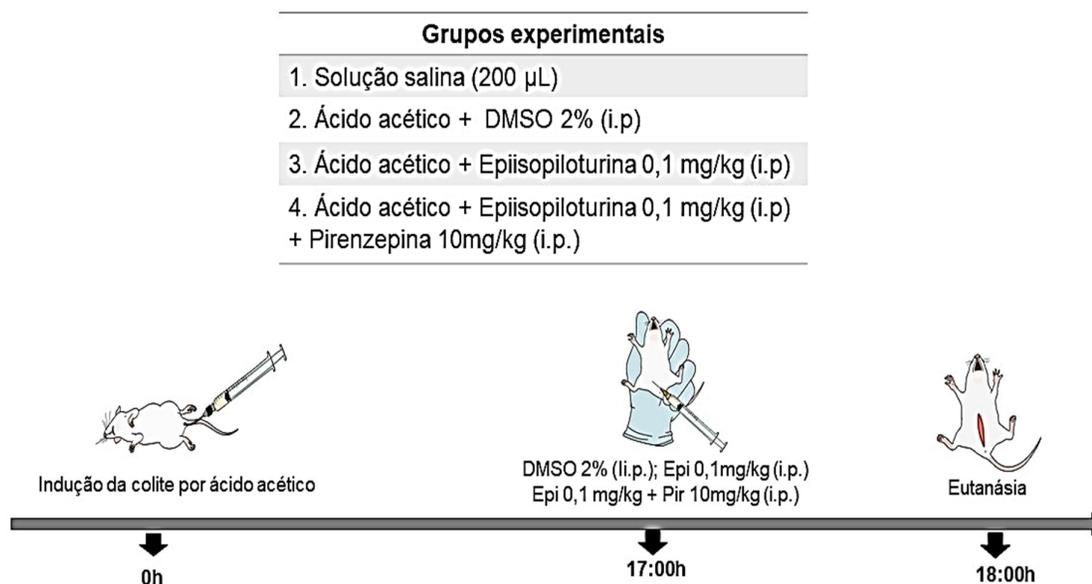
Os cálculos de acoplamento molecular foram realizados com o Autodock v. 4.2.6 (<http://autodock.scripps.edu/>) (MORRIS et al., 2009). As interações receptor-ligante para o receptor muscarínico M1 foram analisadas. Proteínas (receptores) e ligantes foram preparados para cálculos de acoplamento molecular usando o Autodock Tools (ADT), versão 1.5.6. (SANNER, 1999). O alvo foi considerado rígido, enquanto o ligante foi considerado flexível. As cargas parciais de Gasteiger (GASTEIGER; MARSILI, 1980) foram calculadas após a adição de todos os hidrogênios. Os átomos de hidrogênio não polares de proteínas e ligantes foram subsequentemente misturados. Para os cálculos de docagem molecular, foi utilizada uma resolução de 0,375 Å para a grade, que consistia em 60 × 60 × 60 pontos. Os centros das redes de afinidade foram definidos a partir das coordenadas dos átomos de resíduos dos locais ativos de cada alvo. O algoritmo genético lamarckiano (LGA) com busca global (MORRIS et al., 1998) e pseudo-Solis e Wets com busca local (SOLIS; WETS, 1981) foram os métodos utilizados no encaixe molecular. Cada simulação consistiu em 100 corridas independentes (RAMOS et al., 2012). Os outros parâmetros de docagem foram definidos com os valores padrão. As análises de docagem molecular foram concentradas nos aglomerados de menor energia. A menor conformação de energia combinada com inspeção visual foi escolhida para uma análise mais detalhada. A visualização das interações dos complexos com as conformações de menor energia foi realizada no CHIMERA e Ligplot + v.1.4.5 (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>) (WALLACE et al., 1996).

#### 4.6. Avaliação da participação do sistema colinérgico na ação anti-inflamatória da epiisopiloturina na colite induzida por ácido acético.

Para analisar a participação do sistema colinérgico, mas especificamente do receptor muscarínico M1, no mecanismo de ação anti-inflamatória da epiisopiloturina na colite por ácido acético, foi utilizada a melhor dose da epiisopiloturina com efeito anti-inflamatório encontrada no ensaio anterior (0,1 mg/kg), e sua ação foi bloqueada usando o antagonista do receptor M1, pirenzepina (10mg/kg) de acordo com o estudo de Mendes et al., (2009). O tratamento com a epiisopiloturina e a pirenzepina, foi realizado 17 horas após a indução da colite. Após 18 horas da indução da colite os animais foram eutanasiados, e em seguida retirada amostras do cólon para análise dos parâmetros inflamatórios e bioquímicos.

O protocolo experimental foi realizado com 4 grupos de animais, cada um contendo 6 animais, conforme figura 4.

**Figura 4. Representação esquemática do protocolo experimental de avaliação da participação do receptor M1 na resposta anti-inflamatória da epiisopiloturina na colite por ácido acético.**



Fonte: Autoria própria.

#### **4.6.1. Análise dos parâmetros inflamatórios**

Após a eutanásia dos animais submetidos aos protocolos experimentais de tratamento, os segmentos do cólon foram retirados para avaliação de todos os parâmetros inflamatórios descritos no tópico 4.4, acrescido da avaliação de expressão proteica de NFkB, COX-2 e iNOS por western blot.

#### **4.6.2. Western blot para NFkB, COX-2 e iNOS**

A expressão proteica de NFkB, COX-2 e iNOS no cólon foi avaliada a partir do preparado do homogenato de segmentos intestinais com tampão RIPA (pH 8,0) da Sigma-Aldrich, Brasil, este permite a lise celular, a solubilização de proteínas, a este tampão foi adicionado um inibidor de protease na seguinte proporção: 1µl de inibidor de protease para 100µL de RIPA. As proteínas foram dosadas pelo método do ácido bicinchonínico ou reação de biureto, conforme descrito pelo fabricante (Thermo Scientific, Estados Unidos, EUA). A dosagem de proteínas foi determinada por leitor de ELISA a 562 nm. Amostras (20 µg) foram preparadas em Tris-HCl (BioRad, EUA) e β-mcaptoetanol (BioRad, EUA), agitadas, aquecidas em banho-maria (95 °C, 5 min) e centrifugadas (10000 rpm, 4 ° C, 30 seg.). Subsequentemente foi realizada a eletroforese vertical de proteínas em gel de SDS-poliacrilamida (SDSPAGE) a 10% para (NFkB e β-actina) e a 8% para (COX-2 e β-actina) a 60 volts durante os primeiros 15 minutos para deposição da amostra no fundo do poço e 120v para o resto da corrida. As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno, BioRad, EUA) e incubadas com anti-NFkB, anti-COX-2 ou anti-β-actina (Millipore, EP1123Y, 1: 500), e depois incubadas com anticorpo secundário HRP-cabra, anti-coelho (Invitrogen, 656120, 1: 1000) ou HRP-coelho anticaprino (Invitrogen, A16142, 1: 1000) e, finalmente, reagente quimioluminescente (BioRad, EUA, substrato Western Blot ECL de Clarity). As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ChemiDoc XRS (BioRad, EUA). A densidade das bandas foi medida através do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA) (DE CARVALHO et al., 2018).

#### 4.6.9. Análise estatística

Os dados foram apresentados como a média ( $\pm$  EPM) de animais em cada grupo ( $n=6$ ). Os testes estatísticos foram realizados no software *Graphpad Prism* (versão 6.0). A significância estatística das diferenças entre os grupos foi determinada por análise unidirecional da variância (ANOVA) seguida do teste comparações múltiplas de *Student-Newman-Keuls*. Os escores histológicos foram avaliados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunns. Para todos os testes foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

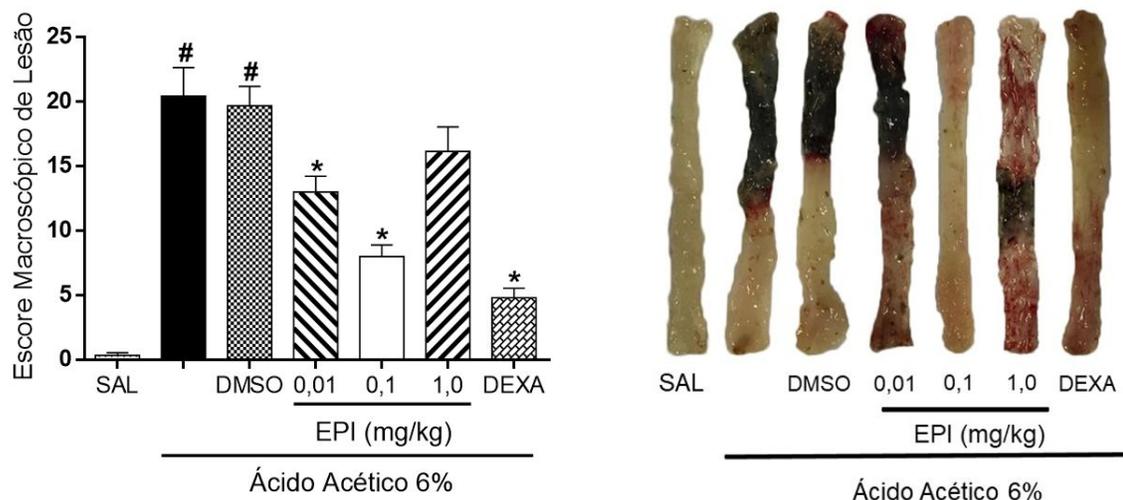
### 5.1 Epiisopiloturina reduz parâmetros inflamatórios da colite induzida por ácido acético

#### 5.1.1 Epiisopiloturina reduz escores macroscópicos de lesões

Como pode ser observado na figura 5, houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos escores macroscópicos de lesão dos cólons de animais com colite por ácido acético ( $20,43 \pm 2,202$ ) quando comparado ao grupo controle negativo, que recebeu somente salina 0,9% ( $0,333 \pm 0,210$ ). Essa diferença de escores pode ser observada na figura 6 que mostra que o cólon do animal que recebeu somente salina mostra aparência normal, sem foco inflamatório, ao contrário do cólon do animal com colite por ácido acético, que apresenta hiperemia, aparência inflamada com foco de úlcera em uma extensão longa do tecido.

Os animais com colite e tratados com epiisopiloturina (0,01; 0,1; 1,0 mg/kg) apresentaram redução dos escores macroscópicos de lesão em comparação com o grupo com colite por ácido acético e que receberam DMSO 2%, porém houve uma redução estatisticamente significativa apenas na dose de 0,1 mg/kg ( $8,000 \pm 0,894$ ). Isso pode também ser observado na figura 5, em que o cólon de animal com colite e tratado com Epiisopiloturina na dose de 0,1 mg/kg é o que mostra uma maior redução dos parâmetros inflamatórios, com pouca hiperemia, não apresenta foco de úlceras e possui aparência menos inflamada que o cólon do animal com colite não tratado.

**Figura 5. Epiisopiloturina reduz escores macroscópicos de lesões.**

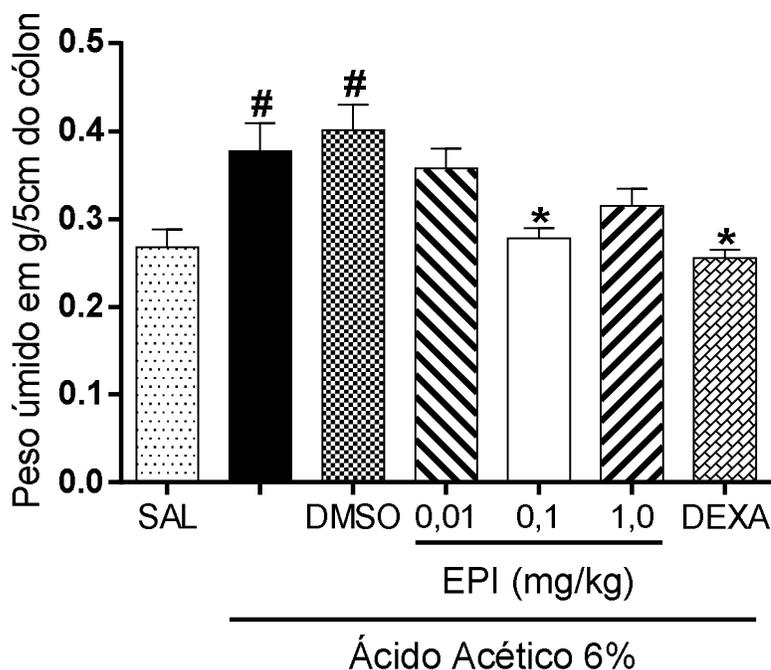


Legenda: Ácido acético (6%, intracolônico) ou salina. DMSO (2% via i.p.) e EPI (Epiisopiloturina nas doses de 0,01; 0,1; e 1,0 mg/kg, i.p.), administrada 17 horas após a indução da colite. Amostras (5 cm) do cólon, a partir das quais foram avaliados os escores macroscópicos de lesão. Os resultados estatísticos são expressos como média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  vs grupo Ácido Acético; #  $P < 0,05$  vs grupo SAL (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

### 5.1.2 Epiisopiloturina reduz o peso úmido do cólon de camundongos

Após as pesagens dos segmentos de 5 cm do cólon dos animais, observou-se um aumento estatístico significativo no peso úmido dos cólons dos animais com colite por ácido acético 6% ( $0,376 \pm 0,032$  g/5/cm), em relação ao grupo que recebeu somente salina. O tratamento com Epiisopiloturina na dose 0,1 mg/kg ( $0,277 \pm 0,011$  g/5/cm g/5/cm) apresentaram diminuição significativa no peso úmido colônico em relação ao grupo com colite não tratado.

**Figura 6. Epiisopiloturina reduz o peso úmido do cólon de camundongos.**



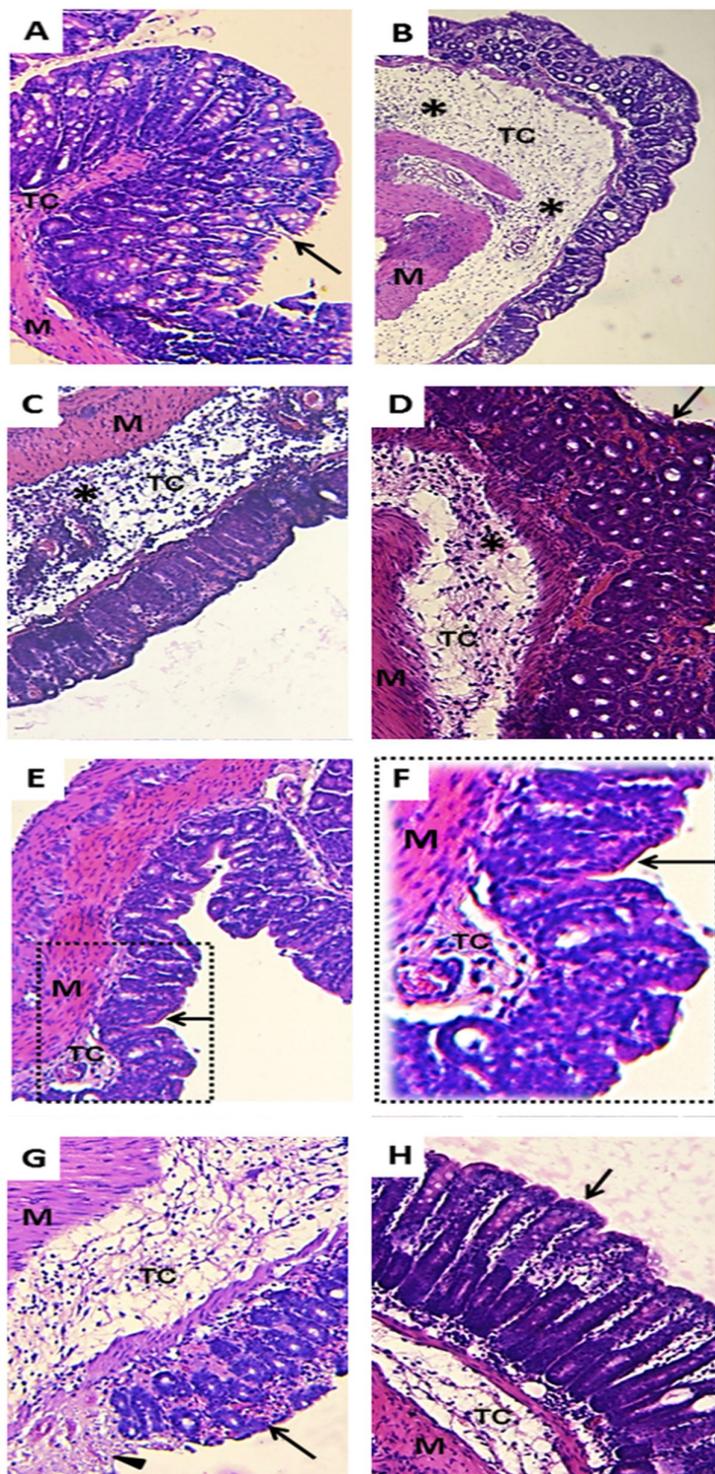
Legenda: Ácido acético (6%, intracolônico) ou salina. DMSO (2% via i.p.) e EPI (Epiisopiloturina nas doses de 0,01; 0,1; e 1,0 mg/kg, v.o), administrada 17 horas após indução da colite. Amostras (5 cm) do cólon, pesados em balança analítica. Os resultados estatísticos são expressos como média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo. \*P <0,05 vs grupo Ácido Acético 6%; #P <0,05 vs grupo SAL (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

### 5.1.3 Epiisopiloturina reduz escores histológicos de dano intestinal

Na tabela 3 pode ser observado a quantificação dos escores microscópicos relativo aos cortes histológicos apresentados na figura 7. Os animais que receberam ácido acético a 6% para indução da colite apresentaram uma alta pontuação de escores totais microscópicos (=11), pois apresentaram perda da arquitetura da mucosa (3 (2-3)), elevada infiltração celular (3 (2-3)), espessamento da camada muscular (3 (2-3)), formação de abscesso em cripta (1 (0-1)) e ausência de células caliciformes (1 (1-1)), e resultados semelhantes foram observados no grupo que recebeu DMSO 2% (tabela 3). Já os animais do grupo salina, apresentaram preservação da estrutura colônica e atingiram pontuação mínima nos escores microscópicos totais (escores totais = 0) e específicos, como perda da arquitetura da mucosa (0 (0-1)), infiltração celular (0 (0-1)), espessamento da camada muscular (0 (0-1)), formação de abscesso em cripta (0 (0-0)) e ausência de células caliciformes (0

(0-0)) conforme observado na tabela 3. Já No entanto, os grupos tratados com Epiisopiloturina na 3 doses testadas apresentou diminuição dos escores microscópicos, porém a dose de 0,1 mg/kg foi que mais preveniu significativamente a destruição da arquitetura do epitélio do cólon provocada pelo ácido acético (escores totais = 4) e manteve o tecido do cólon com aspecto histológico preservado, atingindo uma baixa pontuação de escores microscópicos, semelhantemente ao grupo tratado com dexametasona (2 mg/kg, s.c), que apresentou redução dos escores microscópicos avaliados em relação ao grupo ácido acético.

Figura 7. Episopiloturina reduz danos microscópicos do cólon de camundongos.



Legenda: Cortes histológicos dos cólons de camundongos corados com hematoxilina e eosina (HE). Cólon de um animal que recebeu apenas solução salina a 0,9% por via retal (A); cólon de um animal que recebeu ácido acético a 6% intracólon (B); cólon de um animal que recebeu ácido acético e DMSO 2% (C); cólon de um animal que recebeu ácido acético a 6% intracólon e foi tratado com Epiisopiloturina nas doses de 0,01mg/kg (D); 0,1mg/kg (E e F); 1,0 mg/kg (G); cólon de um animal que recebeu ácido acético a 6% e foi tratado com Dexametasona 2mg/kg (H)

**Tabela 3: Epiisopiloturina reduz escores microscópicos.**

<b>Escores Microscópicos</b>						
<b>Grupos Experimentais</b>	Perda da arquitetura da mucosa	Infiltração celular	Espessamento da camada muscular	Formação de abscesso em cripta	Ausência de células caliciformes	<b>Escores totais</b>
Salina	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0
AA	3 (2-3) #	3 (2-3) #	3 (2-3) #	1 (0-1) #	1 (1-1) #	11 #
AA + DMSO	3 (2-3) #	3 (2-3) #	3 (1-3) #	1 (1-1) #	1 (1-1) #	11 #
AA + EPI 0,01	2 (1-2)	3 (1-3)	2 (0-2)	0 (0-1)	1 (0-1)	8
AA + EPI 0,1	1 (0-1)*	1 (0-2)*	1 (0-1)*	0 (0-1)	1 (0-1)	4*
AA + EPI 1,0	2 (0-1)	2 (0-2)	1 (0-1)*	1 (0-1)*	1 (0-1)*	7
Dexa	1 (0-1)*	1 (0-1)*	1 (0-1)*	0 (0-1)*	0 (0-1)*	3*

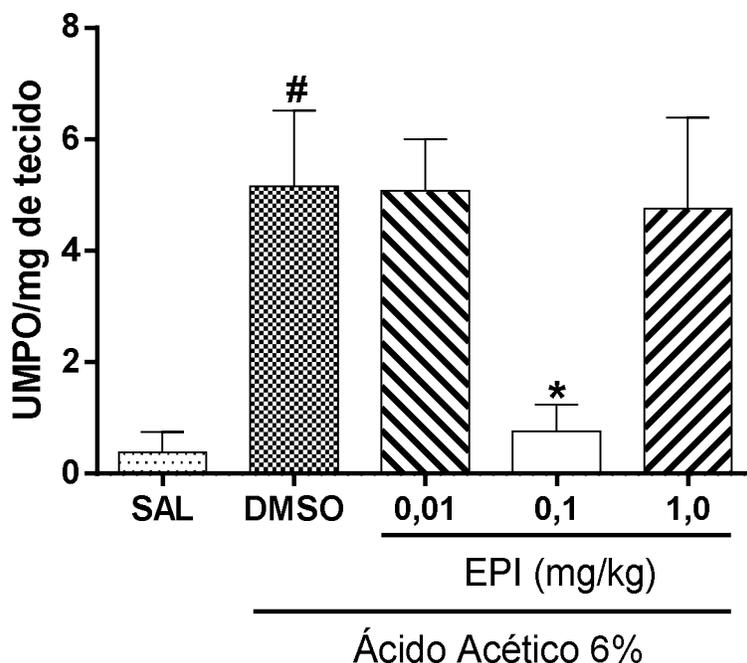
Legenda: AA, ácido acético. Escore para avaliação histopatológica expresso em mediana (valores mínimo – máximo). #P <0.05 em relação ao grupo salina; \*P < 0.05 em relação grupo AA (Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn para comparações múltiplas de análises histopatológicas).

#### **5.1.4. Epiisopiloturina reduz atividade da mieloperoxidase (MPO) do cólon de camundongos**

Como pode ser observado na figura 8, o grupo ao qual foi induzida a colite com ácido acético a 6% e recebeu DMSO a 2% apresentou uma intensa atividade da MPO no tecido do cólon ( $5,158 \pm 0,606$  UMPO/mg de tecido) em ao grupo salina ( $0,379 \pm 0,140$  UMPO/mg de tecido). O grupo tratado com Epiisopiloturina (0,1 mg/kg, i.p.)

apresentou níveis de MPO reduzidos ( $0,758 \pm 0,215$  UMPO/mg de tecido) em relação ao grupo DMSO com ( $p < 0,05$ ).

**Figura 8. Epiisopiloturina reduz atividade da mieloperoxidase (MPO) do cólon de camundongos.**



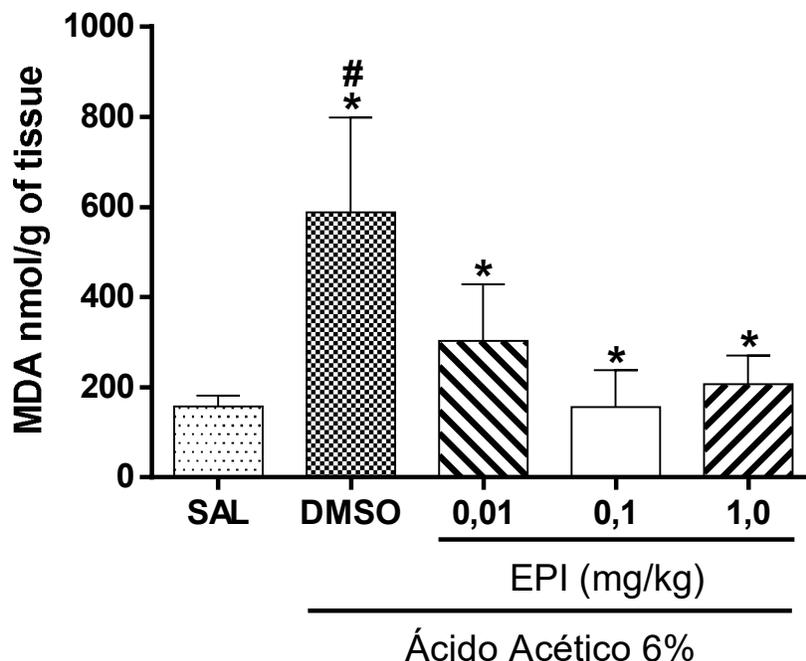
Legenda: A partir das amostras de tecido do intestino, a atividade da enzima MPO foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo. \*P < 0,05 vs grupo DMSO; #P < 0,05 vs grupo Salina (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

#### **5.1.5. Epiisopiloturina reduz a concentração de ácido malondialdeído (MDA) do cólon de camundongos**

Como pode ser observado na figura 9, o grupo ao qual foi induzida a colite com ácido acético a 6% e recebeu DMSO a 2% apresentou níveis elevados de MDA no tecido do cólon ( $588,4 \pm 93,89$  nmol/g de tecido) em relação ao grupo Salina ( $157,1 \pm 12,50$  nmol/g de tecido). Os grupos tratados com Epiisopiloturina apresentaram níveis de MDA reduzidos nas doses de 0,01 ( $302,4 \pm 56,17$  nmol/g de tecido), 0,1mg/kg ( $155,6 \pm 33,77$  nmol/g de tecido) e 1,0 mg/kg ( $207,4 \pm 27,86$  nmol/g de tecido) em

relação ao grupo DMSO com ( $p < 0,05$ ), porém dose de 0,1 mg/kg foi a que apresentou numericamente a menor redução dos níveis de MDA entre as 3 doses.

**Figura 9. Epiisopiloturina reduz a concentração de MDA do cólon de camundongos.**

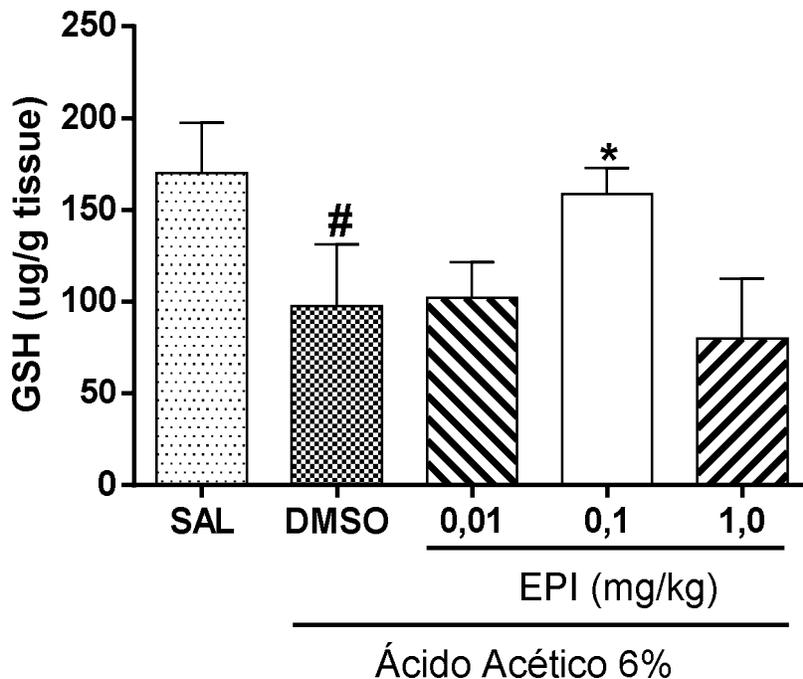


Legenda: A partir das amostras de tecido do cólon, a concentração de MDA foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  vs grupo DMSO; #  $P < 0,05$  vs grupo salina. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

#### **5.1.6. Epiisopiloturina previne a depleção dos níveis de glutathiona (GSH) do cólon de camundongos**

De acordo com a figura 10, o grupo que foi induzido a colite com ácido acético a 6% e recebeu DMSO a 2% apresentou diminuição dos níveis de GSH ( $97,61 \pm 12,75$   $\mu\text{g/g}$  de tecido) quando comparado ao grupo salina ( $170,0 \pm 13,81$   $\mu\text{g/g}$  de tecido). O grupo tratado com Epiisopiloturina na dose de 0,1 mg/kg, i.p. apresentou aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) dos níveis de GSH ( $158,7 \pm 7,045$   $\mu\text{g/g}$  de tecido), quando comparado ao grupo DMSO, prevenindo o consumo de GSH pelos radicais livres provenientes da lesão provocada pelo ácido acético.

**Figura 10. Epiisopiloturina previne a depleção dos níveis de GSH do cólon de camundongos.**

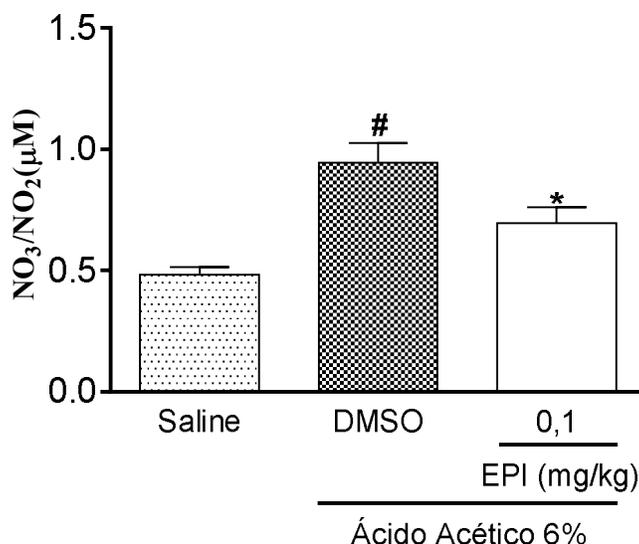


Legenda: A partir das amostras de tecido do cólon, a concentração de GSH foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  vs grupo DMSO; #  $P < 0,05$  vs grupo salina. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

#### 5.1.7. Epiisopiloturina reduz $\text{NO}_3/\text{NO}_2$ do cólon de camundongos

Conforme e pode ser observado na figura 11, os animais com colite por ácido acético e que receberam DMSO, apresentaram elevadas concentrações de  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  ( $0,945 \pm 0,081 \mu\text{M}$ ) quando comparados ao grupo controle positivo, que recebeu apenas salina ( $0,4821 \pm 0,030 \mu\text{M}$ ). Já os animais tratados com a Epiisopiloturina na dose de 0,1 (mg/kg, i.p.) demonstraram significativa redução da concentração de  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  ( $0,694 \pm 0,065 \mu\text{M}$ ) com  $p < 0,05$ .

**Figura 11. Epiisopiloturina reduz  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  do cólon de camundongos.**



Legenda: A partir das amostras de tecido do cólon, a concentração de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  vs grupo DMSO; #  $P < 0,05$  vs grupo salina. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

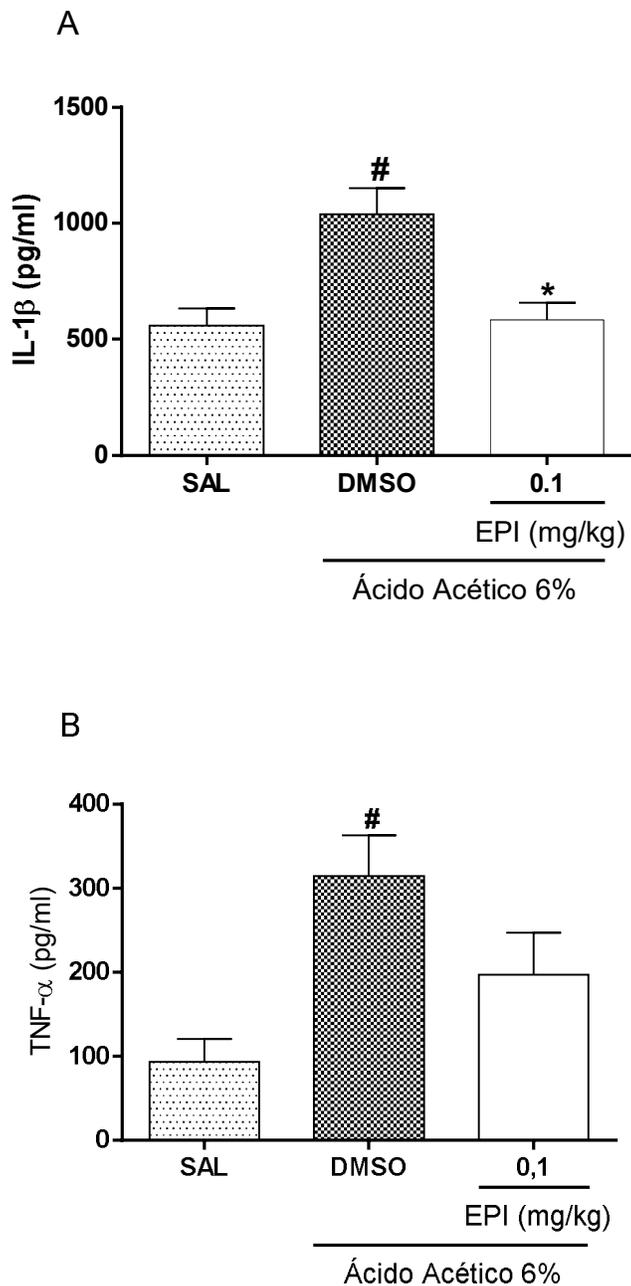
### 5.1.8. Epiisopiloturina reduz os níveis IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ do cólon de camundongos

Conforme observado na figura 12A, o cólon dos animais com colite induzida por ácido acético 6% e que recebeu DMSO 2% apresentou um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) da concentração dos níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  ( $1038 \pm 114,4$  pg/ml) quando comparado ao grupo controle negativo que recebeu apenas solução salina ( $560,5 \pm 72,61$  pg/ml). Por outro lado, o cólon dos animais tratados com a epiisopiloturina na dose de 0,1 mg/kg diminuiu de forma estatisticamente significativa ( $583,9 \pm 73,62$  pg/ml) os níveis dessa citocina pró-inflamatória na colite induzida por ácido acético.

Conforme observado na figura 12B, o cólon dos animais com colite induzida por ácido acético que recebeu DMSO a 2% apresentou um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) da concentração dos níveis de TNF- $\alpha$  ( $314,3 \pm 48,72$  pg/ml) quando comparado ao grupo salina quando comparado ao grupo controle negativo que recebeu apenas solução salina ( $93,60 \pm 26,67$  pg/ml). Por outro lado, o cólon dos

animais tratados com a epiisopiloturina na dose de 0,1 mg/kg diminuiu de forma estatisticamente significativa ( $196,7 \pm 50,59$  pg/ml) os níveis dessa citocina pró-inflamatória na colite induzida por ácido acético.

**Figura 12. Epiisopiloturina reduz os níveis de interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) do cólon de camundongos.**

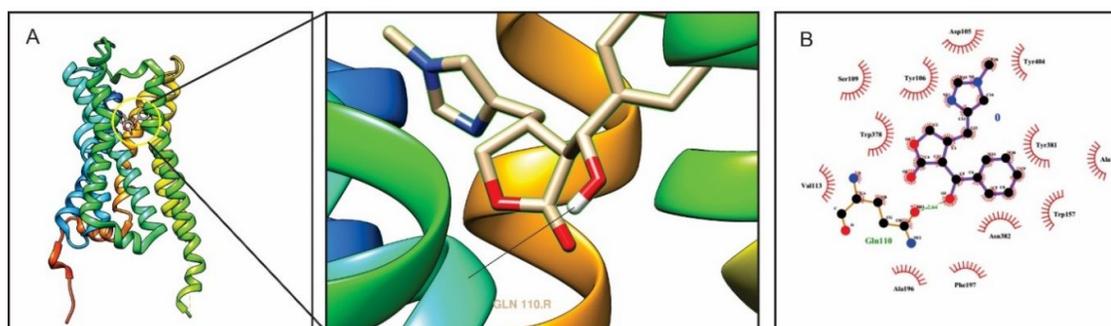


Legenda: IL-1 $\beta$  (A); TNF- $\alpha$  (B). A concentração das citocinas IL-1 $\beta$  TNF- $\alpha$  e foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo. \*P <0,05 vs grupo DMSO; #P <0,05 vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls)

## 5.2. Interação da Epiisopiloturina com o receptor muscarínico M1 por docagem molecular.

A interação da molécula de Epiisopiloturina com o receptor muscarínico M1 apresentou energia de ligação da interação ligante-macromolécula com valor de -8.44  $\Delta$ G (Kcal/mol) e constante de inibição (ki) igual a 652 nM obtida no Autodock. A molécula foi capaz de formar ligações de H com o resíduo GLN110, e interações hidrofóbicas com os seguintes resíduos: ALA96, PHE197, ASN382, TRP157, ALA193, TYR381, VAL113, TRP378, SER109, TYR106, TYR404, ASP105.

**Figura 13. Interação da Epiisopiloturina com o receptor muscarínico M1.**



Legenda: **A.** Interações moleculares de EPI em 6OIL. Nota-se a estrutura global do complexo onde proteínas estão representadas na forma de superfície e ligante na forma de vareta. Observa-se ainda a ampliação da região de interação do ligante na proteína, onde as proteínas estão representadas na forma de fitas e ligante na forma de vareta. **B.** Diagramas Ligplot 2D que mostram as interações receptor-ligante por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

## 5.3. Epiisopiloturina reduz parâmetros pró-inflamatórios da colite através da participação do receptor muscarínico M1

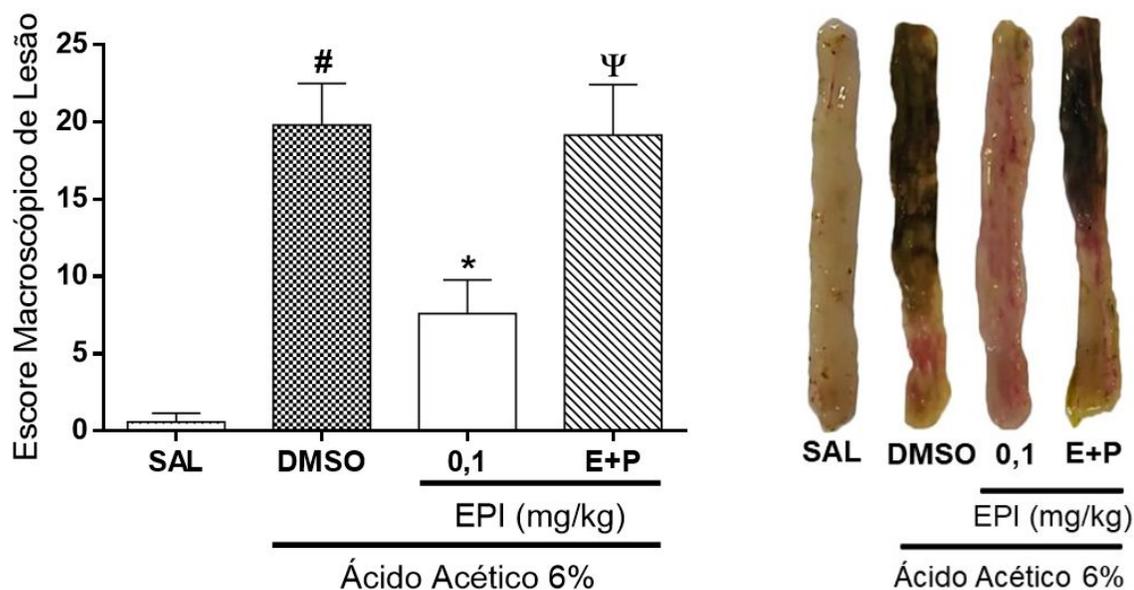
### 5.3.1 Epiisopiloturina reduz os escores macroscópicos de lesões através do receptor muscarínico M1

Como pode ser observado na figura 14, houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos escores macroscópicos de lesão dos cólons de animais com colite por ácido acético e que receberam DMSO a 2% (i.p) ( $19,80 \pm 1,200$ ) quando comparado ao grupo controle negativo, que recebeu somente salina 0,9% ( $0,600 \pm 0,244$ ). Essa

diferença de escores pode ser observada na figura 14 que mostra que o cólon do animal que recebeu somente salina mostra aparência normal, sem foco inflamatório, ao contrário do cólon do animal com colite por ácido acético, que apresenta hiperemia, aparência inflamada com foco de úlcera em uma extensão longa do tecido.

Os animais com colite e tratados com epiisopiloturina na dose 0,1mg/kg (i.p.) apresentaram redução dos escores macroscópicos de lesão ( $7,600 \pm 0,979$ ). em comparação com o grupo com colite por ácido acético e que receberam DMSO 2%. Isso pode também ser observado na figura 14, em que o cólon de animal com colite e tratado com Epiisopiloturina na dose de 0,1 mg/kg apresenta uma maior redução dos parâmetros inflamatórios, com pouca hiperemia, não apresenta foco de úlceras e possui aparência inflamada em relação ao cólon do animal com colite não tratado. Por outro lado, o grupo de animais que receberam o tratamento simultâneo com Epiisopiloturina (0,1mg/kg, i.p.) e Pirenzepina (10mg/kg, i.p.), um antagonista seletivo do receptor muscarínico M1, apresentou aumento dos escores macroscópicos de lesão ( $19,17 \pm 1,327$ ) em relação ao grupo tratado apenas com a Epiisopiloturina 0,1 mg/kg. Isso pode ser observado também na figura B, onde o cólon do grupo tratado simultâneo com Epiisopiloturina (0,1mg/kg, i.p.) e Pirenzepina (10mg/kg, i.p.), apresenta aparência inflamada, hiperemia e focos de ulceração por uma grande extensão do tecido.

**Figura 14. Epiisopiloturina reduz escores macroscópicos de lesão através do receptor muscarínico M1.**

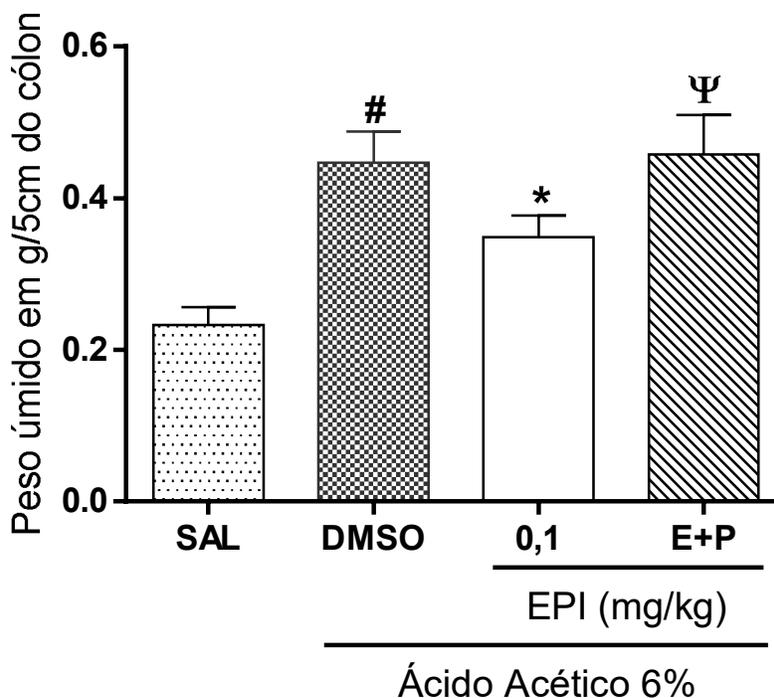


Legenda: Ácido acético (6%, intracolônico) + DMSO (2% via i.p.) ou salina. EPI (Epiisopiloturina 0,1 mg/kg, i.p.), e E + P (Epiisopiloturina 0,1 mg/kg, i.p. + Pirenzepina 10mg/kg i.p.), administrada 17 horas após indução da colite. Amostras (5 cm) do cólon, a partir das quais foram avaliados os escores macroscópicos de lesão. Os resultados estatísticos são expressos como média ± erro de 6 animais por grupo. #P <0,05 vs grupo SAL; \* P <0,05 vs grupo DMSO; Ψ P <0,05 vs grupo 0,1 e SAL (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

### 5.3.2. Epiisopiloturina reduz o peso úmido do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1

Após as pesagens dos segmentos de 5 cm do cólon dos animais, observou-se que o grupo com colite por ácido acético 6% e que recebeu DMSO (2% i. p.) apresentou aumento estatisticamente significativo no peso úmido dos cólons dos animais ( $0,446 \pm 0,018$  g/5/cm), em relação ao grupo que recebeu somente salina intracólon ( $0,232 \pm 0,009$  g/5/cm). O grupo tratado com Epiisopiloturina na dose 0,1 mg/kg apresentou diminuição significativa no peso úmido colônico ( $0,348 \pm 0,011$  g/5/cm) em relação ao grupo com colite não tratado. Por outro lado, o grupo de animais que recebeu tratamento simultâneo com Epiisopiloturina (0,1mg/kg, i.p.) e Pirenzepina (10mg/kg, i.p.), apresentou aumento do peso úmido colônico ( $0,457 \pm 0,018$ ) em relação ao grupo tratado apenas com a Epiisopiloturina 0,1 mg/kg.

**Figura 15. Epiisopiloturina reduz o peso úmido do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1.**



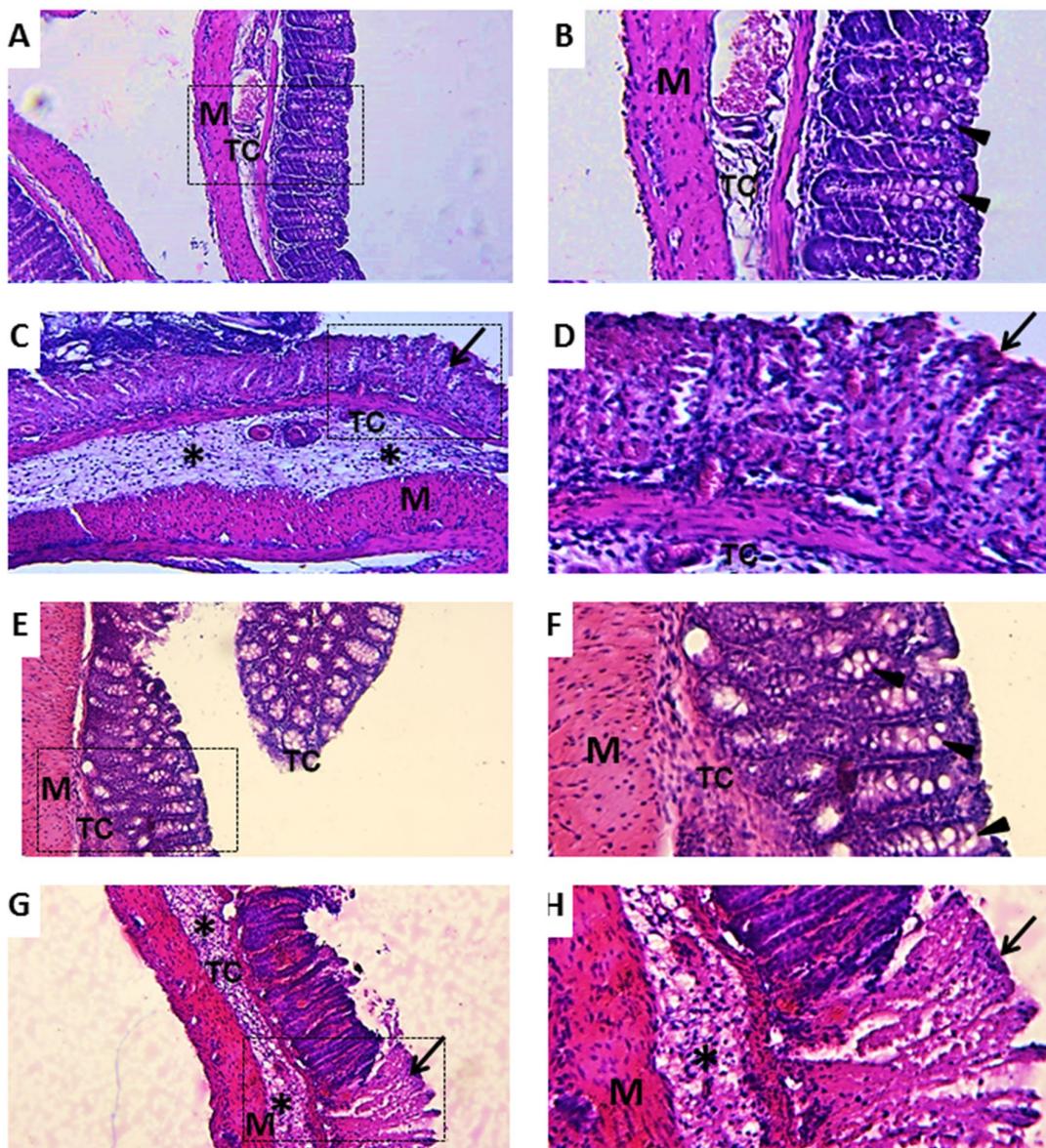
Legenda: Ácido acético (6%, intracolônico) + DMSO (2% via i.p.) ou salina. EPI (Epiisopiloturina 0,1 mg/kg, v.o) e E + P (Epiisopiloturina 0,1 mg/kg, i.p + Pirenzepina 10mg/kg i.p.), administrada 17 horas após indução da colite. Amostras (5 cm) do cólon, pesados em balança analítica. Os resultados estatísticos são expressos como média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo. #P <0,05 vs grupo SAL; \* P <0,05 vs grupo DMSO;  $\Psi$  P <0,05 vs grupo 0,1 e SAL (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

### **5.3.3. Epiisopiloturina reduz o dano histológico do cólon através do receptor muscarínico M1**

Os cólons dos animais dos diferentes grupos experimentais foram avaliados histologicamente em relação ao dano tecidual microscópico. A tabela 4 contém a quantificação dos escores microscópicos relativo aos cortes histológicos apresentados na figura 16. Os animais do grupo salina, apresentaram preservação da estrutura colônica e atingiram pontuação mínima nos escores microscópicos totais (escores totais = 0) pois mantiveram a arquitetura da mucosa (0 (0-1)), não houve infiltração celular (0 (0-1)), nem espessamento da camada muscular (0 (0-1)), não houve formação de abscesso em cripta (0 (0-0)) e nem presença de células calciformes (0 (0-0)) conforme observado na tabela 4 e na figura 16. Já os animais com colite por

ácido acético a 6% e que receberam DMSO 2% apresentaram uma alta pontuação de escores totais microscópicos (=11), pois apresentaram perda da arquitetura da mucosa (3 (2-3)), elevada infiltração celular (3 (2-3)), espessamento da camada muscular (3 (2-3)), formação de abscesso em cripta (1 (0-1)) e ausência de células caliciformes (1 (1-1)), como pode ser observado na figura 16 e tabela 4. Entretanto, o grupo tratado com Epiisopiloturina na dose de 0,1 mg/kg preveniu a destruição da arquitetura do epitélio do cólon provocada pelo ácido acético (escores totais = 4) e manteve o tecido do cólon com aspecto histológico preservado, atingindo uma baixa pontuação de escores microscópicos. Já o grupo tratado com Epiisopiloturina 0,1 mg/kg e Pirenzepina 10 mg/kg, apresentaram aumento estatisticamente significativo da pontuação de escores microscópicos (=10), em relação ao grupo EPI 0,1 mg/kg, pois apresentou características semelhantes ao grupo DMSO, como perda da arquitetura da mucosa (3 (2-3)), elevado infiltrado celular (3 (2-3)), e espessamento da camada muscular (2 (1-2)), formação de abscesso em criptas (1 (0-1)) e depleção de células caliciformes (1 (0-1)).

**Figura 16. Epiisopiloturina reduz dano microscópico no cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1.**



Legenda: Cortes histológicas dos cólons de camundongos corados com hematoxilina e eosina (HE). Cólon de um animal que recebeu apenas solução salina a 0,9% por via retal (A, B); cólon de um animal que recebeu ácido acético e DMSO 2% (C, D); cólon de um animal que recebeu ácido acético a 6% intracólon e foi tratado com Epiisopiloturina na dose de 0,1mg/kg (E e F); cólon de um animal que recebeu ácido acético a 6% e foi tratado com Epiisopiloturina (0,1mg/kg, i.p.) e Pirenzepina (10 mg/kg i.p.) (G, H).

**Tabela 4: Epiisopiloturina reduz escores microscópicos de lesão através do receptor muscarínico M1.**

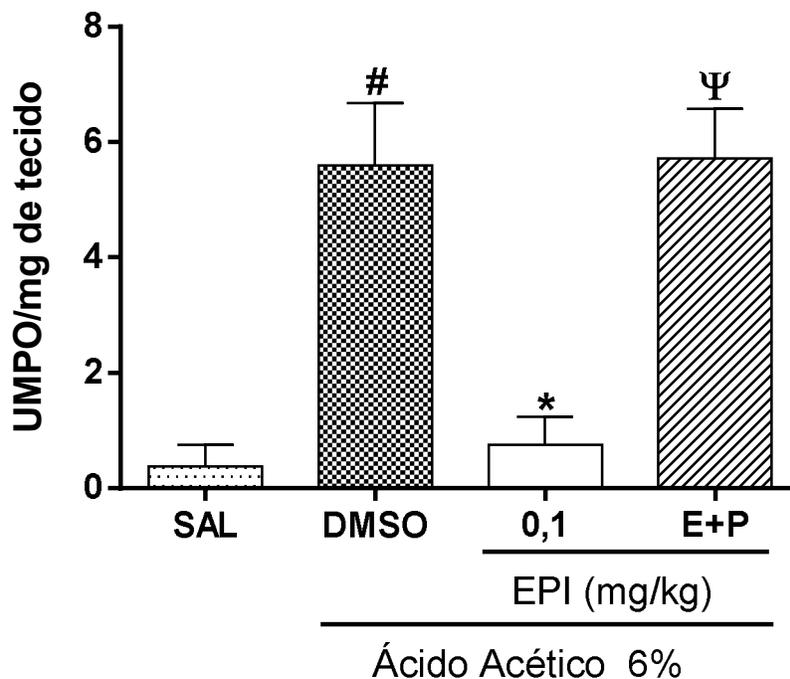
Grupos	Escore Microscópicos					Escore totais
	Perda da arquitetura da mucosa	Infiltração celular	Espessamento da camada muscular	Formação de abcesso em cripta	Ausência de células caliciformes	
Experimentais						
Salina	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0
AA + DMSO	3 (2-3) #	3 (2-3) #	3 (1-3) #	1 (1-1) #	1 (1-1) #	11 #
AA + EPI 0,1	1 (0-1)*	1 (1-2)*	1 (0-1)*	0 (0-1)	1 (0-1)	4 *
AA + EPI 0,1 + PIR	3 (2-3) #	3 (2-3) #	2 (1-2) #	1 (0-1) #	1 (0-1) #	10 #

Legenda: AA, ácido acético. Escore para avaliação histopatológica expresso em mediana (valores mínimo – máximo). #P <0.05 em relação ao grupo salina; \*P < 0.05 em relação grupo AA (Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn para comparações múltiplas de análises histopatológicas).

#### **5.3.4. Epiisopiloturina reduz atividade da MPO do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1**

Como pode ser observado na figura 17, o grupo ao qual foi induzida a colite com ácido acético a 6% e recebeu DMSO a 2% apresentou uma intensa atividade da MPO no tecido do cólon ( $5,594 \pm 0,544$  UMPO/mg de tecido) em relação ao grupo salina ( $0,379 \pm 0,140$  UMPO/mg de tecido). O grupo tratado com Epiisopiloturina (0,1 mg/kg, i.p.) apresentou níveis de MPO reduzidos ( $0,758 \pm 0,215$  UMPO/mg de tecido) em relação ao grupo DMSO com ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, o grupo de animais que recebeu tratamento simultâneo com Epiisopiloturina (0,1mg/kg, i.p.) e Pirenzepina (10 mg/kg, i.p.), apresentou aumento dos níveis de MPO ( $5,721 \pm 0,433$  UMPO/mg de tecido) em relação ao grupo tratado apenas com a Epiisopiloturina 0,1 mg/kg.

**Figura 17. Epiisopiloturina reduz atividade da mieloperoxidase (MPO) do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1.**

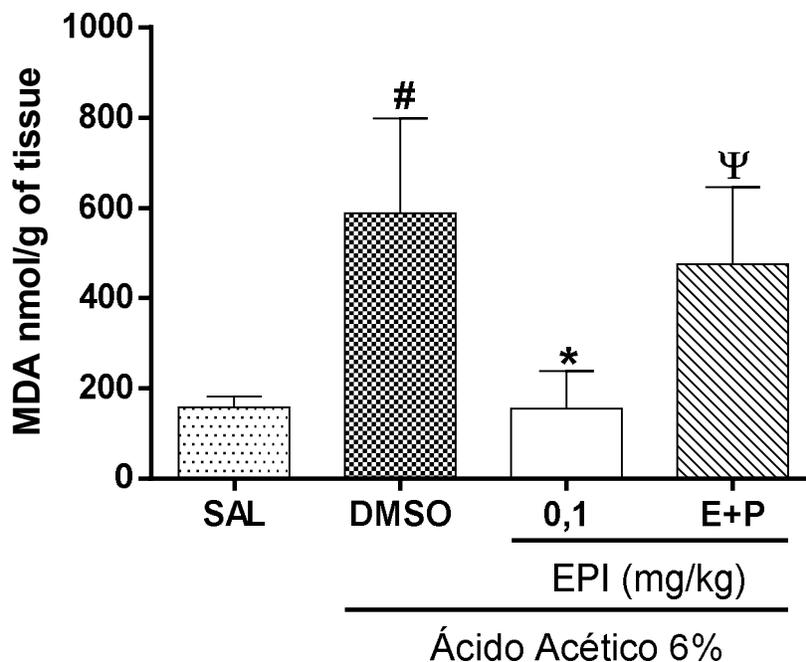


Legenda: A partir das amostras de tecido do cólon, a atividade da enzima MPO foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo. #P <0,05 vs grupo Salina \*P <0,05 vs grupo DMSO;  $\Psi$ P <0,05 vs grupo 0,1 e SAL (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls)

### **5.3.5. Epiisopiloturina reduz a concentração de MDA do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1**

Como pode ser observado na figura 18, o grupo ao qual foi induzida a colite com ácido acético a 6% e recebeu DMSO a 2% apresentou níveis elevados de MDA no tecido do cólon ( $588,4 \pm 93,89$  nmol/g de tecido) em relação ao grupo Salina ( $157,1 \pm 12,50$  nmol/g de tecido). O grupo tratado com Epiisopiloturina 0,1mg/kg apresentou níveis de MDA reduzidos ( $155,6 \pm 33,77$  nmol/g de tecido) em relação ao grupo DMSO com ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, o grupo de animais que recebeu tratamento simultâneo com Epiisopiloturina (0,1mg/kg, i.p.) e Pirenzepina (10 mg/kg, i.p.), apresentou aumento dos níveis de MDA ( $476,2 \pm 64,53$  nmol/g de tecido) em relação ao grupo tratado apenas com a Epiisopiloturina 0,1 mg/kg.

**Figura 18. Epiisopiloturina reduz a concentração de MDA do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1.**



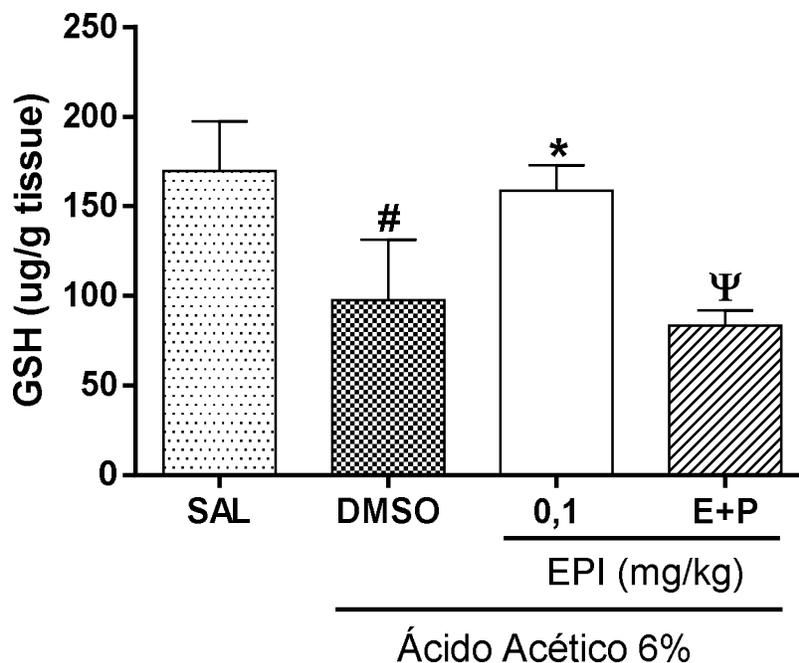
Legenda: A partir das amostras de tecido do cólon, a concentração de MDA foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo. #P <0,05 vs grupo salina +P <0,05 vs grupo DMSO;  $\Psi$ P <0,05 vs grupo 0,1 e SAL. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

### **5.3.6. Epiisopiloturina previne a depleção dos níveis de GSH do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1**

Como pode ser observado na figura 19 o grupo com colite por ácido acético a 6% e que recebeu DMSO a 2% (i.p.) apresentou significativo consumo dos níveis de GSH ( $97,61 \pm 12,75$   $\mu$ g/g de tecido) quando comparado ao grupo salina ( $170,0 \pm 13,81$   $\mu$ g/g de tecido). O grupo tratado com Epiisopiloturina (0,1 mg/kg, i.p.) apresentou uma redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) do consumo de GSH ( $158,7 \pm 7,045$   $\mu$ g/g de tecido), quando comparado ao grupo DMSO, prevenindo assim o consumo de GSH pelos radicais livres provenientes da lesão provocada pelo ácido acético. Já o grupo de animais que recebeu tratamento simultâneo com Epiisopiloturina (0,1 mg/kg, i.p.) e Pirenzepina (10 mg/kg, i.p.), apresentou aumento do consumo de GSH

( $83,50 \pm 4,331$  nmol/g de tecido) em relação ao grupo tratado apenas com a Epiisopiloturina 0,1 mg/kg.

**Figura 19. Epiisopiloturina previne a depleção dos níveis de GSH do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1.**



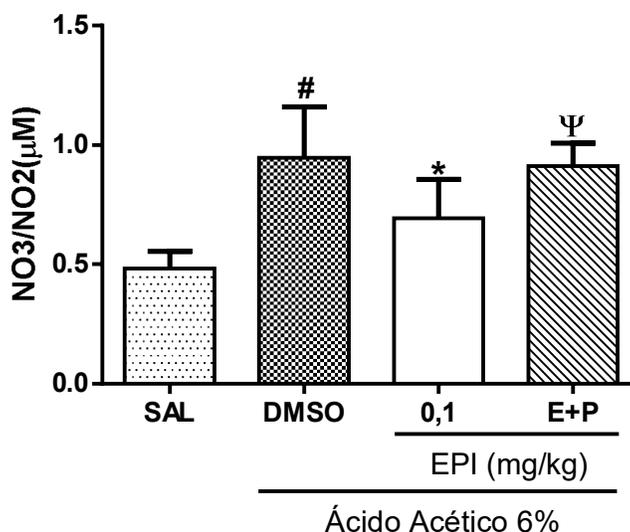
Legenda: A partir das amostras de tecido do cólon, a concentração de GSH foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo. #P <0,05 vs grupo salina; \*P <0,05 vs grupo DMSO;  $\Psi$ P <0,05 vs grupo 0,1 e SAL. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls)

### 5.3.7. Epiisopiloturina reduz $\text{NO}_3/\text{NO}_2$ do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1

Conforme e pode ser observado na figura 20, os animais com colite por ácido acético e que receberam DMSO (2%, i.p.), apresentaram elevadas concentrações de  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  ( $0,945 \pm 0,081$   $\mu\text{M}$ ) quando comparados ao grupo controle positivo, que recebeu apenas salina intracólon ( $0,4821 \pm 0,030$   $\mu\text{M}$ ). Já os animais tratados com a Epiisopiloturina (0,1 mg/kg, i.p.) demonstraram significativa redução da concentração de  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  ( $0,694 \pm 0,065$   $\mu\text{M}$ ) com  $p < 0,05$ . O grupo de animais que recebeu tratamento simultâneo com Epiisopiloturina (0,1 mg/kg, i.p.) e Pirenzepina (10 mg/kg,

i.p.), apresentou aumento da concentração de  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  ( $0,912 \pm 0,036 \mu\text{M}$ ) em relação ao grupo tratado apenas com a Epiisopiloturina 0,1 mg/kg.

**Figura 20. Epiisopiloturina reduz  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1.**



Legenda: A partir das amostras de tecido do cólon, a concentração de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo. #P <0,05 vs grupo salina; \*P <0,05 vs grupo DMSO; ψP <0,05 vs grupo 0,1 e SAL. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

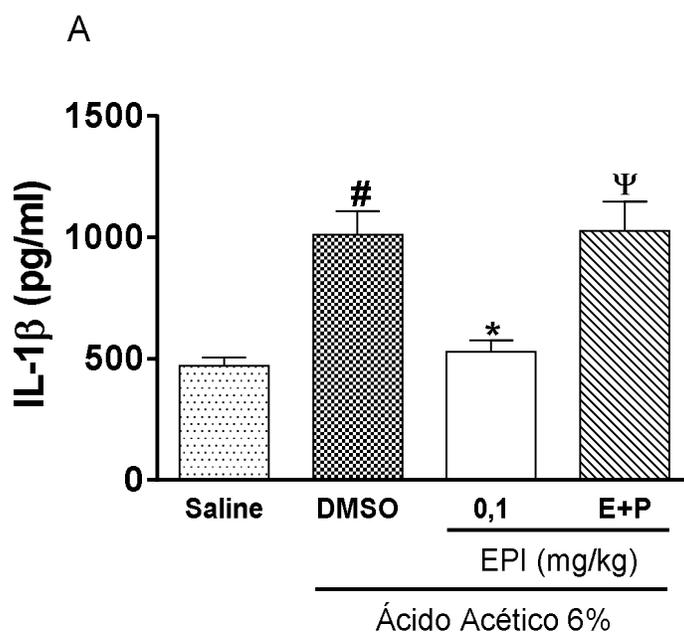
### 5.3.8. Epiisopiloturina reduz os níveis IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1.

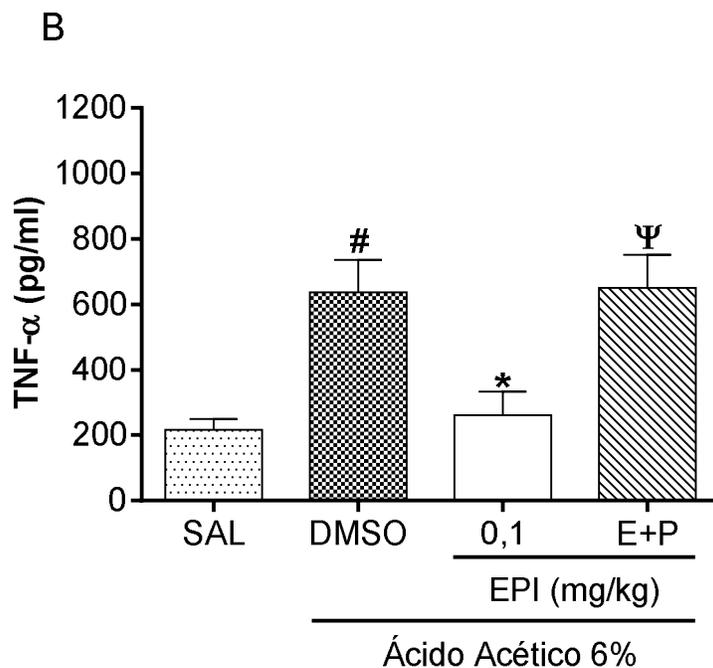
Conforme observado na figura 21A, o cólon dos animais com colite induzida por ácido acético 6% e que recebeu DMSO 2% apresentou um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) da concentração dos níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  ( $1011 \pm 98,41 \text{ pg/ml}$ ) quando comparado ao grupo controle negativo que recebeu apenas solução salina ( $471,1 \pm 33,72 \text{ pg/ml}$ ). Por outro lado, o cólon dos animais tratados com a epiisopiloturina na dose de 0,1 mg/kg diminuiu de forma estatisticamente significativa ( $527,2 \pm 48,43 \text{ pg/ml}$ ) os níveis dessa citocina pró-inflamatória na colite induzida por ácido acético. Já o grupo de animais que recebeu tratamento simultâneo com Epiisopiloturina (0,1 mg/kg, i.p.) e Pirenzepina (10 mg/kg,

i.p.), apresentou aumento da concentração dos níveis de IL-1 $\beta$  ( $1028 \pm 120,3$  pg/ml) em relação ao grupo tratado apenas com a Epiisopiloturina 0,1 mg/kg.

Como pode ser observado na figura 21B, o cólon dos animais com colite induzida por ácido acético que recebeu DMSO a 2% apresentou um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) da concentração dos níveis de TNF- $\alpha$  ( $636,7 \pm 98,79$  pg/ml) quando comparado ao grupo salina quando comparado ao grupo controle negativo que recebeu apenas solução salina ( $217,1 \pm 33,51$  pg/ml). Por outro lado, o cólon dos animais tratados com epiisopiloturina na dose de 0,1 mg/kg diminuiu de forma estatisticamente significativa ( $261,7 \pm 72,13$  pg/ml) os níveis dessa citocina pró-inflamatória na colite induzida por ácido acético. Já o grupo de animais que recebeu tratamento simultâneo com Epiisopiloturina (0,1 mg/kg, i.p.) e Pirenzepina (10 mg/kg, i.p.), apresentou aumento da concentração dos níveis de TNF- $\alpha$  ( $650,0 \pm 100,7$  pg/ml) em relação ao grupo tratado apenas com a Epiisopiloturina 0,1 mg/kg.

**Figura 21. Epiisopiloturina reduz os níveis de interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1.**





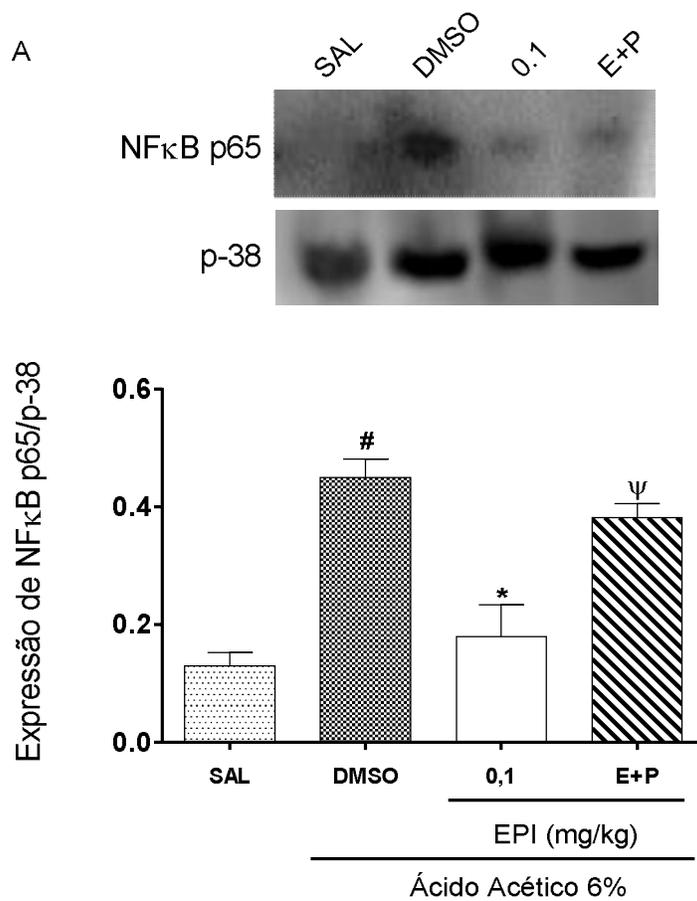
Legenda: IL-1 $\beta$  (A); TNF- $\alpha$  (B). A concentração das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo. #P <0,05 vs grupo salina; \*P <0,05 vs grupo DMSO;  $\Psi$ P <0,05 vs grupo 0,1 e SAL (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

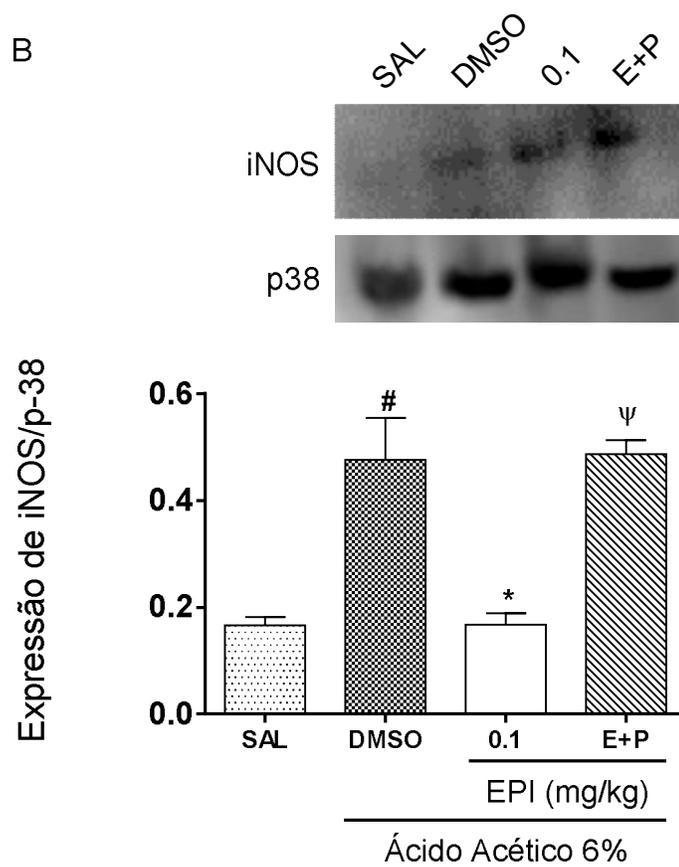
### 5.3.9. Epiisopiloturina reduz a expressão de NF $\kappa$ B e iNOS e COX-2 em tecido do cólon de camundongos através do receptor muscarínico M1

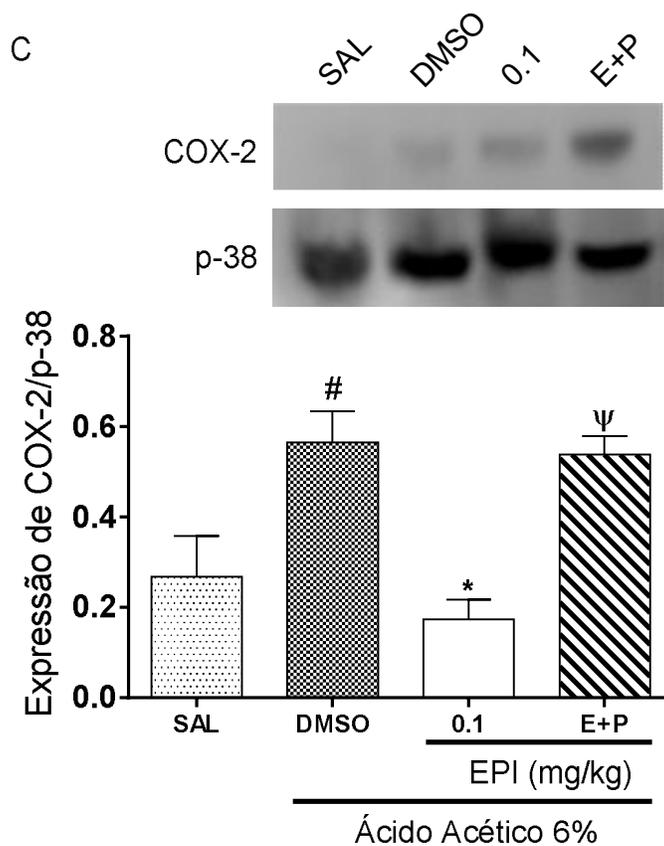
Foi realizada a imunoexpressão para NF $\kappa$ B, iNOS e COX-2 e dos tecidos dos cólons de camundongos com colite experimental por ácido acético através da técnica de western blot. Como mostrado na Figura 22, o grupo DMSO apresentou um aumento de imunoexpressão de A: NF $\kappa$ B ( $0,450 \pm 0,031$  NF $\kappa$ B p65/p-38), B: iNOS ( $0,476 \pm 0,078$  iNOS/p-38), e C: COX-2 ( $0,565 \pm 0,069$  COX-2/p-38), em relação ao grupo salina A: NF $\kappa$ B ( $0,130 \pm 0,023$  NF $\kappa$ B p65/p-38), B: iNOS ( $0,166 \pm 0,015$  iNOS/p-38), C: COX-2 ( $0,268 \pm 0,089$  COX-2/p-38). O grupo tratado com epiisopiloturina diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a imunoexpressão para A: NF $\kappa$ B ( $0,179 \pm 0,053$  NF $\kappa$ B p65/p-38) B: iNOS ( $0,166 \pm 0,021$  iNOS/p-38), C: COX-2 ( $0,174 \pm 0,043$  COX-2/p-38). Já no grupo tratado simultaneamente com a epiisopiloturina 0,1 mg/kg e pirenzepina 10mg/kg, observou-se um significativo ( $p < 0,05$ ) aumento na

imunoexpressão destes marcadores: A: NFκB ( $0,381 \pm 0,023$  NFκB p65/p-38), B: iNOS ( $0,486 \pm 0,027$  iNOS/p-38), C: COX-2 ( $0,537 \pm 0,041$  COX-2/p-38).

**Figura 22. Epiisopiloturina reduz a imunoexpressão de NFκB, INOS e COX-2 em tecido do cólon através do receptor muscarínico M1.**







**Figura 22. Epiisopiloturina reduz a imunoexpressão de NFκB, INOS e COX-2 em tecido do cólon através do receptor muscarínico M1.** A partir das amostras de tecido do cólon foi realizado western blot para iNOS, figura A; NFκB, figura B; e COX-2 figura C. Os resultados estatísticos são expressos como média ± erro de 6 animais por grupo. \*P <0,05 vs grupo DMSO; #P <0,05 vs grupo salina; ψP < 0,05 vs grupo EPI. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls)

#### 4. DISCUSSÃO

A colite ulcerativa, é uma doença inflamatória intestinal cuja manifestações agudas caracterizam-se por uma série de eventos celulares e moleculares que promovem a migração e ativação de mediadores químicos inflamatórios. Células intestinais (imunes, epiteliais, endoteliais e nervosas) liberam citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, eicosanóides, EROs, enzimas proteolíticas, neuropeptídeos, moléculas de adesão, ou seja, composto diversos que contribuem para o recrutamento celular e para a cronicidade da inflamação, o que resulta no aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular. Dessa forma, substâncias que inibem o estresse oxidativo, regulam a secreção de mediadores inflamatórios e reduzem a infiltração celular podem ser potenciais agentes alternativos ou adjuvantes na terapia das DII. (FILHO, 2011; SILVA, 2018; WITAICENIS, 2010).

Os modelos experimentais em animais contribuem para elucidação dos possíveis mecanismos implicados como causadores da colite ulcerativa quanto a instalação da doença e para a avaliação da ação de novos fármacos. Os modelos em animais mais comumente utilizados são induzidos por enemas de ácidos ou substâncias corrosivas que causam as alterações histológicas similares à colite ulcerativa em humanos (GUAZELLI et al., 2013). Um dos modelos comumente utilizados e bem estabelecidos, é por instilação de ácido acético intracolônica, que causa uma acidificação intracelular, resultando em danos epiteliais no cólon com inflamação não transmural, necrose das camadas mucosa e submucosa, edema mucoso, infiltração de neutrófilos na mucosa e ulcerações na submucosa (KANDHARE et al., 2012). É caracterizado por uma resposta inflamatória aguda, apresentando alterações morfológicas e perfil inflamatório similar à colite ulcerativa em humanos (RANI et al., 2011; HARTMANN et al., 2012; MINAIYAN et al., 2014).

Na primeira fase deste estudo realizou-se uma triagem para escolha da melhor dose de epiisopiloturina com efeito anti-inflamatório no modelo de colite por ácido acético em camundongos. Um estudo anterior avaliou o potencial anti-inflamatório da epiisopiloturina no modelo de colite crônica induzida por TNBS em ratos, em três doses: 0,1; 0,3; 1,0 mg/Kg. O estudo concluiu que a epiisopiloturina possui atividade anti-inflamatória no modelo estudado, com maior significância na dose de 1,0 mg/kg (RODRIGUES, et. al., 2018). Este estudo serviu como base na escolha das doses utilizadas no presente estudo, porém acrescido de uma menor dose decimal, visto que

o modelo experimental de indução deste estudo é um modelo agudo, e em camundongos.

Em nosso estudo, foi administrado a epiisopiloturina em três diferentes doses (0,01, 0,1 e 1,0 mg/kg) para delineamento da melhor dose com característica anti-inflamatória nos parâmetros analisados, com o objetivo de continuar os estudos de via de ação com essa dose encontrada. O grupo de animais ao qual foi induzida a colite com ácido acético a 6%, e não tratado com epiisopiloturina, apresentou aumento significativo dos escores macroscópicos de lesão e do peso úmido colônico quando comparados aos animais que receberam somente salina via intra colônica. Já os animais com colite por ácido acético e tratados com epiisopiloturina apresentaram uma diminuição dos escores macroscópicos de lesão no cólon, com uma maior significância, na maioria dos testes, na dose de 0,1 mg/kg. Corroborando com o resultado da avaliação macroscópica, os de animais que foram tratados com a epiisopiloturina na dose de 0,1 mg/Kg tiveram também diminuição no peso úmido colônico e redução do dano tecidual microscópico observado no cólon de camundongos com colite experimental induzida por ácido acético, quando comparado ao grupo não tratado (ácido acético), pois pode-se observar uma manutenção da estrutura do epitélio, preservação das criptas intestinais, e uma redução significativa no infiltrado celular na mucosa intestinal.

As alterações macroscópicas e microscópicas do cólon dos animais observadas no presente estudo foram consistentes com outros estudos que utilizaram ácido acético para indução da colite experimental (SHALKAMI; HASSAN; BARK, 2018; ALI et al., 2017). O aumento do peso do cólon pode estar associado a hiperemia da mucosa, edema extenso e expansão da inflamação (MALOY; POWRIE, 2011) e foi relatado também por outros estudos utilizando o mesmo modelo de colite experimental (NAJAFI et al., 2017; FARAMARZPOUR et al., 2019).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima peroxidase presente principalmente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, que podem ser indiretamente aplicadas para estimar a intensidade da infiltração de neutrófilos em uma amostra de tecido como cólon na condição de colite ulcerativa (KONDAMUDI et al., 2015). A produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos é uma característica marcante da MPO (WINTERBOURN et al., 2016). No presente estudo, observou-se um aumento na atividade da mieloperoxidase no grupo de animais com colite por ácido acético, como também pode ser observado em outro estudo que usou modelo experimental de colite

(ZHANG, 2006). Já no grupo tratado com a epiisopiloturina na dose de 0,1 mg/kg houve uma redução da MPO corroborando com os dados microscópicos, onde ocorreu atenuação dos danos da mucosa e da submucosa com redução da infiltração de neutrófilos no grupo com colite não tratado, sugerindo que sua ação anti-inflamatória pode envolver inibição da migração de leucócitos e infiltração de neutrófilos.

No modelo experimental de colite induzida por ácido acético ocorre aumento do estresse oxidativo, ligado diretamente ao aumento de EROS, levando a um desequilíbrio das defesas antioxidantes, resultando em uma ruptura celular e a peroxidação lipídica, que pode ser mensurada através do aumento dos níveis de MDA, de nitrato/nitrito e pela redução dos níveis de GSH. (KEEBLE, 2009; YANG, 2014; OLAMILOSOYE et al., 2018). Neste estudo foi observado que o grupo que recebeu ácido acético intracólon e não foi tratado, apresentou aumento nos níveis de MDA, nitrato/nitrito e redução dos níveis de GSH, em comparação ao grupo de animal que recebeu apenas salina. A epiisopiloturina nas três doses estudadas (0,01, 0,1 e 1,0 mg/kg) foi capaz de reduzir os níveis de MDA, de nitrato/nitrito e preservou o consumo de GSH, indicado como marcadores do dano oxidativo tecidual, confirmando assim a característica anti-inflamatória da epiisopiloturina. Porém a redução maior se deu na dose de 0,1 mg/kg.

A superexpressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  desempenha um papel importante na patogênese da colite ulcerativa, pois níveis reduzidos dessas citocinas podem levar à melhora do quadro da colite ulcerativa (SADIK et al., 2011; NEURATH, 2014.). Neste trabalho, encontrou-se aumento de níveis de IL-1 $\beta$  no cólon de animais com colite (grupo DMSO) quando comparado ao grupo que recebeu apenas solução salina intracólon. Com a administração de epiisopiloturina na dose de 0,1 mg/kg, a concentração de IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  foi reduzida no cólon, indicando ação anti-inflamatória do alcaloide. Este resultado é corroborado por um estudo anterior que demonstrou o potencial anti-inflamatório de alcaloides colinérgicos reduzindo os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  em modelo de peritonite (SILVA, et. al, 2013)

Mediante os resultados iniciais obtidos com a epiisopiloturina nas 3 doses (0,01, 0,1 e 1,0 mg/kg) foi possível confirmar a eficácia da atividade anti-inflamatória da epiisopiloturina no modelo de colite induzida por ácido acético. Foi possível inferir ainda que a melhor dose em reduzir os parâmetros inflamatórios no modelo estudado

é a dose de 0,1 mg/kg, sendo a dose de escolha para a modulação da resposta envolvendo a via colinérgica, especificamente o receptor muscarínico M1.

A via anti-inflamatória colinérgica, é um mecanismo neuro-imunológico, no qual a digestão de ácidos graxos ou citocinas pró-inflamatórias, ativam o nervo vago, fazendo com que neurônios pré-sinápticos produzam neurotransmissores colinérgicos, como a ACh, que irá se ligar em receptores presentes em células do tecido lesionado, fazendo-as com que reduzam a inflamação (LUYER, et. al. 2005; WU, et. al. 2014) Foi descoberto inicialmente que a estimulação do nervo vago era suficiente para abolir a inflamação sistêmica em resposta à endotoxina (BOROVIKOVA et al., 2000). Estudos tem sido levantado envolvendo a ACh devido aos seus poderosos efeitos anti-inflamatórios periféricos e vem mostrando o envolvimento da via colinérgica anti-inflamatória no mecanismo de inflamações intestinais, inferindo que a estimulação vagal e administração sistêmica de agonistas seletivos para receptores nicotínicos, reduzem a resposta inflamatória (JONGE, ULLOA, 2007).

Visto que as propriedades anti-inflamatórias da epiisopiloturina já estão elucidadas em modelos de inflamação geral e de doença de Crohn (VERAS, et. al, 2013; RODRIGUES, 2018), nosso estudo teve como objetivo principal estudar por qual via esse mecanismo ocorre, apontando a via colinérgica como hipótese de estudo, devido as sua participação no processo inflamatório, e similaridade da epiisopiloturina com a molécula de pilocarpina, que é um agonista colinérgico.

A segunda fase deste estudo, se deu através da pesquisa computacional de docagem molecular entre o receptor muscarínico M1 e a molécula de epiisopiloturina, para direcionar a continuação dos estudos farmacológicos *in vivo*, de acordo com a hipótese levantada de mecanismo de ação do alcalóide epiisopiloturina. A docagem molecular permite ao estudo realizar uma triagem virtual de vários candidatos a fármaco de acordo com sua habilidade de ligação e força de afinidade a um receptor alvo (ALHAZMI, 2015). Estudos de docagem molecular são de grande importância no planejamento de fármacos e na descoberta de novos alvos terapêuticos para o tratamento de doenças (MAMIDALA et al., 2016; FIGUEIREDO et al., 2018).

O docking molecular é uma técnica computacional que proporciona a investigação das estruturas químicas e determina as possíveis orientações que a molécula pode assumir no interior do sítio ligante de um receptor alvo ou entre macromoléculas, ou seja, verificar se a molécula é capaz de se ajustar ao sítio ativo

de um receptor tanto quimicamente quanto geometricamente. A técnica se dá através da busca conformacional por diferentes modos de ligação do ligante no sítio ativo do receptor, seguida da avaliação da afinidade de cada um destes modos de ligação (ROSADO, 2010; ALENCAR, 2010). A energia da ligação entre o receptor e o ligante é classificada como afinidade da conformação, e atribui-se significância a este parâmetro quando os valores de energia de afinidade para valores negativos, inferiores a -6 kcal/mol. Ou seja, quanto menor for o valor, mais significância ele apresentará à ligação encontrada (SHITYAKOV; FORSTER, 2010; RASCHKA, 2014).

No presente estudo, foi analisada a interação da molécula de epiisopiloturina com o receptor muscarínico M1, através de docking molecular, onde apresentou energia de ligação da interação ligante-macromolécula com valor de  $\Delta G = -8.44$  (Kcal/mol) obtida no Autodock. Este resultado implica uma boa afinidade da molécula de epiisopiloturina com o receptor muscarínico M1, visto que o valor encontrado foi menor que -6 kcal/mol, apresentando alta significância da ligação receptor/molécula. Corroborando com esses dados, resultados semelhantes podem ser encontrados em outro estudo de docagem molecular para outras substâncias tendo como alvo o receptor M1 que tiveram valor de  $\Delta G = -10,3$  a  $-8$  (Kcal/mol). (BOJIC, et. al., 2017)

Neste estudo, a interação ligante-macromolécula (receptor M1/Epiisopiloturina) apresentou e constante de inibição ( $k_i$ ) igual a 652 nM (0,652  $\mu$ M) obtida no Autodock. A molécula foi capaz de formar ligações de H com o resíduo GLN110, e interações hidrofóbicas com os seguintes resíduos: ALA96, PHE197, ASN382, TRP157, ALA193, TYR381, VAL113, TRP378, SER109, TYR106, TYR404, ASP105. Resultados semelhantes podem ser observados em outro estudo de docagem molecular envolvendo a epiisopiloturina com alvos moleculares para o parasita *Schistosoma mansoni*, onde a mesma demonstrou bons parâmetros de afinidade com a enzima histona desacetilase 8 (-6,43 kcal mol<sup>-1</sup>, 19,44  $\mu$ M), ligada a possíveis alvos anti-inflamatórios (ROCHA, et. al., 2018)

A partir do resultado de docagem molecular, pode-se inferir que há uma ligação da epiisopiloturina com o alvo molecular do receptor M1, indicando este receptor como potencial alvo para a ação terapêutica da epiisopiloturina na colite ulcerativa, uma vez que se encontra receptores muscarínicos do subtipo M1 no cólon. A participação do receptor muscarínico M1 na resposta anti-inflamatória da epiisopiloturina foi verificada neste estudo por meio da administração simultânea da pirenzepina, um antagonista colinérgico específico do receptor muscarínico M1, no mesmo grupo e animais

tratados com epiisopiloturina 0,1 mg/kg. Foram analisados parâmetros inflamatórios, como escores macroscópicos e microscópicos de lesão, de infiltração neutrofílica, parâmetros de estresse oxidativo e de expressão proteica.

O processo inflamatório que ocorre na colite ulcerativa, leva a uma hiperemia local da mucosa, acúmulo de infiltrado celular, principalmente neutrófilos com consequente edema. Parâmetros como danos macroscópicos e microscópicos, são vistos histologicamente como destruição da arquitetura da mucosa colônica, depleção de células caliciformes, hemorragia e intensa infiltração de neutrófilos, com consequente aumento do peso úmido do cólon, sendo indicativos da extensão e acuidade da lesão inflamatória (ASAKURA et al., 2007; MALOY-POWRIE, 2011; D'ARGENIO et al., 2012).

Neste estudo, o grupo de animais tratados simultaneamente com pirenzepina na dose de 10 mg/kg e epiisopiloturina na dose de 0,1 mg/kg apresentou aumento nas pontuações de escores macroscópicos de lesão inflamatória, e no peso úmido do cólon, quando comparado ao grupo de animais que foram tratados apenas com a epiisopiloturina, mostrando portanto o bloqueio farmacológico do receptor M1 pela pirenzepina, com consequente inibição do efeito anti-inflamatório da epiisopiloturina. Corroborando com esses parâmetros, foi possível constatar, a partir da análise histológica dos cólons dos animais que foram tratados simultaneamente pirenzepina e epiisopiloturina, uma elevada infiltração de células inflamatórias nas camadas do cólon, alteração estrutural da arquitetura, e depleção de células caliciformes, sendo estatisticamente significativa a diferença dos escores desses parâmetros quando comparado ao grupo que recebeu apenas epiisopiloturina, mostrando o bloqueio da atividade anti-inflamatória da epiisopiloturina mediada pelo receptor muscarínico M1. Resultados semelhantes de alteração na estrutura tecidual durante processo inflamatório são apresentados no estudo de WEISS et al. (2015).

Como relatado anteriormente e visualizados nos resultados de análise histológica, no processo inflamatório da colite ulcerativa há uma intensa migração células inflamatórias, principalmente neutrófilos. Esta resposta inflamatória pode ser observada, medindo-se a concentração da enzima mieloperoxidase (MPO) específica para neutrófilos, e que funciona um indicador da acumulação de neutrófilos. (SILVA, 2013.) A MPO é uma peroxidase presente nos grânulos de leucócitos de linhagem granulocítica, como os neutrófilos e em menor quantidade em monócitos e macrófagos. Os neutrófilos, estão entre as células inflamatórias responsáveis pela

produção das espécies reativas de oxigênio (EROs), que quando estão presentes no tecido resultam em peroxidação lipídica resultando em dano tecidual. A MPO catalisa a reação  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$ , onde o ácido hipocloroso é altamente oxidante, de 100 a 1000 vezes mais tóxico que o  $\text{O}_2^-$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  e sua diminuição representa a diminuição do influxo de neutrófilos e do estresse oxidativo (MORET-TATAY et al., 2016). Alterações dos níveis de MPO são apontadas como parâmetro para analisar a gravidade do processo inflamatório em diversos tecidos, como o intestino (YIN et al., 2011).

Neste estudo, o grupo de animais tratados conjuntamente com pirenzepina e epiisopiloturina (0,1mg/kg) apresentou um aumento da atividade da enzima MPO, indicando que houve uma intensa infiltração neutrofílica no cólon desses animais devido ao processo inflamatório ocasionado pelo ácido acético. Efeito oposto foi observado no grupo tratado apenas com a epiisopiloturina, onde houve diminuição na migração de neutrófilos para o sítio inflamatório durante a colite por ácido acético, inferindo que a mesma teve sua ação antagonizada, através do receptor M1, pela pirenzepina.

O estresse oxidativo gerado na colite ulcerativa, se dá por meio do desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) oriundas do sistema imune hiper-reativo, em resposta ao processo inflamatório patológico, levando a redução das enzimas antioxidantes de defesa. (KEEBLE, 2009). Esse desequilíbrio leva a produção de radicais livres que causam peroxidação de lipídios nos tecidos do cólon (LIU et al., 2018; RODRIGUES DE CARVALHO et al., 2018). Um dos produtos secundários resultantes da peroxidação lipídica, é o MDA, um aldeído insaturado formado a partir da ruptura de ácidos graxos poli-insaturados, sendo utilizado como indicador de dano oxidativo in vivo (SADAR et al., 2016) e o aumento de seus níveis causa alterações estruturais e o desenvolvimento de respostas imunológicas (LIMA E ABDALLA, 2001; KUMAR et al., 2014).

Outro componente significativo das defesas antioxidantes na maioria dos tecidos é a glutatona (GSH), que se apresenta como um tripeptídeo-tiol ubíquo. Níveis reduzidos de GSH resultam em lesões graves na mucosa do cólon e tem sido usado como indicador alternativo de doenças inflamatórias intestinais (OLAMILOSOYE et al., 2018). Nos modelos experimentais de colite em animais, os níveis de GSH normalmente são reduzidos (MOURA et al., 2015). A GSH é um importante agente antioxidante intracelular, presente em concentrações altas em células de mamíferos,

envolvida no mecanismo de reparo do dano da mucosa pelos radicais livres, por ter função protetora das células intestinais contra a inflamação. (OLAMILOSOYE et. al., 2018).

Um dos principais radicais livres atuantes nesse processo inflamatório é o radical superóxido, um íon de alta reatividade que participa da produção de EROS (RAHIMI, 2010). Na presença de ânions superóxidos, grandes quantidades de NO produzem peróxinitrito, um agente oxidante tóxico que contribui para o processo inflamatório através da nitração de resíduos de tirosina levando a alterações na estrutura e função das proteínas, dano oxidativo e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias. A superprodução de ON causa acúmulo tecidual de produtos da oxidação do peroxinitrito, o nitrito/nitrato durante o processo inflamatório. Portanto, o nitrito/nitrato é considerado como índice de dano oxidativo (DODDA et al., 2014 ABIODUN et al., 2016).

A acuidade da lesão colônica causada pelo ácido acético durante a colite experimental, está diretamente ligada aos danos causados pelas EROS. Neste estudo, o grupo tratado com a epiisopiloturina na dose de 0,1 mg/kg preservou os níveis de glutathiona (GSH), e diminuiu os níveis de MDA e de nitrito/nitrato, indicando assim que a substância interfere na produção de radicais livres por meio da interrupção da peroxidação lipídica, o que demonstra sua capacidade antioxidante em reduzir o processo inflamatório causado pelo ácido acético no cólon. Já o grupo de animais que recebeu ácido acético intracólon e foram tratados com pirenzepina e epiisopiloturina simultaneamente, tiveram essa ação reduzida, pois apresentaram alto consumo de GSH e aumento significativo dos níveis de MDA e de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ), semelhante ao que ocorreu no grupo com colite não tratado, inferindo assim, que a pirenzepina, por meio de sua ligação ao receptor M1, bloqueou a ação da epiisopiloturina, no processo de defesa antioxidante no curso da colite ulcerativa

Corroborando com os nossos dados, outros estudos de colite induzido experimentalmente demonstrou depleção dos níveis de GSH e aumento dos níveis de MDA nos animais não tratados, já os animais tratados com compostos anti-inflamatórios preservaram os níveis de GSH e diminuíram os níveis de MDA (KARP E KOCH, 2006TAHMASEBI; FROUSHANI; AHANGARAN, 2019). Outros estudos mostraram que o aumento do estresse oxidativo implica em um aumento na produção de radicais livres, levando a um desarranjo a estrutura e função do tecido, e inferiram que o aumento da produção de NO pela enzima iNOS parece ser responsável pelo

surgimento de lesões no tecido colônico durante a colite experimental e que, em humanos com colite ulcerativa, há elevação da atividade da iNOS com aumento da concentração de nitrito (FILLMANN et al., 2007; PARRA et al., 2015).

A resposta imune adaptativa na colite ulcerativa envolve uma resposta inflamatória chamada “atípica condição Th2, apresentando altos níveis de mediadores inflamatórios, como as quimiocinas. Em resposta à quimiocinas e à cascata do complemento, os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutados para o sítio lesionado no processo inflamatório, sendo responsáveis por liberarem substâncias antimicrobianas, como espécies reativas de oxigênio (EROs), eicosanóides, peptídeos catiônicos e proteinases, além de produzirem mediadores pró-inflamatórios, tais como interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que irão amplificar a inflamação. (JONES-HALL E GRISHAM, 2014). A interleucina IL-1 $\beta$  desempenha importante papel na colite pois é responsável pelo aumento da produção de interleucina IL-6 que, por sua vez, atua na medula óssea aumentando a mobilização e maturação de neutrófilos, induzindo ao quadro de neutrofilia. A citocina IL-1 $\beta$  atua também aumentando a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos circulantes e em células endoteliais (YANG, 2014).

Neste estudo, o tratamento com a epiisopiloturina, reduziu a concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , porém a administração do antagonista específico do receptor M1, pirenzepina, bloqueou esse efeito, levando a um aumento dessas citocinas em relação ao grupo tratado apenas com epiisopiloturina, sugerindo mais uma vez que a atividade anti-inflamatória da mesma é mediada pelo receptor muscarínico M1, e que o este receptor participa do processo de sinalização celular por mediadores inflamatórios, como as citocinas, durante o processo inflamatório do cólon.

Estudos com modelos experimentais de colite, apontam que as ações de compostos anti-inflamatórios no curso da doença podem ser mediadas pela regulação negativa do fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) (VALERO et al., 2019). O NF $\kappa$ B representa uma família de proteínas (heterodímero, p65 e p50) que funcionam como proteínas de transcrição indutíveis, e que regulam vários genes envolvidos na resposta inflamatória por meio a ligação a um elemento específico do DNA. A ativação da proteína NF $\kappa$ B tem relevante papel no processo inflamatório devido a sua capacidade de induzir a transcrição de genes pró-inflamatórios, tais como os genes do TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  resultando na diminuição da concentração de citocinas pró-inflamatórias como

IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , diminuição dos níveis de NO, e da expressão de iNOS e COX-2 (TAK; FIRESTEIN, 2001; BRÜCKNER et al. 2012; LIU et al. 2014, LIU, et. al., 2018).

Durante o processo inflamatório, ao serem estimulados, macrófagos reagem produzindo fatores pró-inflamatórios como NO, induzido pela iNOS, levando ao estresse oxidativo (ALKIM et al., 2012). Substâncias com capacidade de inibir a produção ou liberação desse mediador, ou que regule a expressão dos genes responsáveis por sua produção ou de outros genes inflamatórios, como a cicloxigenase-2 (COX-2), podem ser considerados elementos com atividade anti-inflamatória (JUNG et al., 2009; SHAHBAZI et al., 2016;). A COX-2 é uma enzima responsável pela produção de prostaglandinas através da oxidação do ácido araquidônico em células inflamatórias, em mais um processo gerador de EROS envolvido no curso da colite ulcerativa. Sendo assim, a magnitude da expressão de COX-2 avalia o grau de inflamação no tecido (WONG et al., 2016).

Neste estudo o grupo de animais tratados apenas com epiisopiloturina (0,1 mg/kg), apresentou diminuição considerável na expressão de NF $\kappa$ B, iNOS e COX-2, avaliada por western blot. Já o grupo de animais tratados simultaneamente com epiisopiloturina e pirenzepina, apresentou aumento na expressão desses marcadores, apresentando intensa marcação das enzimas, reduzindo a produção de prostanóides. Estes resultados evidenciam mais uma vez o bloqueio da ação anti-inflamatória da epiisopiloturina pela pirenzepina, através do receptor muscarínico M1.

Estes resultados corroboram com estudos anteriores que mostram que a inflamação do colón na colite experimental aponta um maior aumento da expressão da iNOS em animais não tratados, em comparação aos animais sem colite (controle negativo) (HARTMANN et. al., 2014; GRISHAM et al., 2002). Outros estudos mostram significativo aumento da atividade de COX-2 diretamente relacionado a um aumento de parâmetros inflamatórios como atividade de MPO e infiltração leucocitária em modelos de colite experimental (LIU, et. al., 2014; PARK, et. al., 2012; VALERO, et. al. 2019).

A regulação do processo inflamatório pode ser realizada por meio do estímulo vagal eferente, através da via anti-inflamatória colinérgica, fazendo com que neurônios pré-sinápticos produzam neurotransmissores colinérgicos, como a ACh, que se liga, em receptores presentes em células do tecido lesionado, fazendo-as com que reduzam a inflamação (ROSAS-BALLINA et al., 2008). A administração periférica de Xanomelina, um agonista muscarínico M1 de ação central, resultou no mecanismo

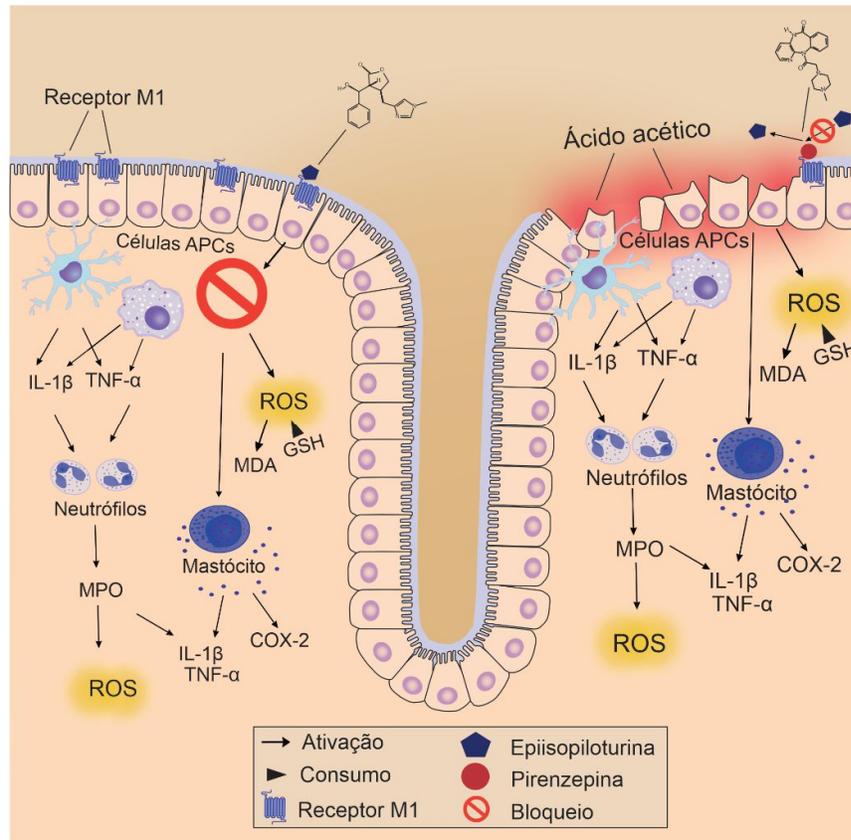
de proteção anti-inflamatória por meio de uma interação neuro-imune, associada a sinalização vagal, promovendo a diminuição de citocinas pró-inflamatórias durante a endotoxemia (ROSAS-BALLINA et al., 2015). Munyaka, 2014 mostrou em seu estudo que a estimulação da via anti-inflamatória colinérgica a nível central atenua a gravidade da colite e diminui os níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no cólon.

Magalhães (2017) inferiu em seu estudo que receptor muscarínico M1 está envolvido na resposta anti-inflamatória e antioxidante na colite experimental, ação essa comprovada e inibida pela administração do antagonista muscarínico do receptor M1, pirenzepina, demonstrando a importância de uma via endógena no combate a injúria intestinal como alvo para novos fármacos.

Corroborando com os resultados de Magalhães (2017) os resultados encontrados neste estudo, mostram que a eficácia anti-inflamatória da epiisopiloturina se estabeleceu com mais significância na dose de 0,1 mg/kg ao diminuir as pontuações macroscópicas e microscópicas de lesão inflamatória e o peso úmido do cólon, a concentração de MPO, das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , de MDA e preservou as concentrações de GSH, além de diminuir as concentrações de nitrato/nitrito no modelo de colite experimental por ácido acético. Ao se modular a via farmacológica pela qual esse efeito ocorre, foi observado que a pirenzepina, antagonista do receptor muscarínico M1, atuou bloqueando os efeitos farmacológicos anti-inflamatórios e antioxidantes da epiisopiloturina citados acima, bem como a diminuição da expressão de NF $\kappa$ B, iNOS e COX-2. O mecanismo de ação anti-inflamatória da epiisopiloturina no curso da colite experimental por ácido acético intercedidas pelo receptor muscarínico M1 estão descritas na figura 23.

Os resultados da modulação farmacológica *in vivo* por meio do bloqueio do receptor muscarínico M1, sugerem uma resposta anti-inflamatória da epiisopiloturina mediada por este receptor, pois quando realizada a co-administração da epiisopiloturina e pirenzepina, houve uma redução significativa dos efeitos anti-inflamatórios nos testes realizados.

**Figura 23: mecanismo de ação anti-inflamatório da Epiisopiloturina na colite experimental por ácido acético.**



Fonte: Figura adaptada de Danese e Fiocchi, 2011.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, mostram que o efeito anti-inflamatório intestinal da epiisopiloturina ao reduzir parâmetros inflamatórios, como danos macroscópicos e histopatológicos, estresse oxidativo, concentração de citocinas pró-inflamatórias e expressão de proteínas importantes no processo inflamatório, se dá através da sua interação com o receptor muscarínico M1. Esta ação foi comprovada por meio da administração simultânea do antagonista farmacológico específico do receptor muscarínico M1, pirenzepina, que levou a uma reversão dos efeitos anti-inflamatórios da epiisopiloturina nestes parâmetros estudados. Diante disso, infere-se que receptor muscarínico M1 presente no cólon, é um possível alvo farmacológico para a epiisopiloturina, um alcalóide natural, promissor como alternativa para o tratamento da colite ulcerativa.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-SALAM, O. M. E.; SLEEM, A. A. Study of the analgesic, anti-inflammatory, and gastric effects of gabapentin. **Drug discoveries & therapeutics**, v. 3, p. 18–26, 2009.

ABIODUN, O. O. et al. Antiinflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae): In vitro and *in vivo* evidences. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 192, p. 309-3194, nov, 2016

ALENCAR, Sérgio Amorim de. **Utilização de ferramentas computacionais para o estudo do impacto funcional e estrutural de nsSNPs em genes codificadores de proteínas**. 2010. Tese (Doutorado em Bioinformática) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

ALI A. A.; ABD A HALEEM EN, KHALEEL S. A. et al. Protective effect of cardamonin against acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. **Pharmacological reports**. v. 69, n. 2, p. 268–275, 2017.

ALHAZMI, M. I. Molecular docking of selected phytochemicals with H1N1 proteins. **Bioinformatics**. v. 11, p.196-202, 2015.

AL HADITHY, A. F.; DE BOER, N. K.; DERIJKS, L. J.; ESCHER, J. C.; MULDER, C. J.; BROUWERS, J. R. Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations. **Digestive and Liver Disease**, v. 37, n. 4, p. 282-297, 2005.

ALGIERI, F. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Phlomis purpurea* L. and *Phlomis lychnitis* L. in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 750–759, 2013.

ALKIM, C. et al. Thrombospondin-1 and VEGF in inflammatory bowel disease. **Libyan Journal of Medicine**, v. 7, 2012.

AMARAL, R.; PIZZOL, J.R AD.; PORTINHO, C.P.; BRAGA, P.; MOREIRA, L.F.; GUS, P. Enemas de ciclosporina (cya) no tratamento da retocolite ulcerativa induzida, em ratos, por ácido acético. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. v. 21, n. 4, p. 219-227, 2001.

APPLEYARD, C. B.; WALLACE, J. L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. **American Journal Physiology**, v. 269, p. 119-25, 1995.

ASAKURA, H.; SUZUKI, K.; HONMA, T. Recent advances in basic and clinical aspects of inflammatory bowel disease: which steps in the mucosal inflammation should we block for the treatment of inflammatory bowel disease? **World Journal of Gastroenterology**, v.13, n.15, p.2145-2149, 2007.

ARDIZZONE, S.; PORRO, G. B. Comparative tolerability of therapies for ulcerative colitis. **Drug Safety**, v. 25, n. 8, p. 561-582, 2002.

BADER S, KLEIN J, DIENER M. Choline acetyltransferase and organic cation transporters are responsible for synthesis and propionate-induced release of acetylcholine in colon epithelium. **European Journal of Pharmacology**, v. 733, p. 23–33, 2014

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

BOJIC, T.; PEROVIC, V. R.; SENCANSKI, M.; GLIŠIĆ, S. Identification of Candidate Allosteric Modulators of the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor Which May Improve Vagus Nerve Stimulation in Chronic Tinnitus. **Frontiers in Neuroscience**. V. 11, n. 636, p. 1-7, 2017.

BOROVIKOVA, L.V.; IVANOVA S.; NARDI, D.; ZHANG, M.; YANG, H., OMBRELLINO; M., TRACEY, K.J. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 85, n. 1, p. 141 – 147, 2000.

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

BRÜCKNER, M.; WESTPHAL, S.; DOMSCHKE, W.; KUCHARZIK, T.; LÜGERING, A. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate shows therapeutic antioxidative effects in a murine model of colitis. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 6, n. 2, p. 226–235, 2012.

BURGER, D.; TRAVIS, S. Conventional medical management of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1827-1837, 2011.

CARVALHO, L. R. Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid, reverses inflammation and lipid peroxidation parameters in the Crohn disease model induced by trinitrobenzenosulfonic acid in Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 102, p. 278–285, 2018.

CASSINOTTI, A.; TRAVIS, S. Incidence and clinical significance of immunogenicity to infliximab in Crohn's disease: a critical systematic review. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 15 n. 8, p. 1264-75, 2009.

CETINKAYA, E.; BULBULOGLU, E. B.; KURUTAS E. B.; CIRALIK H.; KANTARCEKEN B.; BUYUKBESE M. A. Beneficial effects of Nacetylcysteine on acetic-acid induced ulcerative colitis in rats. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 206, p. 131-139, 2005.

COHEN, R. D.; YU, A. P.; WU, E. Q.; XIE, J.; MULANI, P. M.; CHAO, J. Systematic review: the costs of ulcerative colitis in Western countries. **Alimentary Pharmacology e Therapeutics**. v. 31, n. 7, p. 693-707, 2010.

CONRAD, K.; ROGGENBUCK, D.; LAASS, M. W. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. **Autoimmun Reviews**, v. 13, p. 463-466, 2014.

DANESE, S. M. D.; FIOCCHI, C. M. D. Ulcerative Colitis. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 18, p. 1713-1725, 2011.

DAMIANI, C. R.; BENETTON, C. A.; STOFFEL, C.; BARDINI, K. C.; CARDOSO, V. H.; DI GIUNTA, G.; PINHO, R. A.; DAL-PIZZOL, F.; STRECK, E. L. Oxidative stress and metabolism in animal model of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 22, p. 1846-1851, 2007.

D'ARGENIO, G.; MAZZONE, G.; TUCCILLO, C.; RIBECCO, M. T.; GRAZIANI, G.; GRAVINA, A. G.; CASERTA, S.; GUIDO, S.; FOGLIANO, V.; CAPORASO, N.; ROMANO, M. Apple polyphenols extract (APE) improves colon damage in a rat model of colitis. **Digestive and Liver Disease**, v. 44, p. 555-562, 2012.

DE SMET, P.A. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs** v. 54, p. 801-840, 2007.

DELMAS P.; BROWN D. A. Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, p. 850-862, 2005.

DODDA, D. et al. Targeting oxidative stress attenuates trinitrobenzene sulphonic acid induced inflammatory bowel disease like symptoms in rats: Role of quercetin. **Indian Journal of Pharmacology**. v. 46, n. 3, p. 286-291, 2014.

EADEN, J. A.; ABRAMS, K. R.; MAYBERRY, J. F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. **Gut**, v. 48, p. 526-35, 2001.

EGLIN, R.M. Muscarinic receptors and gastrointestinal tract smooth muscle function. **Life Sciences**, v. 23, p. 2573-8, 2001.

FARAMARZPOUR A.; TEHRANI A. A.; TAMADDONFARD E.; IMANI M. The effects of crocin, mesalazine and their combination in the acetic acid-induced colitis in rats. **Veterinary Research Forum**, v. 10, n. 3, p. 227-234, 2019.

FAUBION, W. A. JR.; LOFTUS, E. V JR.; HARMSSEN, W. S.; ZINSMEISTER, A. R.; SANDBOM, W. J. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. **Gastroenterology**, v. 121 n.2, p. 255-60, 2001.

FIGUEROA, K. W.; SUGA, H.; EHLERT, F. J. Investigating the interaction of McN-A-343 with the M1 muscarinic receptor using its nitrogen mustard derivative and ACh mustard. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, p. 1534-1549, 2010.

FILHO, G.B. **Bogliolo patologia**. 8. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2011. p. 750-3.

FILLMANN, H. et al. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. **Toxicology**, v. 236, n. 3, p. 217-26, 2007.

FRÓES R. S. B.; CARVALHO A. T. P.; CARNEIRO A. J. V.; MOREIRA A. M. H. B.; MOREIRA J. P. L. et al. The socioeconomic impact of work disability due to inflammatory bowel disease in Brazil. **The European Journal of Health Economics**. p. 463-470, v. 19, n. 3, 2018.

GENERINI, S.; GIACOMELLI, R.; FEDI, R.; FULMINIS, A.; PIGNONE, A.; FRIERI, G.; DEL ROSSO A.; VISCIDO A.; GALLETTI B.; FAZZI M.; TONELLI F.; MATUCCICERINIC M. Infliximab in spondyloarthritis associated with Crohn's disease: an open study on the efficacy of inducing and maintaining remission of musculoskeletal and gut manifestations. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, p. 1664-1669, 2004.

GIRLICH, C.; SCHOLMERICH, J. Topical delivery of steroids in inflammatory bowel disease. **Current Drug Delivery**, v. 9, n. 4, p. 345-9, 2012.

GISBERT, J. P.; GOMOLLÓN, F.; MATÉ, J.; PAJARES, J. M. Role of 5-aminosalicylic acid (5-asa) in treatment of inflammatory bowel disease: a systemic review. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 47 n.3, p. 471-488, 2002.

GRISHAM, M. B. et al. Nitric oxide and chronic gut inflammation: controversies in inflammatory bowel disease. **Journal of Investigative Medicine**, v. 50, n. 4, p. 272-83, 2002.

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

GUIMARÃES, M.A.; DE OLIVEIRA, R. N.; VERAS, L. M.; LIMA, D. F.; CAMPELO, Y. D.; CAMPOS, S. A.; KUCKELHAUS S. A.; PINTO, P.L.; EATON, P.; MAFUD, A. C.; MASCARENHAS Y. P.; ALLEGRETTI, S. M.; DE MORAES, J.; LOLIĆ A.; LEITE, J. R. Anthelmintic Activity In Vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 9, n.3, p 1-18, 2015

HABERBERGER, R.; SCHULTHEISS, G.; DIENER, M. Epithelial muscarinic M1 receptors contribute to carbachol-induced ion secretion in mouse colon. **European journal of pharmacology**. v. 530, n. 3, p. 229-233, 2006.

HAGA, T. Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences**, v. 86, n. 6, p. 226-256, 2013.

HARRINGTON, A.M., HUTSON, J. M., SOUTHWELL, B. R. Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, p. 173-202, 2010.

HARTMANN, R. M.; MORGAN MARTINS, M. I.; TIEPPO, J.; FILLMANN, H. S.; MARRONI, N. P. Effect of *Boswellia serrata* on antioxidant status in an experimental model of colitis rats induced by acetic acid. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 57, p. 2038–2044, 2012.

HARTMANN, R. M. et al. *Boswellia serrata* has beneficial anti-inflammatory and antioxidant properties in a model of experimental colitis. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 9, p. 1392-8, 2014

HE, J.; LIANG, J.; ZHU, S.; ZHAO, W.; ZHANG, Y.; SUN, W. Protective effect of taurohyodeoxycholic acid from *Pulvis Fellis Suis* on trinitrobenzene sulfonic acid induced ulcerative colitis in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 670, p.:229-35, 2011.

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

HIROTA CL, MCKAY DM. Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. **British Journal of Pharmacology**, v. 149, p. 463–479, 2006.

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

JONES-HALL, Y. L., & GRISHAM, M. B. Immunopathological characterization of selected mouse models of inflammatory bowel disease: Comparison to human disease. **Pathophysiology**, v. 21, n. 4, p. 267–288, 2014.

JONGE, W.J.; ULLOA, L. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 915–929, 2007.

JUNG, H. W. et al. Hexane fraction of *Zingiberis Rhizoma Crudus* extract inhibits the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in LPS-stimulated BV2 microglial cells via the NF-kappaB pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1190– 1197, 2009.

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

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

KEEBLE, J. E.; BODKIN, J. V.; LIANG, L.; WODARSKI, R.; DAVIES, M.; FERNANDES, E. S.; COELHO, C. F.; RUSSELL, F.; GRAEPEL, R.; MUSCARA, M. N.; MALCANGIO, M.; BRAIN, S. D. Hydrogenperoxide is a novel mediator of

inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanism. **Pain**, v. 141 p.135–142, 2009.

KHAN, M. R. I.; ANISUZZAMAN, A. S. M.; SEMBA, S. M1 is a major subtype of muscarinic acetylcholine receptors on mouse colonic epithelial cells. **Journal Gastroenterology**, v. 48, p. 885-896, 2013.

KONDAMUDI, P.K.; KOVELAMUDI, H.; NAYAK, P.G.; RAO, M. C; SHENOY, R.R. Curcumin half analog modulates interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in inflammatory bowel disease. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, p. 296–302, 2015.

KOTZE P. G.; UNDERWOOD F. E.; DAMIÃO A. O. M. C.; FERRAZ J. G. P.; SAAD-HOSSNE R.; TORO M.; IADE B.; BOSQUESPADILLA F.; TEIXEIRA F. V.; JULIAO-BANOS F.; SIMIAN D.; GHOSH S.; PANACCIONE R.; NG S. C.; KAPLAN G. G. Progression of Inflammatory Bowel Diseases Throughout Latin America and the Caribbean: a Systematic Review. **Clinical Gastroenterology Hepatology**. p. 304-312, v. 18, n. 2, 2019.

KUMAR, V. S.; RAJMANE, A. R.; ADIL, M.; KANDHARE, A. D.; GHOSH, P.; BODHANKAR, S. L. Naringin ameliorates acetic acid induced colitis through modulation of endogenous oxido-nitrosative balance and DNA damage in rats. **Journal of Biomedical Research**, v. 28, n. 2, p. 132-145, 2014.

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

LIMA, David Fernandes. **Alcalóides de interesse industrial: aspectos químicos e biológicos**. 2008. 56 f. Monografia (Especialização em Plantas Mediciniais) - Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2008.

LIU, S. et al. *Lotus Leaf (Nelumbo nucifera)* and its active constituents prevent inflammatory Responses in macrophages via JNK/NF- $\kappa$ B signaling pathway. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 42, n. 4, p. 869–889, 2014.

LIU, B.; LI, S.; SUI, X.; GUO, L.; LIU, X.; LI, H.; GAO, L.; CAI, S.; LI, Y.; WANG, T.; PIAO, X. Root extract of polygonum cuspidatum siebold and zucc ameliorates dss-induced ulcerative colitis by affecting nf-kappab signaling pathway in a mouse model via synergistic effects of polydatin, resveratrol, and emodin. **Frontiers in Pharmacology**. v. 9, p. 347, 2018.

LUYER MD.; et al. Nutritional stimulation of cholecystokinin receptors inhibits inflammation via the vagus nerve. **The Journal of experimental medicine**, v. 202, n. 8, p. 1023-9, 2005.

MALOY K. J.; POWRIE F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 298–306, 2011.

- MALTZMAN, J. S.; KORETZKY, G.A. Azathioprine: old drug, new actions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 8, p. 1122-1124, 2003.
- MAGALHÃES, Diva Aguiar. **Resposta anti-inflamatória mediada pelo receptor muscarínico M1 durante a colite induzida por ácido acético**. 2017. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal do Piauí. Parnaíba, PI, 2017.
- MAMIDALA, R. Identification of Leishmania donovani topoisomerase 1 inhibitors via intuitive scaffold hopping and bioisosteric modification of known Top 1 inhibitors. **Scientific Reports**. v. 20, p. 28120, 2016.
- MEIER, J.; STURM, A. Current treatment of ulcerative colitis. **World Journal Gastroenterology**, v. 17, p. 3204-3212, 2011.
- MENDES, T. C. F.; RAIMUNDO, J. M.; NASCIMENTO-JUNIOR, N. M.; FRAGA, C. A.M.; BARREIRO, E. J.; SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO, G. Sedation and antinociception induced by a new pyrazolo[3,4-b]pyrrolo[3,4-d]pyridine derivative (LASSBio-873) is modulated by activation of muscarinic receptors. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 94, p. 70–74, 2009.
- MEYER, R.; FREITAG-WOLF, S.; BLINDOW, S.; BÜNING, J.; HABERMANN, J. K. Combining aneuploidy and dysplasia for colitis' cancer risk assessment outperforms current surveillance efficiency: a meta-analysis. **International Journal Colorectal Disease**. v. 32, p. 171–182, 2016.
- MICHELETTI, R.; SCHIAMONE, A.; GIOCHETTI, A. Muscarinic M1 receptors stimulate a nonadrenergic noncholinergic inhibitory pathway in the isolated rat duodenum. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 244, p. 680–684, 1988.
- MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, v. 86 n.1, p. 271-278, 1978.
- MINAIYAN, M.; ASGHARI, G.; TAHERI, D.; SAEIDI, M.; NASR-ESFAHANI, S. Antiinflammatory effect of Moringa oleifera Lam. Seeds on acetic acid induced acute colitis in rats. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 4, p. 127-136, 2014.
- MIRANDA, A.; NORDSTROM, E.; MANNEM, A.; SMITH, C.; BANERJEE, B.; SENGUPTA, J.N. The role of transiente receptor potential vanilloid 1 in mechanical and chemical visceral hyperalgesia following experimental colitis. **Neurociense**. v. 148, n. 4, p. 1021-1032, 2007.
- MITCHELSON, F. J. The pharmacology of McN-A-343. **Pharmacology e Therapeutics**. v. 135, p. 216-245, 2012.
- MOREIRA, A. L., LOBATO, L. F. C., SOUZA, H. S. IBD Epidemiology: What is Going on in the Developing World? Results from 163,000 Patients. **Gastroenterology**, v. 156, n. 6, e. 1, p. 362-373, 2019.

- MORET-TATAY, I. et al. Possible Biomarkers in Blood for Crohn's Disease: Oxidative Stress and MicroRNAs—Current Evidences and Further Aspects to Unravel. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016.
- MORRIS, G.P.; BECK P. L.; HERRIDGE M. S.; DEPEW W. T.; SZEWCZUK M. R.; WALLACE J. L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**. v. 96, p. 795-803, 1989.
- MOURA, F. A. et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? **Redox Biology**. v. 6, p. 617-639, dez, 2015
- NAFTALI, T. et al. Cannabis induces a clinical response in patients with Crohn's disease: a prospective placebo-controlled study. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 10, p. 1276-1280. e1, 2013.
- NAJAFI A.; MOTAGHI E.; HOSSEINI M. J. et al. The effect of sodium valproate on acetic acid-induced colitis in rats. **Inflammopharmacology**. v. 25, n.1, p. 137–145, 2017.
- NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 329, 2014.
- NG SC, SHI HY, HAMIDI N, UNDERWOOD FE, TANG W, BENCHIMOL EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **Lancet**, v. 390, n. 10114, p. 2769-2778, 2017.
- OLAMILOSOYE, K. P. et al. The aqueous extract of *Ocimum gratissimum* leaves ameliorates acetic acid-induced colitis via improving antioxidant status and hematological parameters in male Wistar rats. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**. v. 5, n. 3, p. 220-227, set, 2018.
- PAOLUZI O. A.; PICA R.; MARCHEGGIANO A.; CRISPINO P.; IACOPINI F.; IANNONI C.; RIVERA M.; PAOLUZI P. Azathioprine or methotrexate in the treatment of patients with steroid-dependent or steroid-resistant ulcerative colitis: results of an open-label study on efficacy and tolerability in inducing and maintaining remission. **Alimentary Pharmacology e Therapeutics**, v. 16, n. 10, p. 1751-1759, 2002.
- PARRA, R. S. et al. Hyperbaric oxygen therapy ameliorates TNBS-induced acute distal colitis in rats. **Medical Gas Research**, v. 5, p. 6, 2015.
- PEARSON, C. Inflammatory bowel disease. **Clinical Advanced Nutrition**. v. 1009 n. 9, p. 86-90, 2004.
- PODOLSKY, D.K. The current future understanding of inflammatory bowel disease. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. v. 16, p. 933–943, 2002.

RAHIMI, R. A review of the efficacy of traditional Iranian medicine for in -flammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 36, p. 4504-4514, 2010

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

RANI, N.; SHARMA, A.; SINGH, R. Imidazoles as promising scaffolds for antibacterial activity: a review. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 1812-1835, 2013.

REIFEN, R.; NISSENKORN, A.; MATAS, Z.; BUJANOVER, Y. 5-ASA and lycopene decrease the oxidative stress and inflammation induced by iron in rats with colitis. **Journal Gastroenterology**, v. 39, p. 514–519, 2004.

ROBERTS-THOMSON I.C.; FON J.; UYLAKI W.; CUMMINS A.G.; BARRY S. Cells, cytokines and inflammatory bowel disease: a clinical perspective. **Expert Review of Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, n. 6, p. 703-716, 2011.

ROCHA, J.A.; REGO, N. C. S.; CARVALHO, B. T. S.; SILVA, F. I.; SOUSA, J. A.; RAMOS, R. M.; PASSOS, I. N. G.; MORAES, J.; LEITE, J. R. S. A.; LIMA, F. C. A. LIMA. Computational quantum chemistry, molecular docking, and ADMET predictions of imidazole alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* with schistosomicidal properties. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, 2018.

RODRIGUES DE CARVALHO, L.; DE BRITO, T. V.; JÚNIOR, S.C.; J., JÚNIOR, G. J. D., MAGALHÃES, D. A.; GUIMARÃES. S. S., SILVA, R.O.; DA SILVA, R. P.; VASCONCELOS, D. F. P.; VERAS, L. M.; LEITE, J. R. S. A.; MARTINS, D.S.; MARTINS, C. S.; OLIVEIRA, J. S.; BARBOSA, A. L. R. Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid, reverses inflammation and lipid peroxidation parameters in the Crohn disease model induced by trinitrobenzenesulfonic acid in Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 278–285, 2018

ROSADO, Joemerson Osório. **Análise de redes de interações entre drogas quimioterápicas usadas no tratamento de câncer gástrico: explorando proteínas e processos biológicos por meio de ferramentas de farmacologia de sistemas**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010

ROSAS-BALLINA, M., OCHANI, M., PARRISH, W.R., OCHANI, K., HARRIS, Y.T., HUSTON, J.M., CHAVAN, S., AND TRACEY, K.J. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 11008–11013, 2008.

ROSAS-BALLINA, M.; VALDÉS-FERRER, S. I.; DANCHO, M. E.; OCHANI, M.; KATZ, D.; CHENG, K. F.; OLOFSSON, P. S.; CHAVAN, S.S.; AL-ABED, Y.; TRACEY, K. J.; PAVLOV, V. A. Xanomeline suppresses excessive pro-inflammatory

cytokine responses through neural signal-mediated pathways and improves survival in lethal inflammation. *Brain*, **Behavior and Immunity**, v. 44, p. 19-27, 2015

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

SADIK, C. D.; KIM, N. D. & LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in Immunology**, v.32, n. 10, p. 452–460, 2011.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. Pilocarpus spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 115 – 137, 2004.

SHAHBAZI, S. et al. Drug Targets for Cardiovascular-Safe Anti-Inflammatory: In Silico Rational Drug Studies. **PloS one**, v. 11, n. 6, p 156, 2016.

SHALKAMI A. S.; HASSAN M.; BAKR A. G. Anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptotic activity of diosmin in acetic acid-induced ulcerative colitis. **Human & Experimental Toxicology**, V. 37, n. 1, p. 78, 2018.

SAWAYA, A. C.; COSTA, Y. D.; MAZZAFERA, P. Unraveling the biosynthesis of pilocarpine in Pilocarpus microphyllus. **Natural product communications**, v. 10, n. 5, p. 721-724, 2015.

SCHULTHEISS, G.; DIENER, M. The epidermal growth factor-pathway is not involved in down-regulation of Ca<sup>2+</sup>-induced Cl<sup>-</sup> secretion in rat distal colon. **European Journal of Pharmacology**, v. 512, p. 67–71, 2005.

SHITYAKOV, Sergey; FORSTER, Carola. In Silico Predictive Model to Determine Vector-Mediated Transport Properties for the Blood–brain Barrier Choline Transporter. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, v. 7, p. 23–36, 2014.

SILVA, A. P.F.; JUNIOR, M. R. M. Biomarcadores fecais úteis nas doenças inflamatórias intestinais: revisão sistemática. **Arquivos de Ciências da Saúde**. V. 23. P. 16-20, 2018

STRABEL, D.; DIENER, M. Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon. **European Journal of Pharmacology**, v. 274, p. 181–191, 1995.

SEDLAK J, LINDSAY R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25: p. 192-205, 1968.

SILVA, V. G. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from Pilocarpus microphyllus. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1071-1077, 2013.

- SILVA, A. P.F.; JUNIOR, M. R. M. Biomarcadores fecais úteis nas doenças inflamatórias intestinais: revisão sistemática. **Arquivos de Ciências da Saúde**. v. 23. P. 16-20, 2018.
- SLATER, T.W. et al. Neutrophil microparticles deliver active myeloperoxidase to injured mucosa to inhibit epithelial wound healing. **The Journal of Immunology**, v. 198, n.7, p. 2886- 2897, 2017.
- SOBCZAK, M.; FABISIAK, A.; MURAWSKA, N. Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases. **Pharmacological Reports**. v. 66, p. 766-775, 2014.
- TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. **Journal of Clinical Investigation**. v. 107, n. 1, p. 7-11, jan, 2001
- TAHMASEBI, P.; FROUSHANI, S. M. A.; AHANGARAN, N. A. Thymol has beneficial effects on the experimental model of ulcerative colitis. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 9, n. 6, p. 538, 2019.
- TRAVIS, S.P.L.; STANGE, E.F.; LÉMANN, M.; ORESLAND, T.; BEMELMAN, W.A.; CHOWERS, Y.; COLOMBEL, J.F.; D'HAENS, G.; GHOSH, S.; MARTEAU, P.; KRUIS, W.; MORTENSEN, N. J.; PENNINGCKX, F.; GASSULL, M. European evidence-based consensus on the management of ulcerative colitis: current management. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 2 n. 1, p. 24-62, 2008.
- VALERO, M. S. et. al. *Jasonia glutinosa* (L.) DC., a traditional herbal medicine, reduces inflammation, oxidative stress and protects the intestinal barrier in a murine model of colitis. **Inflammopharmacology**, p. 1-18, 2019.
- VELOSO, F. T. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: Do they influence treatment and outcome? **World Journal Gastroenterology**. v. 17 n.22, p. 2702-2707, 2011.
- VERAS, M. L.; GUIMARÃES M. A.; CAMPELO Y. D.; VIEIRA M. M.; NASCIMENTO C.; LIMA D. F.; VASCONCELOS L.; NAKANO E.; KUCKELHAUS S. S.; BATISTA M. C.; LEITE J. R.; MORAES J. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 13, p. 2051-2058, 2012.
- VERAS. L. M. C; VERAS, L. M. C.; CUNHA, V. R. R.; LIMA, F. C. D. A.; GUIMARÃES, M. A.; VEIRA, M. M.; CAMPELO, Y. D. M.; SAKAI, V. Y.; LIMA, D. F.; CARVALHO JUNIOR, P. S.; ELLENA, J. A.; SILVA, P. R. P.; VASCONCELOS, L. C.; GODEJOHANN M.; PETRILLI, H. M.; CONSTANTINO, V. R. L.; MASCARENHAS, Y. P.; ALMEIDA, J. R. S. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1-11, 2013.
- VITAL, M. A. B. F.; ACCO, A. Agonistas e antagonistas colinérgicos. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 67-79.

YADAV, P. K.; LIU, Z. Current strategies for the treatment of ulcerative colitis. **Recent Patents on Inflammation Allergy Drug Discovery**, v. 3, p. 65-72, 2009.

WEISS, C. R. et al. The potential protective role of caveolin-1 in intestinal inflammation in TNBS-induced murine colitis. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. 119004, 2015.

WITAICENIS, A. **Estudo comparativo dos efeitos de esculetina, 4metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina no modelo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos**. Botucatu: Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2010

WINTERBOURN, C.C.; KETTLE, A.J.; Hampton, M.B. Reactive oxygen species and neutrophil function. **Annual review of biochemistry**, v. 85, p. 765–92, 2016.

WONG, E. H. J. et al. Comparative Genomics Revealed Multiple *Helicobacter pylori* Genes Associated with Biofilm Formation In Vitro. **Plos One**, v. 11, n. 11, p. 166-168, 2016.

WU, L. H. et al. Protective effect of anthocyanins extract from blueberry on TNBS-induced IBD model of mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

YANG, J. et al. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. **Trends in pharmacological sciences**, v. 35, n. 10, p. 493-500, 2014.

YIN, B. et al. Blocking TNF- $\alpha$  by combination of TNF- $\alpha$ - and TNFR-binding cyclic peptide ameliorates the severity of TNBS-induced colitis in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 656, n. 1-3, p. 119-24, 2011

ZAHAVI, I.; BURG, Z.; MARCUS, H.; KARMELI, F.; NUSINOVITZ, M.; DINARI, G. Therapeutic effect of colloid bismuth subcitrate in experimental colitis in the rat. **Digestion**, v. 56, p. 211-13, 1995.

ZHANG Z, ZHENG M, BINDAS J, SCHWARZENBERGER P, KOLLS JK. Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 12, n. 5, p. 382-8, 2006

## ANEXO

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



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



Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
Telefone (86) 3215-5734 \_e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "***Avaliação da participação do receptor muscarínico M1 na resposta anti-inflamatória da epiisopiloturina na colite ulcerativa experimental***", registrada nº **464/18**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. ANDRÉ LUIZ DOS REIS BARBOSA do Departamento de Fisioterapia do Campus Ministro Reis Veloso/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **15/06/2018**.

Finalidade	( ) Ensino ( ) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	<b>Junho/2018 à Março/2020</b>
Espécie/Linhagem/raça	<b>Camundongo heterogênico/swiss</b>
Nº de Animais	<b>312</b>
Peso/ Idade	<b>25-30g</b>
Sexo	<b>Fêmeas</b>
Origem	<b>Biotério Central da UFPI.</b>

Teresina, 15 de Junho de 2018.

  
**Pro<sup>fa</sup>. Ivete L. de Mendonça**  
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
 Coordenadora