



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

**TARCISIO VIEIRA DE BRITO**

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO POLISSACARÍDEO  
SULFATADO EXTRAÍDO DA ALGA MARINHA VERMELHA *Hypnea musciformis*  
DURANTE A COLITE INDUZIDA POR TNBS EM RATOS**

**PARNAÍBA-PI**

**2016**

**TARCISIO VIEIRA DE BRITO**

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO POLISSACARÍDEO  
SULFATADO EXTRAÍDO DA ALGA MARINHA VERMELHA *Hypnea musciformis*  
DURANTE A COLITE INDUZIDA POR TNBS EM RATOS**

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

Linha de pesquisa: Farmacologia Molecular

Orientador: Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.

**PARNAÍBA-PI**

**2016**

**TARCISIO VIEIRA DE BRITO**

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO POLISSACARÍDEO  
SULFATADO EXTRAÍDO DA ALGA MARINHA VERMELHA *Hypnea musciformis*  
DURANTE A COLITE INDUZIDA POR TNBS EM RATOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, Campus Parnaíba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, sob orientação do professor Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.

**Data da aprovação: 26 /02 /2016**

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa (orientador)  
Universidade Federal do Piauí

---

Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos  
(Examinador externo)  
Universidade Federal do Piauí

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Karina Oliveira Drumond  
(Examinadora externa)  
Universidade Federal do Piauí

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico este trabalho à minha  
esposa Letícia, pelo amor, dedicação  
e apoio nas minhas decisões e momentos mais difíceis.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiro e incontestavelmente ao magnífico DEUS de Israel, pela manutenção da minha integridade, saúde e força durante as batalhas conquistadas;

Aos meus pais Francinete e Francisco, pelo amor e ensinamento durante minha criação e pelo apoio nas lutas em busca dos meus objetivos;

À minha esposa Leticia Araujo, pelos inefáveis apoios, carinhos e conselhos iluminados que indubitavelmente servem de muralhas firmes nas batalhas diárias;

Aos meus irmãos Aurilene, Aurineide, Francisco, Maria e Fábio, pela estrutura familiar que formam, isto traz conforto e alegria nos momentos de aflição;

Aos alunos de iniciação científica José Simião e Genilson Júnior, pela enorme força e parceria nas bancadas laboratoriais durante as pesquisas deste trabalho;

Ao aluno de doutorado Renan Oliveira, pelo apoio e dedicação nos ensaios realizados em fortaleza;

Ao meu orientador PhD André Luiz, pela sabedoria e tranquilidade nas tomadas de decisões no que se refere ao andamento da pesquisa;

Aos professores chefes de laboratório Dr. Marcellus e Dr. Ronaldo, pelo carinho do acolhimento e conselhos durante a pesquisa;

A todo o grupo do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) em especial à técnica Vandinha, pela enorme atenção e inestimável apoio;

A todo o grupo do Laboratório de Fisiofarmacologia Experimental (LAFEX) e ao programa de pós-graduação em biotecnologia, pela contribuição na minha formação;

À coordenadora do mestrado Dra. Durcilene e sua secretária Selmira, pela disponibilidade e atenção privilegiada;

Ao CNPq pelo apoio financeiro demandado na execução deste trabalho.

**“A alegria de estar vivo me permite agradecer  
e tentar agradar a Deus sempre enquanto  
durar este milagre”**

Tarcisio Vieira de Brito

## RESUMO

**Introdução:** Polissacarídeos sulfatados compreendem um grupo de biopolímeros, heterogêneos e complexos oriundos da matriz extracelular de algas marinhas. O polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* tem sido bastante estudado devido às suas propriedades e características bioquímicas específicas, por isto este polissacarídeo possui alguns efeitos farmacológicos comprovados, dentre os quais se destaca sua ação anti-inflamatória. **Objetivo:** O presente trabalho teve como objetivo extrair, caracterizar e avaliar a ação anti-inflamatória do polissacarídeo sulfatado da *Hypnea musciformis* sobre os efeitos deletérios da colite induzida pelo ácido trinitrobenzeno sulfônico em ratos. **Métodos:** Neste estudo, o polissacarídeo foi extraído e caracterizado usando técnicas de microanálise elementar, cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de infravermelho. Para os estudos farmacológicos foram usados ratos Wistar machos pesando entre 150-200 g, sendo divididos em grupos de 5-7 animais. Em seguida os ratos foram tratados com o polissacarídeo sulfatado da *H. musciformis* nas doses de 10, 30 ou 60 mg/kg; logo em seguida a colite foi induzida usando o ácido trinitrobenzeno sulfônico a 50% em solução de etanol também a 50% v/v. Após três dias da indução da colite os animais foram eutanasiados e uma amostra de 5 cm do cólon foi retirada para avaliação dos escores macroscópicos e microscópicos de lesão, peso úmido e dosagens bioquímicas como: mieloperoxidase, interleucina 1 beta, fator de necrose tumoral alfa, glutathiona, ácido malonildialdeído e nitrato/nitrito. **Resultados:** A caracterização bioquímica do polissacarídeo da *H. musciformis* apresentou um polímero do tipo K-carragenina com peso molecular de  $1,24 \times 10^5$  g/mol. E o tratamento dos animais com este polissacarídeo na dose de 60 mg/kg demonstrou um padrão bastante satisfatório de redução da lesão intestinal, bem como uma diminuição do peso úmido. Além disto, o polissacarídeo em questão, mostrou uma redução significativa de todos os testes bioquímicos avaliados, especialmente os marcadores de migração de leucócitos como mieloperoxidase, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e marcadores de estresse oxidativo *in vivo* (ácido malonildialdeído, glutathiona e nitrato/nitrito). **Conclusão:** Os resultados apresentados neste estudo permitem concluir que a ação anti-inflamatória do polissacarídeo sulfatado da *H. musciformis* foi comprovada, revertendo de forma satisfatória os parâmetros deletérios da colite no modelo de doença inflamatória intestinal. Sugerindo, desta forma, uma forte relação deste polissacarídeo com a inibição do mecanismo de migração celular por mitigar o aporte de citocinas pró-inflamatórias e diminuir o estresse oxidativo nos locais da lesão. Isto permite sugerir este polissacarídeo como um potente candidato ao tratamento de pacientes com doença inflamatória intestinal.

**Palavras-chave:** Migração de neutrófilos. estresse oxidativo. colite ulcerativa. doença de Crohn. processo inflamatório.

## ABSTRACT

**Introduction:** Sulfated polysaccharides comprise a group of biopolymers heterogeneous and complex derived of the seaweed extracellular matrix. The sulfated polysaccharide of the red seaweed *Hypnea musciformis* have been extensively studied due to their biochemical properties and specific features, so this polysaccharide has some proven pharmacological effect, among which stands out its anti-inflammatory action. **Objective:** This study aimed to extract, characterize and evaluate the anti-inflammatory action of the sulfated polysaccharide of the *H. musciformis* against deleterious parameters of experimental colitis in rats. **Methods:** In this study, extraction and characterization of the polysaccharide used elemental microanalysis high-performance liquid chromatography and infrared spectrometry techniques. For pharmacological studies we used wistar males rats weighing (150-200 g) were divided into groups of 5-7 animals, then the animals were treated with the sulfated polysaccharide of *H. musciformis* at doses of 10, 30 or 60 mg/kg, then immediately colitis were induced using trinitrobenzenesulfonic acid 50% in ethanol solution also at 50% v/v. Three days after colitis induction, the animals was euthanized and a sample of 5 cm of colon were removed for assessment of macroscopic and microscopic scores, wet weight and biochemical measurements as myeloperoxidase, interleukin 1 beta, alpha tumor necrosis factor, glutathione, malonyldialdehyde acid and nitrate and nitrite. **Results:** Biochemical characterization of the polysaccharide of *H. musciformis* showed a type polymer K-carrageenan having a molecular weight of  $1.24 \times 10^5$  g / mol. The treatment of the animals with the sulfated polysaccharide *H. musciformis* at a dose of 60 mg/kg had a very satisfactory standard of reduction intestinal damage, as well as a reduction in wet weight, moreover the polysaccharide in question, showed a significant reduction of all biochemical test evaluated, with emphasis on neutrophil migration markers, pro-inflammatory cytokines and oxidative stress markers. **Conclusion:** The results this study allow we to conclude that the anti-inflammatory action of the sulfated polysaccharide from *H. musciformis* has been reproduced satisfactorily, unanimously reversing deleterious parameters of colitis in inflammatory bowel disease model. Thus suggesting a strong relationship of this polysaccharide in the inhibition of cell migration mechanism and mitigating the contribution of pro-inflammatory cytokine as well as reduce the oxidative stress in the lesion sites, this allows suggest that this polysaccharide as a potent candidate for the treatment of patients with inflammatory bowel disease.

**Keywords:** Neutrophil migration. oxidative stress. ulcerative colitis. Crohn's disease. inflammatory process.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ANOVA** – Análise de variância estatística;

**CD4** – Cluster de Diferenciação 4;

**CD8** – Cluster de Diferenciação 8;

**Cl<sup>-</sup>** - Cloreto;

**ClO<sup>-</sup>** - Hipoclorito;

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono;

**COBEA** – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;

**CXCL1** – Quimiocina com motivo de ligação C-X-C em ligante 1;

**DC** – Doença de Crohn;

**DEXA** – Dexametasona;

**DIIs** – Doenças Inflamatórias Intestinais;

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

**EDTA** – Ácido Etilenomino-tetracético;

**ELISA** – Ensaio Imunoabsorção enzimática;

**eNOS** – Óxido Nítrico Sintase endotelial;

**FT-IR** – Infravermelho com Transformada de Fourier.

**GRed** – Glutathione redutase;

**GSH** – Glutathione;

**GSSG** – Forma oxidada da glutathione;

**GST** – Glutathione S-transferase;

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio;

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – Ácido sulfúrico;

**H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>** – Ácido fosfórico;

**HNO<sub>3</sub>** – Ácido nítrico;

**HPLC** - Cromatografia Líquida de Alto Desempenho;

**HPSEC** - Cromatografia de alta eficiência de exclusão por dimensão;

**HTAB** – Tampão de Hexadeciltrimetilamônio;

**ICAM2** – Interleucina de adesão molecular 2;

**ICP** - Espectro por Arcos de plasma;

**ICP-OES** - Espectrometria de Emissão Óptica Indutivamente Acoplado com Plasma;

**IL-12** – Interleucina 12;

**IL-13** – Interleucina 13;

**IL-17** – Interleucina 17;

**IL-1 $\beta$**  – Interleucina 1 beta;

**IL-4** – Interleucina 4;

**IL-5** – Interleucina 5;

**IL-6** – Interleucina 6;

**iNOS** – Óxido Nítrico Sintase induzida;

**JAMs** – Moléculas de adesão juncional;

**KCl** – Cloreto de potássio;

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** – Fosfato de potássio monobásico;

**MDA** – Ácido Malonildialdeído;

**MPK** - Pico de Massa Molecular;

**MPO** – Mieloperoxidase;

**NaCl** – Cloreto de sódio;

**NADPH** – Nicotinamida dinucleotídeo fosfato;

**NaPO<sub>4</sub>** – Fosfato de sódio;

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

**NK** – Célula Natural Killer;

**nNOS** – Óxido Nítrico Sintase neuronal;

**NO** – Óxido Nítrico;

**NO<sub>2</sub>** – Nitrito;

**NO<sub>3</sub>** – Nitrato;

**O<sup>-</sup>** - Radical superóxido;

**OPD** – O-fenilediamina diidrocloreto;

**PBS** – Tampão Fosfato de Sódio;

**PCAM-1** – Molécula de adesão celular endotelial plaquetária;

**PGE2** – Prostaglandina E tipo 2;

**pH** – Potencial de hidrogênio iônico;

**PLS** – Polissacarídeo sulfatado;

**RNAm** – RNA mensageiro;

**ROS** – Espécies reativas de oxigênio;

**SAL** – Solução salina;

**TCA** – Ácido Tricloroacético;

**Th1** – Células T helper 1;

**Th17** – Células T helper 17;

**Th2** – Células T helper 2;

**TNBS** – Ácido Trinitrobenzeno sulfônico;

**TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral alfa;

**UC** – Colite Ulcerativa;

**UFPI** – Universidade Federal do Piauí;

**Ve** – Volume de eluição;

**VE-Caderina** – Caderina endotelial e vascular;

**KBr** – Brometo de Potássio.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	39
<b>Figura 2.</b> Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IV) do polissacarídeo <i>H. musciformis</i> em pastilhas de KBr.....	40
<b>Figura 3.</b> Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da <i>Hypnea musciformis</i> sobre os escores macroscópicos das lesões dos cólons de ratos com colite induzida por TNBS.....	42
<b>Figura 4.</b> Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da <i>Hypnea musciformis</i> sobre o peso úmido dos cólons de ratos com colite induzida por TNBS.....	44
<b>Figura 5.</b> Microfotografia representando o efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da <i>Hypnea musciformis</i> sobre a avaliação histológica do dano intestinal provocado pela colite induzida por TNBS em ratos.....	47
<b>Figura 6.</b> Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da <i>Hypnea musciformis</i> sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em tecido intestinal de ratos com colite induzida por TNBS.....	49
<b>Figura 7.</b> Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da <i>Hypnea musciformis</i> sobre os níveis intestinais de interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) de rato com colite induzida por TNBS.....	51
<b>Figura 8.</b> Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da <i>Hypnea musciformis</i> sobre os níveis intestinais de fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) de rato com colite induzida por TNBS.....	52
<b>Figura 9.</b> Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da <i>Hypnea musciformis</i> sobre concentração intestinal de glutathiona (GSH) em rato com colite induzida por TNBS.....	53
<b>Figura 10.</b> Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da <i>Hypnea musciformis</i> sobre a concentração do ácido malonildialdeído (MDA) em tecido intestinal de rato no modelo de colite induzida por TNBS.....	55

**Figura 11.** Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Hypnea musciformis* sobre os níveis de produto de degradação do óxido nítrico (NO), nitrato e nitrito (NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub>) em tecido intestinal de ratos com colite induzida por TNBS.....57

**Figura 12.** Mecanismo pró-inflamatório da colite induzida pelo ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) e possíveis alvos da ação do polissacarídeo sulfatado (PLS) da *H. musciformis*.....66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Avaliação dos escores macroscópicos das lesões intestinais de animais com colite induzida por TNBS.....	33
<b>Tabela 2.</b> Avaliação dos escores microscópicos das lesões intestinais de animais com colite induzida por TNBS.....	33
<b>Tabela 3.</b> Dados analíticos do polissacarídeo sulfatado da <i>Hypnea musciformis</i> ....	38
<b>Tabela 4.</b> Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da <i>Hypnea musciformis</i> sobre a avaliação histológica do dano intestinal provocado pela colite induzida por TNBS em ratos.....	46

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
2.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS.....	20
2.2 FISIOPATOLOGIA DA COLITE ULCERATIVA E DOENÇA DE CROHN .....	22
2.3 TERAPÊUTICA DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS .....	24
2.4 ALGAS MARINHAS VERMELHAS FONTES DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS .....	25
2.5 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS ...	26
2.6 POLISSACARÍDEO SULFATADO DA <i>Hypnea musciformis</i> .....	27
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	29
4.1 EXTRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO SULFATADO (PLS) DA <i>Hypnea</i> <i>musciformis</i> .....	29
4.2 MÉTODO GERAL PARA ANÁLISE QUÍMICA DO PLS .....	30
4.3 DISTRIBUIÇÃO DA MASSA MOLAR .....	30
4.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	31
4.5 ANIMAIS UTILIZADOS PARA OS PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS SUGERIDOS.....	31
4.6 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE DOENÇA DE CROHN EXPERIMENTAL... 31	
4.6.1 Modelo de DII induzido por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) .....	31
4.6.2 Avaliação dos escores macroscópicos e microscópicos de lesão .....	32
4.6.3 Avaliação do peso úmido dos colóns de animais com ou sem colite ....	33
4.7 ENSAIOS BIOQUÍMICOS .....	34
4.7.1 Ensaio de mieloperoxidase (MPO) .....	34
4.7.2 Dosagem de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .....	34
4.7.3 Análise dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa intestinal .....	35
4.7.4 Determinação de malonilaldeído (MDA) na mucosa intestinal.....	36
4.7.5 Determinação de NO <sub>3</sub> (nitrato) e NO <sub>2</sub> (nitrito) na mucosa intestinal.....	36
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>5 RESULTADOS</b> .....	37

5.1 ANÁLISE QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO SULFATADO DA <i>Hypnea musciformis</i> .....	37
5.2 EFEITO DO PLS DA <i>H. musciformis</i> SOBRE OS ESCORES MACROSCÓPICOS DE LESÃO.....	41
5.3 EFEITO DO PLS DA <i>H. musciformis</i> SOBRE O PESO ÚMIDO DO CÓLON.....	43
5.4 EFEITO DO PLS DA <i>H. musciformis</i> SOBRE OS CRITÉRIOS MICROSCÓPICOS DE LESÃO DURANTE A COLITE INDUZIDA POR TNBS.....	45
5.5 EFEITO DO PLS DA <i>H. musciformis</i> SOBRE A INFILTRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NO CÓLON - MIELOPEROXIDASE (MPO) .....	48
5.6 EFEITO DO PLS DA <i>H. musciformis</i> SOBRE OS NÍVEIS COLÔNICOS DE IL-1 $\beta$ E TNF- $\alpha$ .....	50
5.7 EFEITO DO PLS DA <i>H. musciformis</i> SOBRE OS NÍVEIS COLÔNICOS DE GLUTATIONA (GSH).....	53
5.8 EFEITO DO PLS DA <i>H. musciformis</i> SOBRE A CONCENTRAÇÃO COLÔNICA DE ÁCIDO MALONILDIALDEÍDO (MDA).....	54
5.9 EFEITO DO PLS DA <i>H. musciformis</i> SOBRE OS NÍVEIS COLÔNICOS DE NITRATO E NITRITO (NO <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub> ).....	56
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	58
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	67
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69
<b>ANEXOS</b> .....	81
ANEXO 1. CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ.....	82
ANEXO 2. COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA CARBOHYDRATE POLYMERS .....	83

## 1 INTRODUÇÃO

Algas marinhas geralmente possuem altas concentrações de polissacarídeos sulfatados com novas estruturas e diversas atividades biológicas devido à sua sobrevivência em ambientes marinhos específicos (WIJESKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011). Os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas possuem um grande potencial de aplicação em biologia e farmacologia (FERNANDEZ; ARATA; CIANCIA, 2014; USOV, 2011; WIJESINGHE; JEON, 2012). Por isso essas moléculas têm chamado a atenção específica. Elas são extraídas de algas marinhas vermelhas e marrons e compreendem um grupo intrínseco de biopolímeros altamente complexos e heterogêneos que ocorrem naturalmente na matriz extracelular desses organismos (POMIN; MOURÃO, 2008). Além disso, são caracterizados pela capacidade de parar ou alterar o curso de processos inflamatórios agudos e crônicos (BESEDNOVA et al., 2012).

Polissacarídeos sulfatados possuem uma vasta gama de ações biológicas comprovadas, tais como: antioxidante, antitumoral, imunomoduladora, anticoagulante, antiviral, antiprotozoária, antibacteriana, antilipidêmica e principalmente anti-inflamatória (ESCRIG; ORDONEZ; RUPEREZ, 2011). Além disto, estes biopolímeros possuem uma boa interação biológica e alta biodegradabilidade, por isso sugere-se que estas macromoléculas tenham uma baixa toxicidade ou mesmo nenhum efeito tóxico (CHUNG et al., 2010).

Neste contexto merece destaque o polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da alga vermelha *Hypnea musciformis*. Esta alga tem sido bastante estudada por sua abundância na costa de diversos países, incluindo o Brasil. Ela possui um potencial de alto rendimento na extração de polissacarídeos sulfatados, e estes são utilizados na fabricação de produtos alimentícios, conservantes e rações (FARIAS, 2014). Pesquisas recentes têm mostrado que o PLS extraído da *Hypnea musciformis* possui ações biológicas diversificadas, tais como: ação gastro protetora (DAMASCENO et al., 2013), antioxidante (ALVES et al., 2012) e anti-inflamatória (BRITO et al., 2012).

Condições inflamatórias que possuem muita significância clínica são as doenças inflamatórias intestinais (DIIs). As duas principais formas clinicamente definidas como doenças inflamatórias do intestino são a colite ulcerativa (UC) e a

doença de Crohn (DC). Estas doenças são remitentes, crônicas ou condições inflamatórias progressivas que podem afetar o cólon ou todo o trato gastrointestinal (HOLLANDER, 1988). São caracterizadas pela deficiência no sistema gastrointestinal acompanhada por resposta imune defeituosa da mucosa intestinal (BRITO et al., 2014; CREER et al., 1984).

A fisiopatologia das DIIs está associada principalmente à ativação inadequada do sistema imunitário intestinal e sistêmico, principalmente da ativação de células TCD4, com perfil Th1 e células Th17 que provocam uma reação de desequilíbrio entre as respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (AZIZA et al., 2008; WEBER; TURNER, 2007). Além disto, a produção e liberação de espécies reativas de oxigênio por estas células parecem desempenhar um papel crucial na fisiopatologia da colite (SANDS, 2007; SUZUKI et al., 1994).

Portadores de DIIs estão fadados a uma baixa qualidade de vida, baixo desempenho no trabalho bem como em todas as suas atividades diárias. Isto se dá devido às consequências fisiopatológicas e sintomáticas da doença. Os principais sintomas das DIIs são movimentos intestinais alterados, dor abdominal e inflamação crônica da parede do intestino (BRANDHORST et al., 2013). DIIs também estão associadas com a perda de peso, desnutrição, febre, e falta de apetite (CASTANEDA et al., 2013).

As DIIs ocorrem em todo o mundo e representam um sério problema de saúde, pois atingem preferencialmente pessoas jovens, possuem períodos de recidivas frequentes e exibem formas clínicas de alta gravidade (SOUZA et al., 2002). No hemisfério Norte a taxa de incidência é de 6-12 por 100.000 habitantes para a UC e 5-7 por 100.000 habitantes para a DC. Já no hemisfério Sul a incidência é menor, 2-8 por 100.00 habitantes para a UC e 0,1 a 4 por 100.000 habitantes para a DC. Além disto, estas doenças possuem uma incidência superior em povos judeus (RAPOSO, 2008).

Atualmente os fármacos usados para o tratamento das DIIs são: corticoides, imunossupressores e antibióticos. Destes os mais prescritos são as sulfassalazinas, antibióticos que possuem uma boa eficácia no tratamento das DIIs. Porém 90% das pessoas possuem algum tipo de intolerância a este fármaco, o que impossibilita o seu uso para o tratamento da maioria dos pacientes com DIIs (BIONDO-SIMÕES et al., 2003). Então, torna-se necessário a busca por compostos que possam atuar de

forma a diminuir os parâmetros inflamatórios destas doenças e possibilitar aos pacientes com DIIs um controle eficaz sem remissão da doença e por consequência uma boa qualidade de vida.

Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo extrair e caracterizar o polissacarídeo sulfatado (PLS) da alga vermelha *Hypnea musciformis*, bem como avaliar o efeito anti-inflamatório deste PLS no processo inflamatório intestinal da colite induzida pelo ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em ratos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

As doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs) são condições clínicas que compreendem principalmente dois subgrupos: colite ulcerativa (UC) e doença de Crohn (DC), que se distinguem por aspectos clínicos, endoscópicos e características patológicas minuciosas (WENDT; KESHAV, 2015).

A UC é uma condição inflamatória crônica do trato gastrointestinal humano, afetando principalmente o cólon e o reto. É uma doença intermitente, com períodos de sintomas exacerbados e fases relativamente sem sintomas. Problemas associados à UC incluem diarreia sanguinolenta, úlceras de cólon, perda de peso, e a longo prazo, aumento do risco de câncer de cólon e doenças desconhecidas. A UC afeta principalmente a mucosa de revestimento do cólon e do reto (XAVIER; PODOLSKY, 2007). A infiltração de polimorfonucleares é considerada como a lesão primária e central da colite, a qual é geralmente seguida pela perda do epitélio, perda de células caliciformes e dano da cripta (PILE et al., 2012).

Já a doença de Crohn é uma condição recorrente, inflamatória transmural que acomete a mucosa ou todas as camadas do intestino, podendo afetar todo o trato gastrointestinal da boca ao ânus. As suas manifestações clínicas resultam de uma infiltração substancial de leucócitos ativados para a mucosa intestinal tendo como consequência um processo inflamatório crônico (MARKS et al., 2010).

Os principais sintomas das DIIs incluem inflamação do cólon e dor abdominal, bem como outros sintomas como, sensação visceral alterada, dor, diarreia, sangramento retal, fraqueza e perda de peso (BEAUGERIE; SOKOL, 2012). Estes sintomas resultam da disfunção de células não imunes na parede do intestino, tais como células do músculo liso, neurônios entéricos e células epiteliais que regulam as funções de motilidade e de transporte (SHI; WINSTON; SARNA, 2011).

Atualmente, o diagnóstico da colite ulcerativa e da doença de Crohn e a diferenciação entre ambas são baseados em padrões clínicos e histológicos inespecíficos que são muitas vezes alterados por intercorrência infecciosa, eventos iatrogênicos ou alterados por medicamentos ou cirurgia (EVGENIKOS; STEPHEN, 1996). No entanto, marcadores sorológicos que incluem anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos estão presentes em aproximadamente 70% dos portadores de colite

ulcerativa e anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* em 50% dos portadores de doença de Crohn (RIGAUD et al. 1991; SAXON et al., 1990).

A incidência e prevalência da doença de Crohn (CD) e colite ulcerativa (UC), variam consideravelmente em todo o mundo. As maiores taxas de incidência e prevalência têm sido relatados na América do Norte e na Europa, com incidências tão elevadas como 20,2 casos por 100.000 habitantes para CD e 19,5 casos por 100.000 habitantes para UC (BERNSTEIN et al., 2006; COSNES et al., 2011) A prevalência de DII também varia dentro dos Estados Unidos e da Europa, com as taxas de prevalência mais baixas para ambos CD e UC nas regiões Sul, em comparação com a região Norte (SONNENBERG; WASSERMAN, 1991; KAPPELMAN et al., 2007; SHIVANANDA et al., 1996).

A incidência da UC aumentou em geral na Europa de 6 casos por 100.000 pessoas/ano para 9,8 por 100.000 pessoas/ano e a CD de 1 caso por 100.000 pessoas/ano para 6,3 casos por 100.000 pessoas/ano, de 1962 para 2010 (BURISCH, 2015). No Brasil, não há dados oficiais, visto que não são caracterizadas como doenças de cunho compulsório. Mas parece estar sendo mais frequentemente diagnosticada em serviços de gastropediatria. E estudos recentes apresentaram o aumento do número de casos no Sudeste do Brasil, mais especificamente no interior do Estado das Minas Gerais (GABURRI et al., 1998) e no hospital universitário localizado em Ribeirão Preto no Estado de São Paulo (SOUZA, et al., 2002). Estas doenças são mais comuns na raça branca, não diferem em relação ao sexo e são mais frequentes em adultos jovens de 20 a 40 anos. Considerando-se a população geral, 20% dos acometidos pelas doenças têm idade entre 10 e 20 anos e 3% estão abaixo de 10 anos (RODRIGUES, et al., 1996).

Inúmeros estudos, tais como os de Camelo et al. (2012), Puthoor e De Zoeten (2013), sugerem que as DIIs são resultado de uma resposta inflamatória inadequada a micróbios intestinais, geralmente inofensivos provenientes de microbiota em um hospedeiro geneticamente susceptível. Estímulos ambientais parecem ser capazes de desencadear uma reação imune anormal em pacientes geneticamente suscetíveis (MAYER, 2010). Alguns fatores podem estar implicados, como: aumento no consumo de açúcar, dieta pobre em fibras, conservantes alimentares e agentes infecciosos (SONNENBERG, 1986).

Muitos especialistas afirmam que as DIIs surgem da interação de quatro fatores fundamentais: ambiental (tabagismo, dieta, hábitos higiênicos), genético (existe uma ocorrência familiar e alguns genes como CARD15 que já estão identificados como estando implicados nas DIIs), microbiano (uma resposta anormal do sistema imunológico contra a microbiota intestinal); e, por fim, o imunológico (a resposta imunológica é a principal responsável pelo desenvolvimento da inflamação). Segundo Ferrari et al. (2012) nenhum destes fatores de forma isolada pode provocar a gênese da DII, no entanto, a interação entre eles pode desencadear a doença bem como de acordo como a natureza de cada fator, pode determinar a gravidade da condição inflamatória.

## 2.2 FISIOPATOLOGIA DA COLITE ULCERATIVA E DOENÇA DE CROHN

A inciciação da doença inflamatória intestinal se dá através da infiltração acentuada de células imunitárias inatas (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células *Natural Killer*) e células imunes adaptativas (células B e células T). O aumento do número e ativação dessas células na mucosa intestinal eleva os níveis locais de fator necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$ , interferon- $\gamma$ , e citocinas da via interleucina 23 (Th17), tornando uma inflamação mais acentuada (XU et al., 2014).

No cólon saudável, macrófagos intestinais podem ser encontrados na mucosa, próximo à membrana basal da camada epitelial. Na DII, o número de macrófagos está aumentado, indicando recrutamento para o intestino inflamado, levando a uma contribuição para os danos intestinais, ao liberar citocinas, radicais livres, e outros mediadores inflamatórios, tanto por fagocitar antígenos ou agindo como células apresentadoras de antígenos (STEVCEVA, 2001).

Os mastócitos estão distribuídos no tecido conjuntivo, em sua maioria na submucosa (PUTHOOR; DE ZOETEN, 2013). Eles agem pela degranulação e liberação de mediadores, como: serotonina, histamina, substância P, heparina e leucotrieno e por isso possuem uma significativa contribuição para a intensificação do processo inflamatório intestinal (SHI et al., 2011).

A DC é caracterizada por uma inflamação transmural e descontínua ocasionada pela ação de linfócitos T-*helper* (Th1/Th17), que produzem IL-6, IL-12 e IL-17. Enquanto na UC, ocorre um acometimento das camadas mucosa e

submucosa do cólon, mediado por linfócitos da subpopulação Th2 (MAYER, 2010; CAMELO et al., 2012; PUTHOOR; DE ZOETEN, 2013). Segundo Stevceva (2001), o número de linfócitos T está aumentado nas amostras de tecidos cólicos acometidos por DII, tendo uma predominância de linfócitos T CD8 na DC. Estes liberam grandes quantidades de IL-4, IL-5 e IL-13, capazes de induzir macrófagos, monócitos, neutrófilos, células T e células *natural Killer* (NK) a liberar TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6. (MAYER, 2010; CAMELO et al., 2012; PUTHOOR; DE ZOETEN, 2013).

Devido à constante exposição da mucosa intestinal a microrganismos e xenobióticos; no intestino normal, a IL-10 é a citocina anti-inflamatória responsável por manter o ambiente em equilíbrio por sua atividade supressora sobre as citocinas pró-inflamatórias (GLOCKER et al., 2009). Além de inibir citocinas do tipo Th1, como IL-2 e interferon- $\gamma$  (PAUL; KHARE; GASCHÉ, 2012). Quando esse equilíbrio é quebrado, os linfócitos e macrófagos ativados liberam mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e quimiocina ligante 1 (CXCL1). CXCL1 é um quimiotático de neutrófilos e indutor de inflamação, e sua expressão gênica está aumentada em pacientes com DII (SZALAI et al., 2014).

As citocinas pró-inflamatórias promovem reações do tipo hospedeiro em resposta a vários agentes nocivos, incluindo agentes microbianos (SZKARADKIEWICZ et al., 2009). Os altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ), são fatores preponderantes na colite ulcerativa, por promover a degradação da matriz de colágeno pelos fibroblastos intestinais, com consequente perda da integridade da mucosa e ulceração. A concentração dessas citocinas e a expressão dos RNAm correspondentes estão aumentados na mucosa cólica, fluidos intestinais, baço, soro de pacientes com UC.

Há uma correlação significativa entre a atividade dessas citocinas e a intensidade da colite (MACDONALD, MONTELEONE; PENDER, 2000). O TNF- $\alpha$  ativa leucócitos, inibe a apoptose de células inflamatórias, inibe a proliferação de células T ativas e aumenta a permeabilidade vascular. Pode causar inflamação direta e indiretamente ao promover a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias, pois regulam genes (NF-KB que controlam a expressão de citocinas, moléculas de adesão celular, moléculas imunorreguladoras e mediadores pró-inflamatórios).

O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  tem efeitos sinérgicos e parecem induzir um ao outro (BINGHAM, 2002). O TNF- $\alpha$  também participa da produção de óxido nítrico (NO) por

ativar a enzima óxido-nítrico sintase induzida (iNOS), que por sua vez promove mais inflamação que a IL-1 $\beta$  (TIAN et al., 2003). Esse conhecimento permitiu o uso de medicações anti-TNF- $\alpha$  para controle e remissão de formas moderadas e graves de DII (ENGEL; NEURATH, 2010).

As óxido-nítrico sintases neuronal e endotelial (nNOS e eNOS) são enzimas, presentes na mucosa gastrointestinal, que regulam a microvasculatura, a permeabilidade e manutenção da perfusão tecidual. Citocinas podem inibir a expressão de nNOS, aumentar a de iNOS, que por sua vez exerce atividade inflamatória pelo aumento da liberação de NO. O NO pode ser benéfico ou deletério a depender da sua concentração, duração e sítio de síntese. Na mucosa intestinal, em concentração aumentada, promove maior lesão tecidual, hipomotilidade e a proliferação bacteriana (PORRAS et al., 2006; SZALAI et al., 2014).

### 2.3 TERAPÊUTICA DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

Muitas drogas principalmente as anti-inflamatórias têm sido usadas para combater os sintomas das DIIs. Dentre a terapia de escolha para o tratamento podem-se incluir os corticoides. Estes agem na condição clínica como anti-inflamatórios, contudo seu efeito imunossupressor é usado como ação terapêutica nas DIIs, eles agem diminuindo a ação imunológica do organismo amenizando a resposta a agentes bacterianos, o que no caso das DIIs são da própria microbiota. Por se tratar de imunossupressores não se recomenda o uso contínuo de corticoide, pois eles podem provocar efeitos adversos muito significativos e até mesmo a recidiva da doença. Uma estratégia para reduzir o uso de corticoides é a Sulfassalazina, e outro método é o uso de anticorpos específicos anti-TNF- $\alpha$  e anti-NF-KB (BIONDO-SIMÕES, et al., 2003). O uso de talidomida reduz significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-12 (BAUDITZ; WEDEL; LOCHS, 2002).

IL-12 é uma citocina imunorreguladora com envolvimento central na indução da resposta imune celular. Um interessante estudo demonstrou que o anticorpo anti-IL-12 evitou a colite induzida em animais, sugerindo que esta citocina também tenha importante papel na patogênese das DIIs. A combinação da inibição do TNF- $\alpha$  e IL-12 pode explicar por que a talidomida é mais efetiva que outros inibidores seletivos de um único mecanismo inflamatório (BAUDITZ; WEDEL; LOCHS, 2002). Outra estratégia terapêutica é o uso do ácido 5-aminosalicílico, sua ação consiste no

bloqueio da produção de prostaglandinas e leucotrienos inibindo a liberação de peptídeos bacterianos que são capazes de induzir a migração de neutrófilos (PODOLSKY, 2002).

Até o momento os fármacos utilizados no tratamento das DIIs possuem muitos efeitos adversos e na maioria das vezes não aliviam a queixa principal, que é o desconforto abdominal acompanhado de muitas dores intestinais. Então, estratégias terapêuticas, principalmente as de origem natural, que possam melhorar este quadro clínico causando o mínimo de efeito adverso ao paciente, por consequência tendem a trazer melhor qualidade de vida para pessoas que sofrem de algum tipo de doença inflamatória intestinal. Frente a isso é justificável a verticalização desta pesquisa para substâncias naturais oriundas de algas marinhas, em evidência apontam-se os polissacarídeos sulfatados extraídos das algas marinhas vermelhas.

#### 2.4 ALGAS MARINHAS VERMELHAS FONTES DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

O Brasil possui uma enorme biodiversidade aquática, as algas marinhas são os organismos que melhor representam essa diversidade. Do total de 32.000 espécies conhecidas, pelo menos 820 táxons foram identificados ao longo da costa brasileira. Para sobreviver no ambiente aquático altamente competitivo, as algas marinhas têm desenvolvido estratégias de defesa que resultam em uma enorme diversidade de compostos produzidos através de diferentes vias metabólicas. Isto faz das algas marinhas, organismos promissores como fonte de novos compostos bioquimicamente ativos, além de compostos essenciais para a nutrição humana (SORIANO et al., 2011).

As macroalgas ocorrem em todo o globo e sendo a base da cadeia alimentar, servem como fonte de nutrientes para uma grande variedade de organismos aquáticos. Elas são os principais consumidores de nitrato e CO<sub>2</sub> e liberam uma grande quantidade de oxigênio para a atmosfera via fotossíntese. Conseqüentemente as algas desempenham um papel vital na manutenção do equilíbrio marinho e preservação da biodiversidade. Algas e produtos de algas também têm um impacto econômico em vários setores, como na aquicultura, na

indústria farmacêutica, nutracêutica, biomedicina, medicina veterinária e indústria de cosméticos (SORIANO et al., 2011).

As rodófitas ou algas vermelhas constituem o grupo com o maior número de espécies na costa brasileira. As rodófitas são quase exclusivamente macroscópicas, sendo organismos de portes médios ou grandes, possuem um conteúdo razoável de biomassa. Os produtos naturais de algas vermelhas caracterizam-se pela grande abundância de substâncias com atividade biológica (REPKA et al., 2004). Estes compostos estruturalmente bioativos são importantes fontes de novas substâncias. E relatos de diversos pesquisadores afirmam que as algas marinhas são fontes de compostos que exibem várias atividades biológicas relevantes (WIJESEKARA; KIM, 2010; WIJESEKARA; YOON; KIM, 2010).

Algas marinhas vermelhas biossintetizam principalmente polissacarídeos sulfatados (PLS), polímeros de açúcares complexos e heterogêneos constituídos de unidades repetitivas alternadas de  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) D-galactose e  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  3) D-galactose dotados de radicais sulfatos os quais são componentes da matriz extracelular e de grande aplicação em biotecnologia (ARAÚJO et al., 2008; FONSECA et al., 2008; CAMPO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009), sobretudo devido à sua biocompatibilidade e atoxidade (FARIAS, 2014).

## 2.5 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Polissacarídeos sulfatados compreendem um grupo de macromoléculas heterogêneas e complexas de origem não mamífera que são encontrados em concentrações elevadas na matriz extracelular e estão envolvidas em funções iônicas, mecânicas e osmóticas das algas marinhas (POMIN; MOURÃO, 2008). Recentemente, vários estudos têm-se centrado sobre estes polímeros que têm sido isolados a partir de diferentes espécies de algas, devido à sua grande aplicabilidade biomédica, farmacológica e toxicidade relativamente baixa (RODRIGUES et al., 2012).

São inúmeras as atividades biológicas descritas sobre polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas, a saber: ação antioxidante (SUDHARSANA et al., 2015); antinociceptiva (RODRIGUES et al., 2012; PEREIRA et al., 2014)); prevenção de danos gastrintestinais (SILVA et al., 2012); antibacteriana

(VIJAYABASKAR; VASEELA; THIRUMARAN, 2012); anticoagulante e antitrombótico (DOREA et al., 2013); antitumoral (Ye et al., 2008); antiangiogênica (CONG et al., 2016); antiviral (SYNYTSYA et al., 2014); imunomodulatória (KIM; JOO, 2008); anti-inflamatória (BATISTA et al., 2014); anticolite (BRITO et al., 2014) etc. Isto prova a vastidão de atividades biológicas as quais os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas são capazes de realizar.

## 2.6 POLISSACARÍDEO SULFATADO DA *Hypnea musciformis*

A *Hypnea musciformis* é uma alga vermelha da família das rodófitas, habita ambientes marinhos rasos de mares tropicais e subtropicais, podendo ser encontrada no Senegal, Vietnã, EUA, Filipinas, Índia, Bangladesh, Bahamas e Brasil (GANESAN; THIRUPPATHI; BRAVANATH, 2006). A *H. musciformis* é um recurso importante para o Brasil, pois é bastante utilizada na indústria de ficocoloides (BRAVIN; YONESHIQUE, 2002). A espécie é considerada uma alga resistente, principalmente devido a sua tolerância a amplas faixas de temperatura da água, salinidade e intensidade de luz (GANESAN; THIRUPPATHI; BRAVANATH, 2006). Esta alga sintetiza elevadas concentrações de polissacarídeos sulfatados, compostos principalmente por resíduos alternados  $\beta$ -D-galactose e  $\alpha$ -D-galactose. Este polissacarídeo da *H. musciformis* tem sido relatado como sendo uma  $\kappa$ -carragenina, biopolímero da família das carrageninas que tem um grupo sulfato no carbono 4 no resíduo  $\beta$ -D-galactose e uma ponte de 3,6-anidro em  $\alpha$ -D-galactose (CREER et al., 1984; AZIZA et al., 2008). A referida estrutura confere a este polissacarídeo boa propriedade reológica e característica farmacológica como: ação antioxidante (Alves et al., 2012); anti-lesão gástrica (DAMASCENO et al., 2013) e sobretudo ação anti-inflamatória (BRITO et al., 2013).

Diante dos problemas e consequências apresentados em pacientes com doenças inflamatórias intestinais e tendo em vista as ações farmacológicas atribuídas ao polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha *Hypnea musciformis* principalmente ação anti-inflamatória, torna-se viável a extração e caracterização deste PLS, bem com a avaliação do seu efeito anti-inflamatório sobre os parâmetros pró-inflamatórios e deletérios da colite induzida por TNBS em ratos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Extrair, caracterizar e avaliar o efeito anti-inflamatório do polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* durante a colite induzida por TNBS em ratos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Extrair e caracterizar estruturalmente o polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*;
- ✓ Avaliar a atividade do polissacarídeo sulfatado da *Hypnea musciformis* sobre os critérios macroscópicos, microscópicos e sobre o peso úmido do cólon de ratos com colite induzida por TNBS;
- ✓ Avaliar o efeito do polissacarídeo sulfatado da *Hypnea musciformis* sobre a concentração de MPO no cólon de ratos com colite induzida por TNBS;
- ✓ Avaliar a ação do polissacarídeo sulfatado da *Hypnea musciformis* sobre os níveis colônicos de MDA e GSH de ratos com colite induzida por TNBS;
- ✓ Verificar o papel do polissacarídeo sulfatado da *Hypnea musciformis* sobre a produção e liberação de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  na mucosa do cólon de ratos com colite induzida por TNBS;
- ✓ Determinar os níveis de nitrato e nitrito na mucosa do cólon de animais com colite induzida por TNBS e tratados com do polissacarídeo sulfatado da *Hypnea musciformis*.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 EXTRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO SULFATADO (PLS) DA *Hypnea musciformis*

A extração do polissacarídeo sulfatado da *H. musciformis* foi realizada no Laboratório de Bioquímica das Algas Marinhas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. A alga marinha vermelha *H. musciformis* foi coletada na praia de Flecheiras, Trairí, Ceará, Brasil, na seguinte localização geográfica: 03° 13' 25" sul e 39° 16' 65" oeste. A amostra foi identificada com a ajuda de um professor do Instituto de Ciências Marinhas da Universidade Federal do Ceará e a espécime foi depositada no herbário do Instituto de Ficologia de Ciência do Mar na Universidade Federal do Ceará – Fortaleza - CE, Brasil (exsicar Nº 2165). As amostras foram limpas de epífitas, lavadas com água destilada e armazenadas a -20 °C. Os polissacarídeos sulfatados foram extraídos tal como descrito posteriormente (FARIAS et al., 2000).

O tecido seco (5 g) foi cortado em pedaços pequenos, suspenso em 250 ml de tampão 0,1 M de acetato de sódio (pH 6,0) contendo 510 mg de papaína (E. Merck, Darmstadt, Alemanha), 5 mM de EDTA, e 5 mM de cisteína, e incubado a 60°C durante 24 h. A mistura de incubação foi então filtrada e o sobrenadante foi guardado. O resíduo foi lavado com 138 ml de água destilada, filtrou-se novamente e os dois sobrenadantes foram juntados. Os polissacarídeos sulfatados em solução foram precipitados com 16 ml de solução de cloreto de cetilpiridínio a 10%. Depois de repousar à temperatura ambiente durante 24 h, a mistura foi centrifugada a 4781 rpm, durante 20 min, a 5°C. Os polissacarídeos sulfatados no pellet foram lavados com 610 ml de solução de cloreto de cetilpiridínio a 0,05% e dissolvidos com 172 ml de NaCl a 2M, solução de etanol (100:15, v/v), e precipitado com 305 ml de etanol absoluto. Após 24 h a 4°C, o precipitado foi recolhido por centrifugação (4781 rpm durante 20 min a 5°C), lavado duas vezes com 305 ml de etanol a 80%, e uma vez com o mesmo volume de etanol absoluto. O precipitado final foi secado a 60°C durante a noite e 200 mg de polissacarídeo em peso seco bruto foi obtido após estes procedimentos.

## 4.2 MÉTODO GERAL PARA ANÁLISE QUÍMICA DO PLS

O conteúdo total de açúcar foi determinado pela técnica de UV em ácido sulfúrico (ALBALASMEH et al., 2013), utilizando D-galactose como padrão. O teor de nitrogênio e de carbono foram determinados por microanálise elementar utilizando o equipamento da marca Perkin Elmer, modelo 2400 Series II CHNS/O. O teor de proteína foi calculado a partir da porcentagem de nitrogênio (N%) usando o fator de correção de 6,25, conforme proposto por Marks, Buchsbaum e Swain (1985). O teor de sulfato no polissacarídeo foi determinado por Espectrometria de Emissão Óptica Indutivamente Acoplado com Plasma (ICP-OES). Neste método, 12 mg de polissacarídeo foram digeridos em 3 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado a 70 °C durante 1 h. Após digestão e arrefecimento da solução, o volume foi ajustado para 50 mL e o teor de enxofre foi medido usando um espectrômetro de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente (ICP-Espectro por Arcos de plasma) em 180,731 nm (KRUG, 2010).

## 4.3 DISTRIBUIÇÃO DA MASSA MOLAR

Para estimar o pico de massa molecular (MPK) do PLS foi usada uma cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), realizada num sistema de Shimadzu equipado com um detector de índice de refração (Modelo RID-10A) à temperatura ambiente utilizando uma coluna de ultra hidrogel linear (7,8 x 300 mm), a uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min, com uma solução de polissacarídeo de 0,5%, usando como solvente e eluente o NaNO<sub>3</sub> a 0,1 M. Uma curva de calibração foi obtida usando um padrão pullulans (Shodex Denko) de diferentes pesos moleculares que variam de 103 para 106 g/mol. A equação obtida a partir deste gráfico de calibração foi:

$$\text{Log Mw} = 14,6827 - 1,06967V_e \quad (1)$$

Onde  $V_e$  representa o volume de eluição em mL. O coeficiente de correlação linear foi de 0,99.

#### 4.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) do PLS foram registados com um espectrofotómetro Shimadzu IR (modelo 8300) de varredura entre 400 e 4000 cm. As amostras foram analisadas como pastilhas de KBr.

#### 4.5 ANIMAIS UTILIZADOS PARA OS PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS SUGERIDOS

Foram realizadas duas rodadas de experimentos, usando 36 animais cada rodada. Sendo utilizado um total de 72 ratos wistar machos, pesando 150 - 200 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os ratos foram mantidos com água e alimentação *ad libitum* no Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Piauí. Doze a quatorze horas antes, em todos os experimentos, os animais foram colocados em jejum, mas com livre acesso à água. Todos os tratamentos e procedimentos cirúrgicos realizados estavam de acordo com o “Guia de cuidados em uso de animais de laboratório” do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Piauí – UFPI sob o protocolo de número: 011/15.

#### 4.6 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE DOENÇA DE CROHN EXPERIMENTAL

##### 4.6.1 Modelo de DII induzido por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS)

Inicialmente, os ratos passaram por um processo de preparação do cólon. Os animais permaneceram 12 a 14 h recebendo somente água *ad libitum*. Posteriormente, foram submetidos à limpeza do cólon por enema com 20 ml de solução salina a 0,9%. Uma hora antes da indução da colite os ratos foram divididos em seis grupos (5-7 animais por grupo). Quatro destes seis grupos foram tratados da seguinte forma: dexametasona (1 mg/kg) por via sub cutânea (s.c.); PLS 10 mg/kg por via oral (v.o); PLS 30 mg/kg (v.o); PLS 60 mg/kg (v.o). A colite foi induzida pela administração por via intra-anal de TNBS (20mg) diluído em etanol a 50%,

sendo esta solução administrada num volume de 0,8 ml por animal. Todos os grupos tratados anteriormente foram submetidos à indução da colite por TNBS. O grupo controle (TNBS) recebeu somente TNBS por via Intra-anal e o grupo salina recebeu somente uma solução fisiológica a 0,9%, num volume de 0,8 ml também intra-anal. Para a indução da colite os ratos foram previamente anestesiados com quetamina (75 mg/kg) e posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi introduzido, por via retal, um cateter de polietileno nº 6 medindo 8 cm de comprimento para a administração das soluções de TNBS ou salina. Cada animal permaneceu suspenso pela cauda por 30 segundos para evitar o retorno das soluções. Os tratamentos com o polissacarídeo sulfatado nas doses de (10, 30 e 60 mg/kg) ou dexametasona (1 mg/kg) foram feitos antes e uma vez ao dia durante três dias após a indução da colite por TNBS. No terceiro dia, uma hora após o último tratamento os ratos foram eutanasiados, suas cavidades abdominais foram abertas e foi retirada uma porção de 5 cm do cólon de cada animal. Então foram avaliados os parâmetros macroscópicos, peso úmido e em seguida o tecido foi dividido e estocado em amostras para se realizar posteriormente os seguintes ensaios: dosagens de mieloperoxidase (MPO), glutathiona (GSH), ácido malonildialdeído (MDA), IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e nitrato e nitrito (NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub>).

#### 4.6.2 Avaliação dos escores macroscópicos e microscópicos de lesão

Os ratos foram eutanasiados três dias após a indução das colites. Em seguida, foi feita uma incisão mediana com abertura na cavidade peritoneal. Após a identificação do reto e cólon, foi isolada uma extensão de 5 cm do cólon dos animais. A peça foi aberta longitudinalmente, lavada com soro fisiológico e distendida sobre uma superfície plana para uma avaliação do escore macroscópico seguindo a técnica descrita por Morris et al., em 1989 conforme mostrado na Tabela 1. Depois disso, fragmentos da mesma peça foram processados segundo técnicas histológicas de rotina e corados com hematoxilina e eosina para a avaliação de escores microscópicos seguindo a técnica descrita por Appleyard e Wallace em 1995, conforme mostrado na Tabela 2.

#### 4.6.3 Avaliação do peso úmido dos colóns de animais com ou sem colite

Após a análise macroscópica dos escores de lesão dos colóns de ratos com e sem colite e tratados com o polissacarídeo sulfatado nas doses de (10, 30 e 60 mg/kg) ou com dexametasona (1 mg/kg) foram retirados fragmentos de cólon medindo 5 cm de comprimento cada. Posteriormente, foi feita a pesagem desses fragmentos e os resultados foram expressos como peso úmido de 5 cm de cólon.

**Tabela 1. Avaliação dos escores macroscópicos das lesões intestinais de animais com colite induzida por TNBS.**

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

Fonte: Morris, 1989. Adaptado.

**Tabela 2. Avaliação dos escores microscópicos das lesões intestinais de animais com colite induzida por TNBS.**

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 em 1995. Modificado

## 4.7 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

### 4.7.1 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

Para a avaliação da atividade da MPO em ratos com e sem colite, frações do cólon foram retiradas e processadas. A análise dessa enzima seguiu-se de acordo com o protocolo estabelecido por Bradley et al. (1982).

A MPO é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador qualitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos. Para mensurar a concentração desta enzima, 50 a 100 mg de cólon de ratos com e sem colite e tratados ou não com o PLS da *H. musciformis* (10, 30 e 60 mg/kg), foram colocados em tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Posteriormente, foram maceradas em um macerador Polytron (13000 rpm) e centrifugadas durante 15 minutos a 3000 rpm em uma centrífuga refrigerada (4°C). Logo em seguida, o sobrenadante foi pipetado numa placa (10µl), e foram acrescentados 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>). Na sequência a placa foi lida em um leitor de ELISA a 450nm. O resultado foi expresso em UMPO/mg de tecido.

### 4.7.2 Dosagem de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$

Para dosagem de TNF-  $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , fragmentos do cólon de animais foram retirados e adicionados em um tampão inibidor de protease (500 µL 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 2 µg/ml de anticorpo de captura (DuoSet - DY501) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2), 100 µL por poço por 24 horas a 4 °C. A placa foi lavada com PBS -Tween 20 a 0,1%. A reação foi bloqueada com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 µL 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 $\beta$ ) diluídas em tampão de lavagem e com as amostras de tecido do intestino a serem dosadas, 100 µL por poço por 24 horas a 4 °C. A placa foi novamente lavada e depois incubada

com o anticorpo biotilado diluído de 1:1000 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 (SIGMA ALDRICH - A7419) diluída de 1:5000 em tampão de lavagem, 100 µL por poço por 15 minutos à temperatura ambiente. A placa foi então lavada e incubada com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão, 100 µL por poço, no escuro à temperatura ambiente por um período que varia de 5 a 20 minutos dependendo da citocina. A reação foi parada com 150 µL por poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro a 490 nm e os resultados foram expressos como média ± erro da quantidade de TNF-α, IL-1β em pg/ml (TAVARES-MURTA et al., 2008).

#### 4.7.3 Análise dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa intestinal

Após a eutanásia dos animais (terceiro dia após a indução da colite), fragmentos do cólon dos ratos foram retirados para a análise dos níveis de glutathiona na mucosa intestinal.

A glutathiona reduzida é um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína, existente em praticamente todas as células de mamíferos. Ela exibe um grande número de funções essenciais para a célula, incluindo transporte de aminoácidos, catálise enzimática e proteção contra os efeitos deletérios de radicais livres endógenos e metabólitos tóxicos (MEISTER, 1991).

O método de Sedlak e Lindsay (1968) foi utilizado para análise de glutathiona nas amostras. Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos, uma amostra de 50 a 100 mg da mucosa intestinal de cada animal foi homogeneizada em EDTA 0.02 M, seguindo a proporção de 1:10, ou seja, para cada 100 mg de tecido usou-se 1 ml de EDTA. Alíquotas de 400 µL do homogenato foram misturadas a 320 µL de água destilada e a 80 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4º C. A um total de 400 µL do sobrenadante foi adicionado 800 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20 µL de DTNB (reagente de Ellman) 0,01 M. A mistura foi então agitada por três minutos e cada amostra foi lida no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 412 nm. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em µg de GSH/g de tecido.

#### 4.7.4 Determinação de malonilaldeído (MDA) na mucosa intestinal

Após a eutanásia, frações do colon dos ratos foram retiradas para a análise dos níveis de MDA na mucosa intestinal.

Os níveis de malondialdeído na mucosa intestinal foram determinados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978). As amostras de tecido foram homogeneizadas em cloreto de potássio (KCl) na proporção de 100 mg de tecido para 1 ml de KCl a 0,15 M, em seguida foram retirados 250  $\mu$ L do homogenato e acrescentado 1,5 ml de  $H_3PO_4$  (1%) e 0,5 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0,6%). Os tubos foram aquecidos por 45 minutos em banho-maria e a mistura reacional foi então resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 2 ml de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 1 min. com um misturador "vortex" e depois centrifugados a 1200 rpm por 15 minutos, a fase butanólica de cada amostra foi lida em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda simultâneos: 520 e 535nm. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g de tecido.

#### 4.7.5 Determinação de $NO_3$ (nitrato) e $NO_2$ (nitrito) na mucosa intestinal

Para a determinação das concentrações colônicas de nitrato e nitrito foi usado o método de Griess. Inicialmente foi preparada uma solução de 0,5 U/ml de nitrato redutase (Sigma) em um tampão  $KH_2PO_4$  contendo NADPH. Para o preparo da reação de Griess, foi armazenada separadamente a 4°C em frascos de vidro e protegidos da luz, uma solução contendo sulfanilamida a 1% em  $H_3PO_4$  a 2,5% e outra solução de NEED a 0,1% em  $H_3PO_4$  a 2,5%. Depois de preparadas as soluções, as amostras processadas de tecido colônico de animais com e sem colite e tratados com o PLS da *H muciformis* (10, 30 e 60 mg/kg) ou com dexametasona (1 mg/kg) foram incubadas numa microplaca com nitrato redutase (16  $\mu$ L por poço) durante 12 h para a conversão de  $NO_3$  (nitrato) em  $NO_2$  (nitrito). O produto da degradação do óxido nítrico foi determinado medindo as concentrações de nitrito em um leitor de placas de ELISA a 540 nm, utilizando o método de Griess (GREEN et al., 1982). Os resultados foram expressos como micromoles ( $\mu$ M) de nitrito.

## 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dos dados quantitativos foram calculadas as médias  $\pm$  erro de certo número de eventos ( $n = 5-7$  animal) em cada grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias foi feita pelo teste de Bonferroni. Dos dados qualitativos foram calculadas as médias  $\pm$  erro de certo número de eventos ( $n = 5-7$  animal) em cada grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Dunns. Uma diferença de  $p < 0,05$  foi considerada estatisticamente significativa.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO SULFATADO DA *Hypnea musciformis*

Os dados analíticos do polissacarídeo da *Hypnea musciformis* estão descritos na Tabela 3. A partir de uma solução de 1,0 mg/ml de PLS (dissolvido em água destilada) foi detectada  $1,0 \pm 0,04$  mg/ml de hidratos de carbono solúveis totais pelo método UV/ácido sulfúrico (BALASMEH; BERHE; GHEZZEHEI, 2013). A homogeneidade do polissacarídeo foi confirmada por microanálises elementares, que mostrou um teor de azoto de  $0,16 \pm 0,03\%$ , que corresponde a  $1,00 \pm 0,18\%$  de resíduos de proteínas. Estes resultados indicam que o procedimento utilizado para isolar e extrair o PLS foi adequado para se obter um composto livre de moléculas indesejáveis que poderiam interferir nas experiências subsequentes. O grau de substituição para o sulfato (DS) do PLS foi de  $0,88 \pm 0,02$ , calculado com base em Melo et al. (2002), de acordo com a Eq. (1). A equação proposta baseia-se na estrutura de carragenina, considerando-se que o DS sulfato é definidos pelo número de átomos de enxofre ou  $\text{OSO}_3^-$  por unidade de repetição de dissacarídeo, que possuem 12 átomos de carbono. Este resultado sugere a presença de quase um grupo sulfato por unidade de dissacarídeo, característica de  $\kappa$ -carragenina (COSENZA et al., 2014; KRAVCHENKO et al., 2014; CAMPO; KAWANO; DA SILVA JR; CARVALHO, 2009;).

$$DS = (\%S/\text{massa atômica do S})/(\%C/\text{massa atômica do C} \times 12) = 4.5 (S\% / C\%) \text{ Eq. (1)}$$

**Tabela 3. Dados analíticos do polissacarídeo sulfatado da *Hypnea musciformis*.** Conteúdo químico do polissacarídeo sulfatado extraído da *H. musciformis*, S (%), porcentagem de enxofre; C (%), porcentagem de carbono; N (%), porcentagem de nitrogênio, DS sulfato (%), grau de substituição para sulfato.

Dados analíticos	Conteúdo
S (%) <sup>a</sup>	5,08 ± 0,07
C (%) <sup>a</sup>	25,98 ± 0,29
N (%) <sup>a</sup>	0,16 ± 0,03
DS sulfato (%) <sup>b</sup>	0,88 ± 0,02
Proteína (%) <sup>c</sup>	1,00 ± 0,18
Total de carboidratos (%) <sup>d</sup>	100 ± 4,00

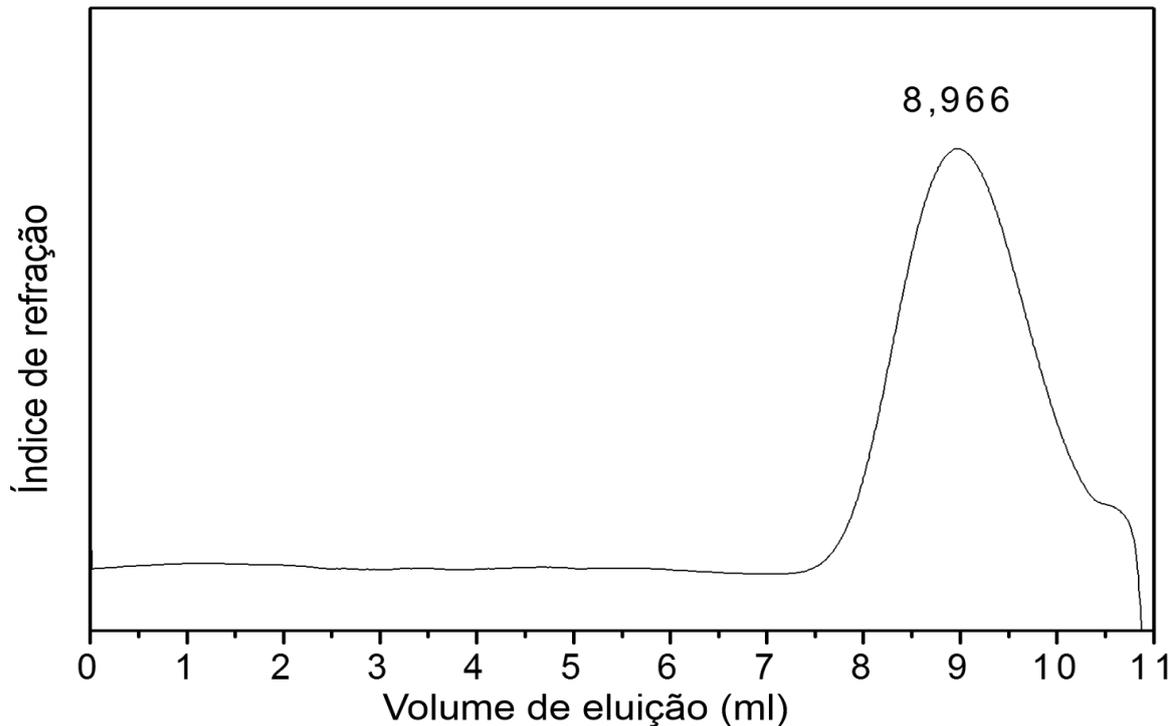
a Determinado por microanálise elementar.

b Obtido a partir da equação 1

c Determinado por microanálise elementar utilizando o fator de correlação 6,25.

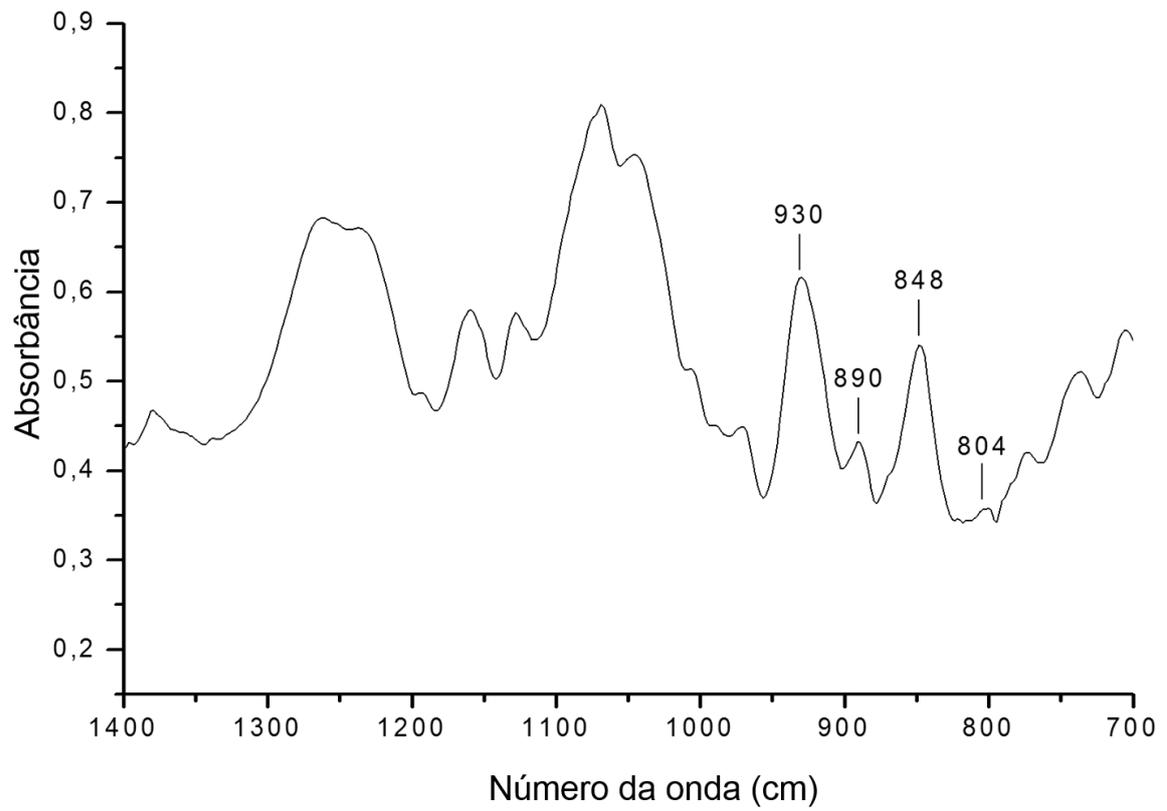
d Determinado pelo UV / ácido sulfúrico (BALASMEH, BERHE, GHEZZEHEI, 2013).

A distribuição da massa molar do polissacarídeo sulfatado da *Hypnea musciformis* (PLS) foi estimada por cromatografia de alta eficiência de exclusão por dimensão (HPSEC). O cromatograma HPSEC do PLS (Figura 1) mostrou um único pico estreito e em 8,97 ml, correspondendo a um MPK de  $1,24 \times 10^5$  g/mol. Alto peso molecular, tal como o aqui descrito, que é comum para carrageninas (POMIN, 2010; CAMPO; KAWANO; DA SILVA JR; CARVALHO, 2009).



**Figura 1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).** Cromatograma do polissacarídeo da *H. musciformis* a 0,5% em coluna de ultrahidrogel a 25°C usando  $\text{NaNO}_3$  a 0,1 mol/L, como eluente a um fluxo de 0,5 ml/min. Volume de eluição corrigido para 8.97.

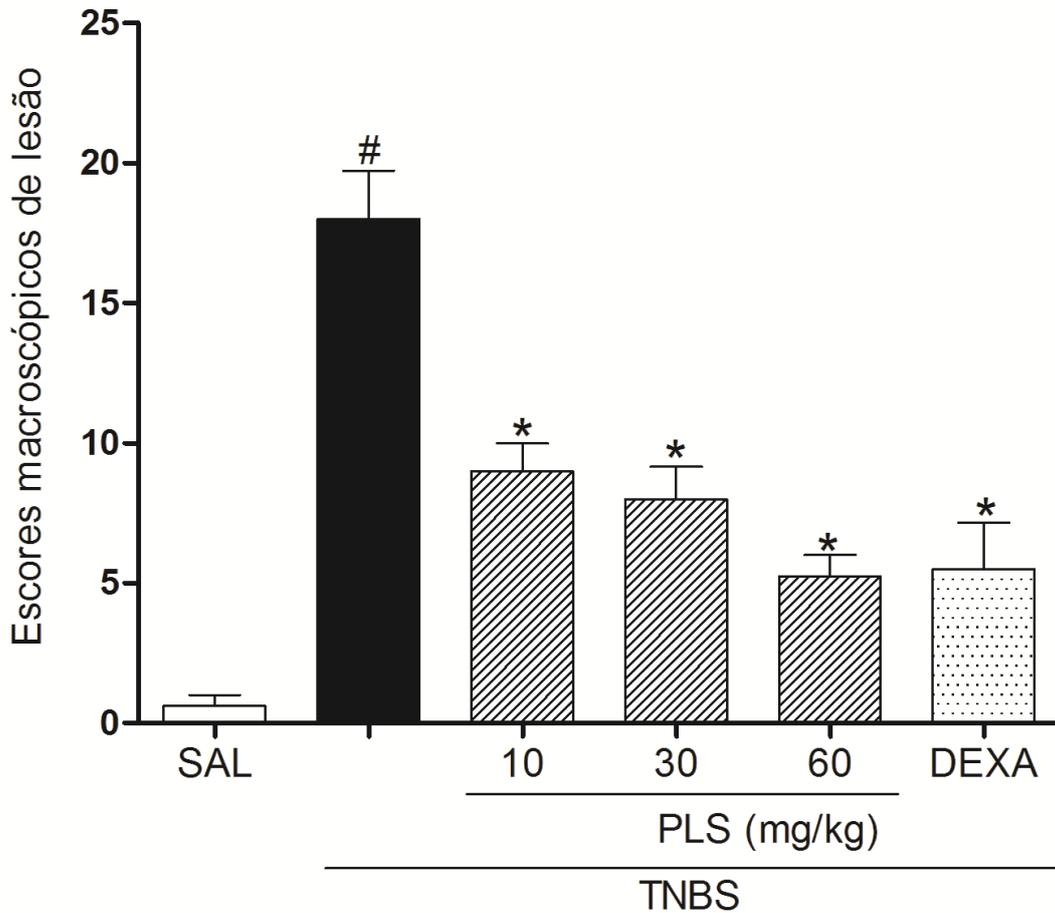
Para análise espectroscópica do PLS da *H. musciformis* foi usada a técnica de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IV) para analisar a estrutura química do PLS. O espectro de IV do PLS (Figura 2) mostrou bandas largas em 1230 e 1261  $\text{cm}^{-1}$ , característica dos grupos éster de sulfato (VILLANUEVA; MONTANO, 2003; KRAVCHENKO et al., 2014). O modo esquelético de galactanas foi atribuído ao sinal em 1068  $\text{cm}^{-1}$  (BARROS et al., 2013; SEKKAL; LEGRAND, 1993). A posição dos grupos sulfatos pode ser inferida pelas bandas de 800 a 850  $\text{cm}^{-1}$ . Sinais intensos a 930  $\text{cm}^{-1}$  e 848  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídos a 3,6-anidrogalactopiranosose (DA-unidades) e de galactose-4-sulfato (G4S-unidades) respectivamente, indicando a presença de  $\kappa$ -carragenina. Uma banda baixa intensa em 804  $\text{cm}^{-1}$ , descrito por um grupo sulfato na posição C-2 de 3,6-anidroglicopiranosose (DA2S-unidades), foi sugestiva de uma pequena quantidade de  $\iota$ -carragenina, no entanto não foram encontradas específicas para  $\lambda$ -carragenina. (KRAVCHENKO et al., 2014; ARMAN; QADER, 2012; VILLANUEVA; MONTANO, 2003).



**Figura 2. Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IV) do polissacarídeo *H. musciformis* em pastilhas de KBr. Números de onda variam de 1400 a 700 cm.**

## 5.2 EFEITO DO PLS DA *H. musciformis* SOBRE OS ESCORES MACROSCÓPICOS DE LESÃO

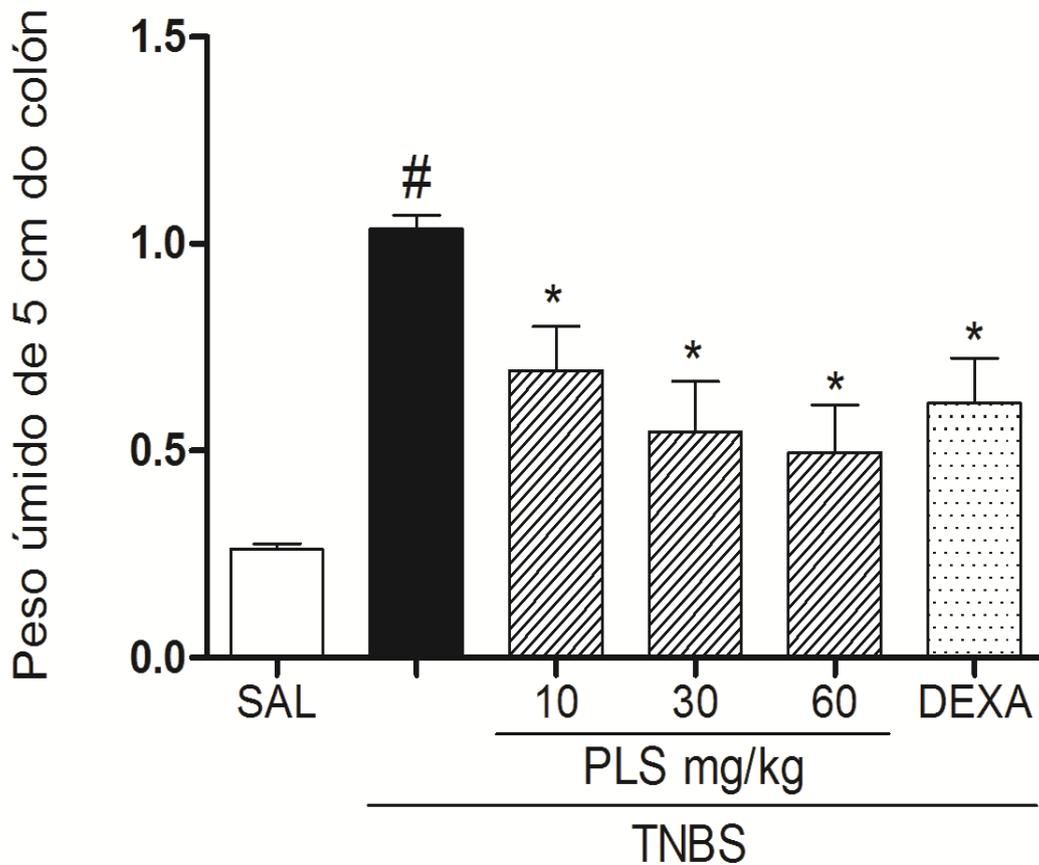
Conforme mostrado na Figura 3, os ratos do grupo controle (TNBS) apresentaram lesões intestinais com média máxima de escores ( $18,00 \pm 1,732$ ), enquanto o grupo salina, como era esperado, apresentou média muito baixa de escores ( $0,600 \pm 0,400$ ). O tratamento dos ratos com PLS da *H. musciformis* apresentou os seguintes resultados em média de escores: dose de 10 mg/kg ( $9,000 \pm 1,000$ ); dose de 30 mg/kg ( $8,000 \pm 1,155$ ); dose de 60 mg/kg ( $5,250 \pm 0,750$ ). Esta última dose reduziu de forma significativa a média de escores de lesão comparada ao grupo controle (TNBS), com ( $p < 0,05$ ), sendo considerada a dose de 60 mg/kg a que apresentou um melhor resultado quando comparada aos outros grupos que receberam o PLS da *H. musciformis*. Além disto, o tratamento com dexametasona também reduziu a média de escores macroscópicos ( $5,500 \pm 1,658$ ) de forma estatisticamente significativa com ( $P < 0,05$ ).



**Figura 3. Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Hypnea musciformis* sobre os escores macroscópicos das lesões dos cólons de ratos com colite induzida por TNBS.** Os ratos foram tratados com PLS (10, 30 e 60 mg/kg, v.o) ou dexametasona (DEXA, s.c) (1 mg/kg) uma vez por dia, durante três dias após a indução da colite. No terceiro dia, os ratos foram eutanasiados e os abdômens foram abertos. Após a identificação do intestino, amostras de tecido (5 cm) foram recolhidas para avaliação dos escores macroscópicos de lesão. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro de 5-7 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  vs grupo TNBS; # $P < 0,05$  vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

### 5.3 EFEITO DO PLS DA *H. musciformis* SOBRE O PESO ÚMIDO DO CÓLON

Após as pesagens dos fragmentos do cólon de cada animal observou-se o aumento significativo do peso úmido dos cólons dos ratos do grupo controle (TNBS) ( $1,035 \pm 0,034$  g/5cm) em comparação ao grupo que recebeu apenas salina no cólon ( $0,262 \pm 0,013$  g/5cm). Os grupos tratados com o PLS da *H. musciformis*, apresentaram os seguintes resultados em peso úmido de 5 cm do cólon: dose de 10 mg/kg ( $0,6950 \pm 0,105$  g/5cm); dose de 30 mg/kg ( $0,5453 \pm 0,122$  g/5cm); dose de 60 mg/kg ( $0,494 \pm 0,116$  g/5cm), sendo esta última dose a que apresentou uma maior redução do peso úmido dos cólons quando comparada ao grupo controle (TNBS), algo similar ocorreu com os animais tratados com dexametasona na dose de 1 mg/kg ( $0,615 \pm 0,108$  g/cm) conforme mostrado na (Figura 4) com ( $P < 0,05$ ).



**Figura 4. Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Hypnea musciformis* sobre o peso úmido dos cólons de ratos com colite induzida por TNBS.** Os ratos foram tratados com PLS (10, 30 e 60 mg/kg, v.o) ou dexametasona (DEXA, s.c) (1 mg/kg) uma vez por dia durante três dias após a indução da colite. No terceiro dia, os ratos foram eutanasiados e os abdômens foram abertos. Após a identificação do intestino, amostras de tecido (5 cm) foram recolhidas para avaliação de peso úmido. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro de 5-7 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  vs grupo TNBS; # $P < 0,05$  vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

#### 5.4 EFEITO DO PLS DA *H. musciformis* SOBRE OS CRITÉRIOS MICROSCÓPICOS DE LESÃO DURANTE A COLITE INDUZIDA POR TNBS

A análise histológica mostrou que os animais do grupo salina, conforme esperado, apresentaram as pontuações mínimas de escores microscópicos para todos os parâmetros avaliados conforme mostrado na Tabela 4 e representado na microfotografia pela Figura 5A. Já os animais do grupo controle (TNBS) apresentaram significativa perda da arquitetura da mucosa 2 (0-2), intensa infiltração de células 3 (1-3), espessamento da camada muscular 3 (1-3), formação de abscessos em cripta 1 (0-1), e depleção de células caliciformes 1 (0-1), atingindo uma pontuação total de danos de 8 (3-8) visto na (Tabela 4) e representado pela (Figura 5B). No grupo tratado com o PLS (60 mg/kg, v.o) da *H. musciformis* observou-se uma significativa ( $p < 0,05$ ) diminuição de importantes parâmetros avaliados, tais como, perda da arquitetura da mucosa 0 (0-1), infiltração de células 0 (0-1), espessamento da camada muscular 1 (0-1), atingindo uma pontuação total de danos de apenas 1 (0-1), como visto na Tabela 4 e representado pela microfotografia da Figura 5C. Esta diminuição das pontuações analisadas equivale a uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) de danos no tecido do cólon. Da mesma forma, a dexametasona (1 mg/kg, s.c) também reduziu os escores microscópicos avaliados quando comparados com o grupo de TNBS Tabela 4 e representado pela Figura 5D.

**Tabela 4. Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Hypnea musciformis* sobre os critérios microscópicos de lesão intestinal provocada pela colite induzida por TNBS em ratos.**

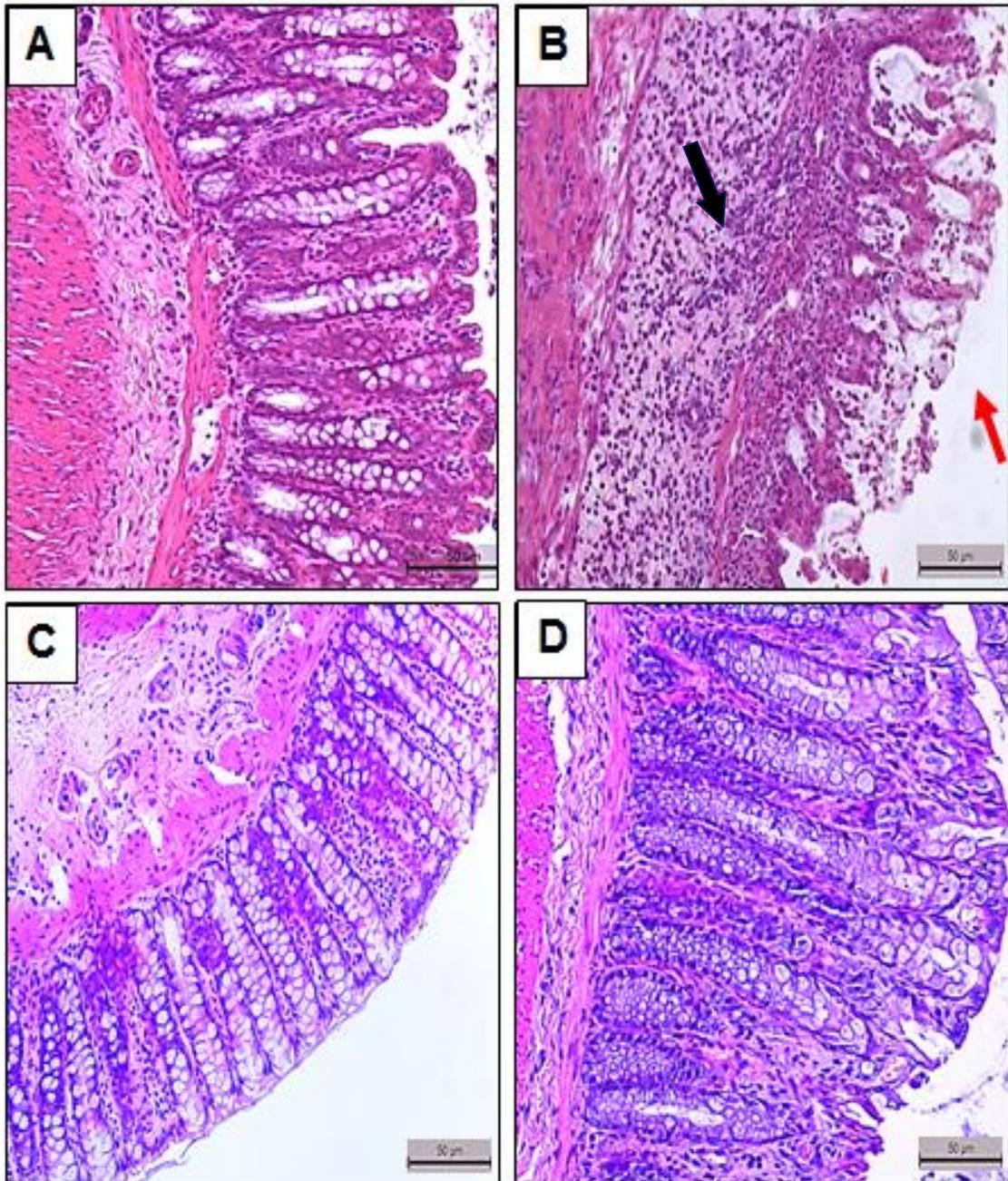
Critérios	Média dos escores			
	SAL	TNBS	TNBS+PLS	TNBS+DEXA
Perda da arquitetura da mucosa	0	2 (0-2) #	0 (0-1)*	1 (0-3)*
Infiltração celular	0	3 (1-3) #	0 (0-1)*	0 (0-3)*
Espessamento da muscular	0	3 (1-3) #	1 (0-1)*	1 (1-3)*
Abcesso em cripta	0	1 (0-1)	1 (0-1)	1 (0-1)
Depleção de células de caliciformes	0	1 (0-1)	1 (0-1)	1 (0-1)
Escores totais de danos	0	8 (3-8) #	1 (0-1)*	1 (0-3)*

Os ratos foram tratados com PLS (60 mg/kg, v.o) ou dexametasona (DEXA, s.c) (1 mg/kg) uma vez por dia durante três dias após a indução da colite. No terceiro dia, os ratos foram eutanasiados e os abdômens foram abertos. Após a identificação do intestino, amostras de tecido (5 cm) foram recolhidas para avaliação histológica. Avaliação de escores microscópicos foi realizada conforme proposto por Appleyard e Wallace em 1995.

Escores de lesão histológica expressos como média  $\pm$  erro (n = 5-7). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

\* P <0,05 quando comparado ao grupo controle (TNBS).

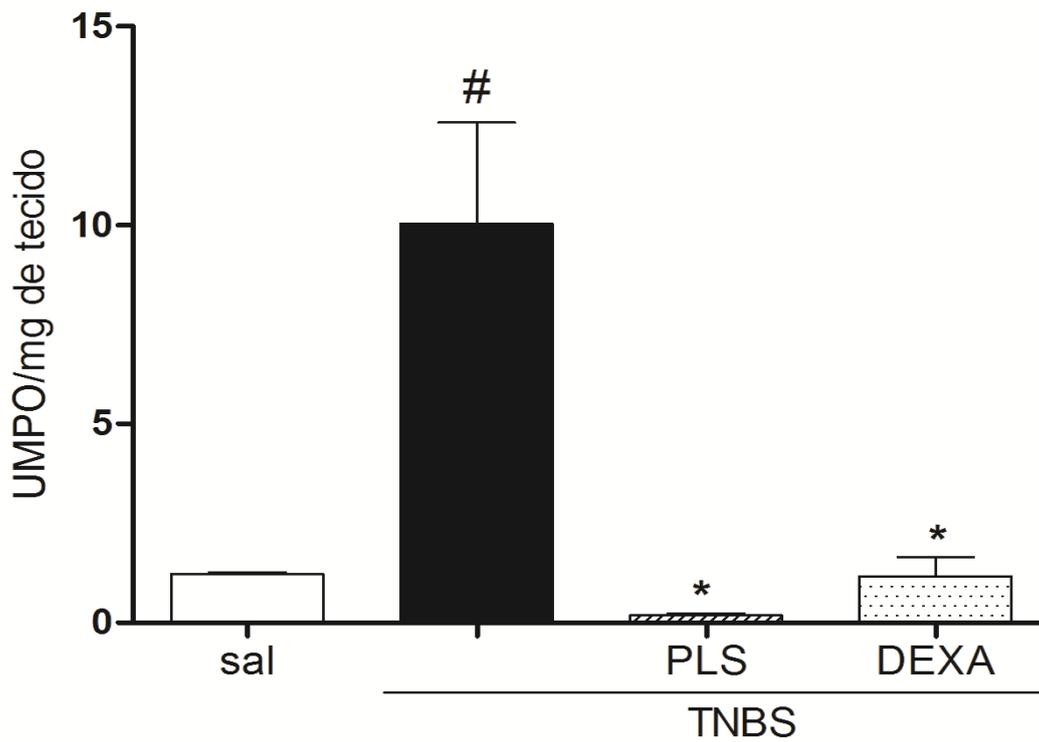
# P <0,05 quando comparado ao salina.



**Figura 5. Microfotografia (200x, escala 50  $\mu\text{m}$ ) representando o efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Hypnea musciformis* sobre os danos microscópicos da lesão intestinal provocado pela colite induzida por TNBS em ratos. Tecido intestinal de um animal que recebeu apenas solução salina a 0,9% por via retal (A); tecido intestinal de um animal que recebeu apenas TNBS por via retal (grupo controle) (B); tecido intestinal de um animal com colite e tratado PLS (60 mg/kg, v.o) (C); tecido intestinal de um animal com colite e tratado com dexametasona (1 mg/kg, v.o) (D). As setas preta representam infiltrado celular e a seta vermelha represente perda da arquitetura da mucosa.**

## 5.5 EFEITO DO PLS DA *H. musciformis* SOBRE A INFILTRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NO CÓLON - MIELOPEROXIDASE (MPO)

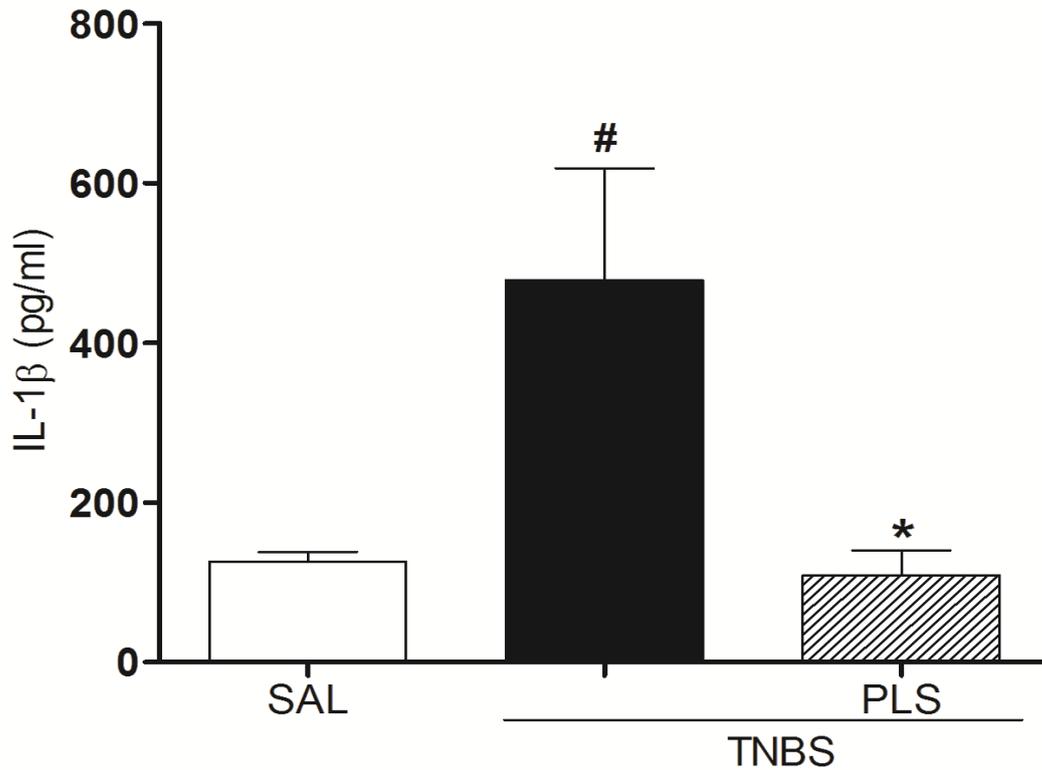
Como visto na Figura 6, o grupo controle (TNBS) demonstrou intensa infiltração de neutrófilos para o cólon ( $10,03 \pm 2,551$  UMPO/mg de tecido) em relação ao grupo que recebeu apenas salina no cólon ( $1,222 \pm 0,042$  UMPO/mg de tecido). O tratamento com o PLS da *H. musciformis* (60 mg/kg, v.o) resultou em uma inibição significativa da infiltração de neutrófilos ( $0,1876 \pm 0,053$  UMPO/mg de tecido), o mesmo ocorreu no tratamento com dexametasona na dose de (1 mg/kg, v.o) ( $1,169 \pm 0,487$  UMPO/mg de tecido) ( $P < 0,05$ ), em relação ao grupo controle (TNBS) com  $p < 0,05$ .



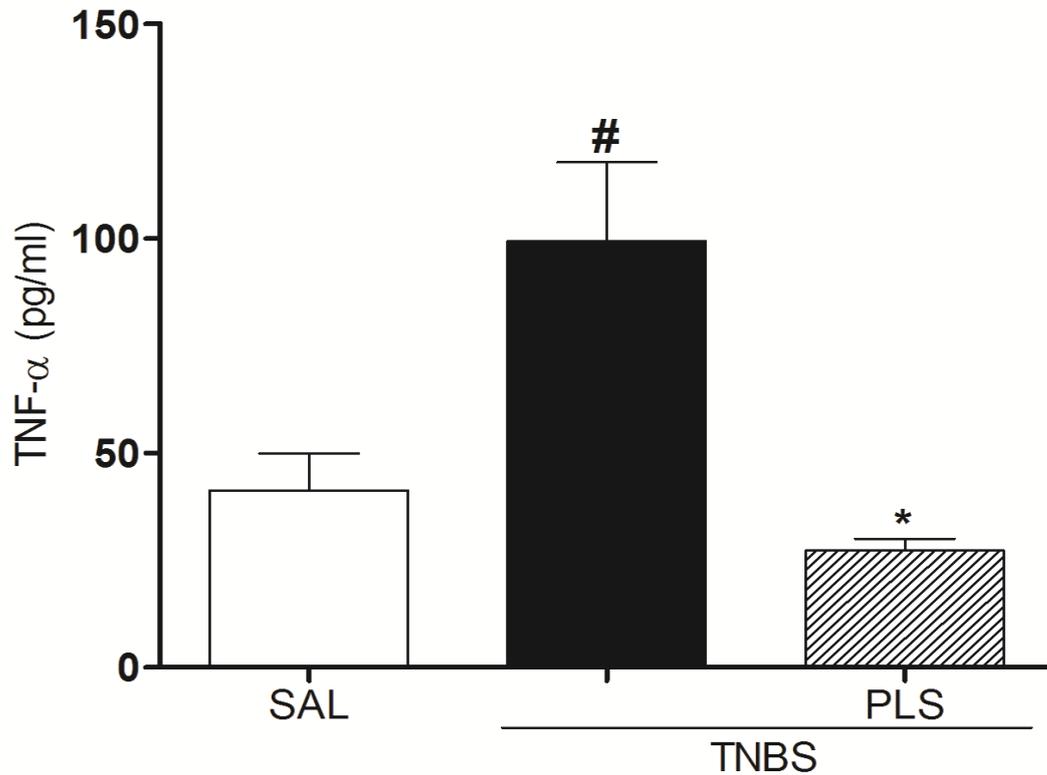
**Figura 6.** Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Hypnea musciformis* sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) em tecido intestinal de ratos com colite induzida por TNBS. Os animais foram tratados com PLS (60 mg/kg, v.o) ou dexametasona (DEXA, s.c) (1 mg/kg) uma vez por dia durante três dias. No terceiro dia, os ratos foram eutanasiados, foram recolhidas as amostras de 5 cm do cólon de cada animal e a atividade de MPO foi avaliada. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro de 5-7 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  vs grupo TNBS; # $P < 0,05$  vs grupo de salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

## 5.6 EFEITO DO PLS DA *H. musciformis* SOBRE OS NÍVEIS COLÔNICOS DE IL-1 $\beta$ E TNF- $\alpha$

Após três dias da indução da colite por TNBS, os animais foram eutanasiados e as amostras dos intestinos foram retiradas para dosagens de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ). Os animais submetidos à colite induzida por TNBS (grupo controle) apresentaram um significativo aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias dosadas, IL-1 $\beta$  ( $478,7 \pm 139,8$  pg/ml) (Figura 7); TNF- $\alpha$  ( $99,29 \pm 18,42$  pg/ml) (Figura 8), comparado ao grupo salina, IL-1 $\beta$  ( $125,8 \pm 12,44$  pg/ml) (Figura 7) e TNF- $\alpha$  ( $41,23 \pm 8,595$  pg/ml) (Figura 8). O grupo tratado com o PLS da *H. musciformis* (60 mg/kg, v.o) apresentou uma redução significativa de ambas as citocinas dosadas: IL-1 $\beta$  ( $108,8 \pm 31,03$  pg/ml) (Figura 7); TNF- $\alpha$  ( $27,20 \pm 2,779$  pg/ml) (Figura 8) com  $P < 0,05$ .



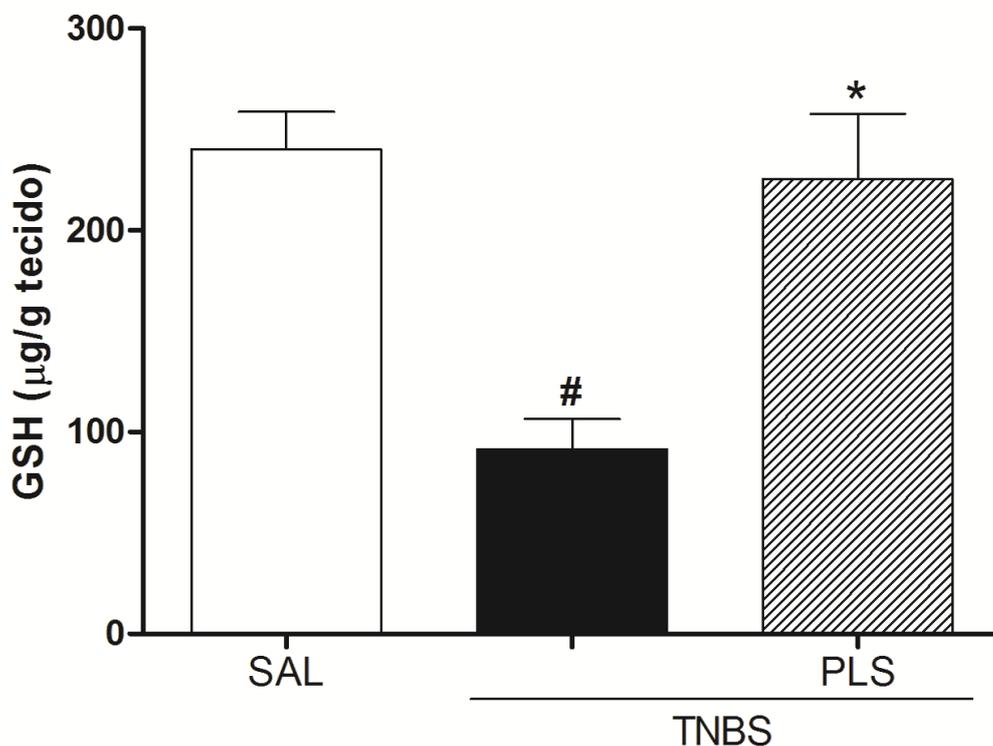
**Figura 7. Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Hypnea musciformis* sobre os níveis colônicos de IL-1 $\beta$  de rato com colite induzida por TNBS.** Os animais foram tratados com PLS (60 mg/kg, v.o) uma vez por dia durante três dias. No terceiro dia, os ratos foram eutanasiados, as amostras de cólon foram recolhidas e os níveis da citocina, IL-1 $\beta$ , foram avaliados. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  erro de 5-7 animais por grupo. \* P <0,05 vs grupo TNBS; #P <0,05 vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).



**Figura 8. Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Hypnea musciformis* sobre os níveis colônicos de fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) de rato com colite induzida por TNBS.** Os animais foram tratados com PLS (60 mg/kg, v.o) uma vez por dia durante três dias. No terceiro dia, os ratos foram eutanasiados, as amostras de cólon foram recolhidos e os níveis da citocina TNF- $\alpha$  foram avaliados. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro de 5-7 animais por grupo. \* P <0,05 vs grupo TNBS; #P <0,05 vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

### 5.7 EFEITO DO PLS DA *H. musciformis* SOBRE OS NÍVEIS COLÔNICOS DE GLUTATIONA (GSH)

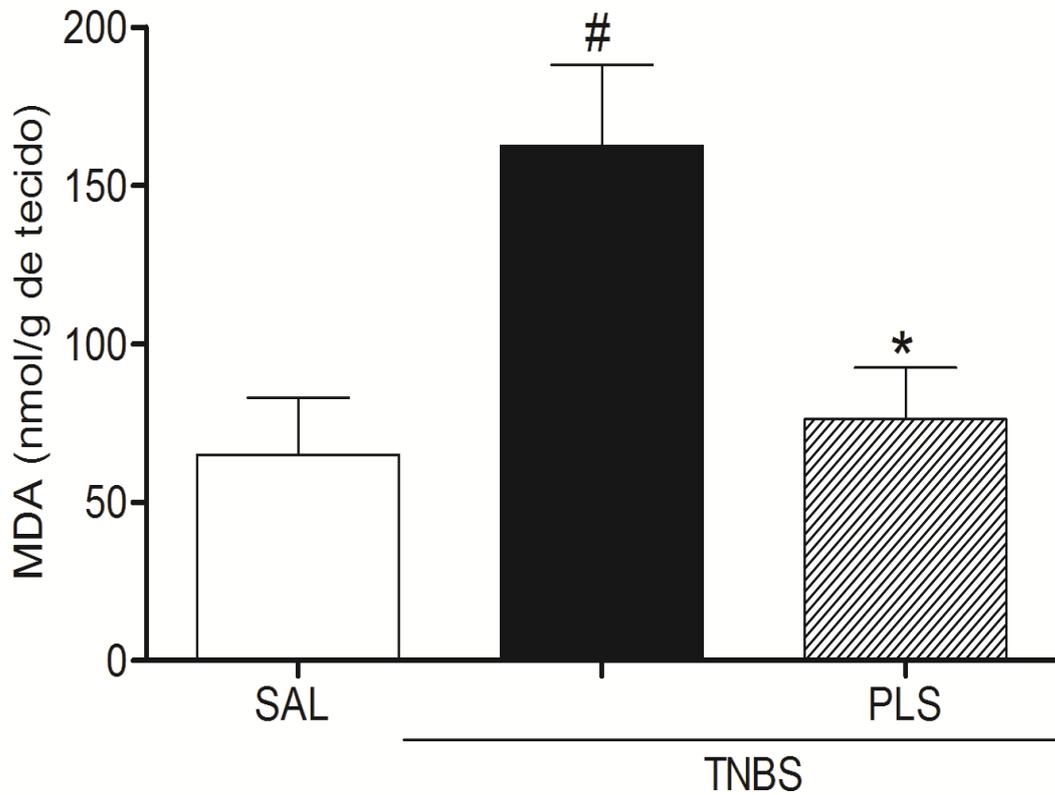
Após o terceiro dia da indução da colite por TNBS, as amostras do cólon dos animais com ou sem lesão foram retiradas para dosagem de GSH. De acordo com a Figura 9, o grupo controle (TNBS) apresentou significativo consumo dos níveis de GSH ( $91,56 \pm 14,96 \mu\text{g/g}$  de tecido) quando comparado ao grupo salina ( $240,2 \pm 18,55 \mu\text{g/g}$  de tecido). Por outro lado o grupo tratado com o PLS da *H. musciformis* (60 mg/kg, v.o) preveniu de forma significativa o consumo de GSH pelos radicais livres provenientes da lesão provocada pelo TNBS ( $225,4 \pm 32,47 \mu\text{g/g}$  de tecido), demonstrando uma diferenças estatística ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9.** Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Hypnea musciformis* sobre a concentração colônica de glutatona (GSH) em rato com colite induzida por TNBS. Os animais foram tratados com PLS (60 mg/kg, v.o) uma vez por dia durante três dias. No terceiro dia, os ratos foram eutanasiados, as amostras de cólon foram recolhidas e os níveis GSH foram avaliados. Os resultados são expressos como média ± erro de 5-7 animais por grupo. \* P < 0,05 vs grupo TNBS; #P < 0,05 vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

## 5.8 EFEITO DO PLS DA *H. musciformis* SOBRE A CONCENTRAÇÃO COLÔNICA DE ÁCIDO MALONILDIALDEÍDO (MDA)

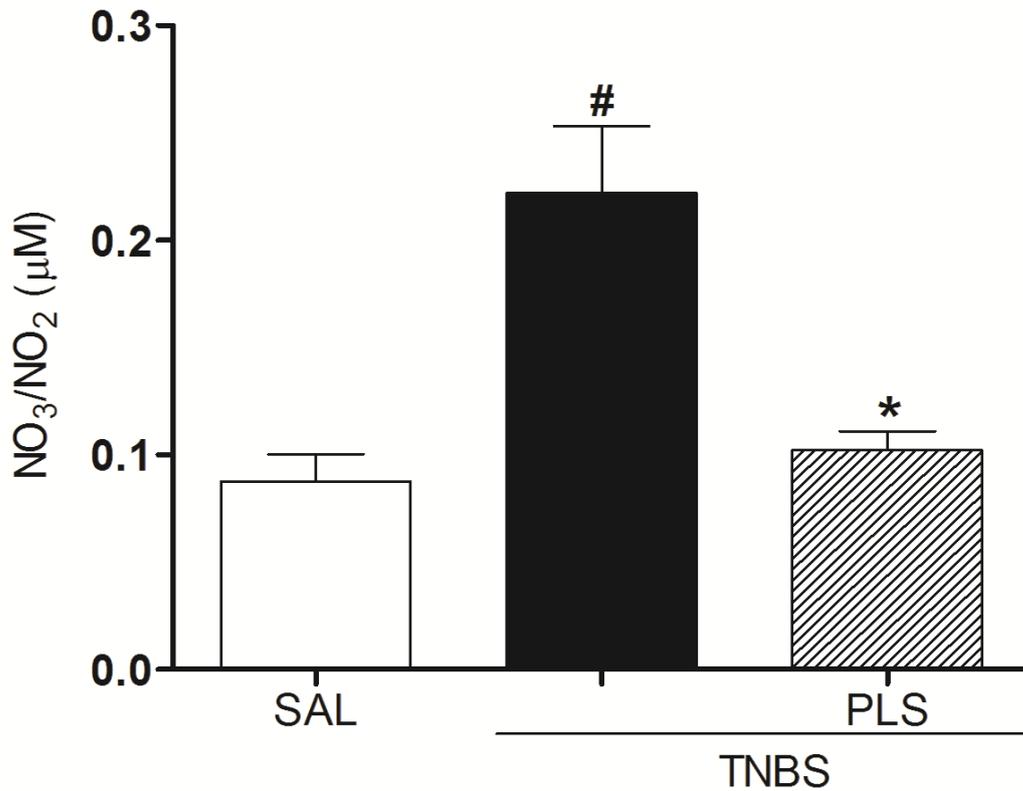
Como mostrado na Figura 10, o grupo controle (TNBS) expressou níveis altos de MDA ( $162,5 \pm 25,63$  nmol/g de tecido) em relação ao grupo salina ( $65,07 \pm 17,93$  nmol/g de tecido). O grupo tratado com o PLS da *H. musciformis* (60 mg/kg, v.o) demonstrou uma significativa redução dos níveis de MDA ( $76,27 \pm 16,30$  nmol/g de tecido) (Figura 8) e como era de se esperar, a dexametasona na dose de 1 mg/kg também reduziu significativamente a concentração de MDA ( $35,04 \pm 5,720$  nmol/g de tecido) em relação ao grupo controle (TNBS) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 10.** Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Hypnea musciformis* sobre a concentração colônica do ácido malonildialdeído (MDA) em tecido intestinal de rato no modelo de colite induzida por TNBS. Os animais foram tratados com PLS (60 mg/kg, v.o) ou dexametasona (DEXA, s.c) (1 mg/kg) uma vez por dia durante três dias. No terceiro dia, os ratos foram eutanasiados e recolhidas as amostras do cólon de cada animal para a dosagem de MDA. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro de 5-7 animais por grupo. \*p <0,05 vs grupo TNBS; #p <0,05 vs grupo de salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

### 5.9 EFEITO DO PLS DA *H. musciformis* SOBRE OS NÍVEIS COLÔNICOS DE NITRATO E NITRITO (NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub>)

Os animais submetidos à colite, grupo controle (TNBS), apresentaram elevadas concentrações de NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub> ( $0,222 \pm 0,031 \mu\text{M}$ ) quando comparados aos animais que receberam apenas salina intra-anal, grupo salina ( $0,087 \pm 0,012 \mu\text{M}$ ) conforme mostrado na Figura 11. Por outro lado os animais tratados com o PLS da *H. musciformis* (60 mg/kg, v.o) demonstraram significativa redução da concentração de NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub> ( $0,102 \pm 0,008 \mu\text{M}$ ) com  $p < 0,05$ , em consonância com a diminuição do dano intestinal causado pela administração de TNBS.



**Figura 11.** Efeito do polissacarídeosulfatado (PLS) extraído da *Hypnea musciformis* sobre os níveis colônicos de produto de degradação do óxido nítrico (NO), nitrato e nitrito (NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub>), em tecido intestinal de ratos com colite induzida por TNBS. Os animais foram tratados com PLS (60 mg/kg, v.o) uma vez por dia durante três dias. No terceiro dia, os ratos foram eutanasiados e recolhidas as amostras do cólon de cada animal para a dosagem de NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub>. Os resultados são expressos como média ± erro de 5-7 animais por grupo. \* P <0,05 vs grupo TNBS; #P <0,05 vs grupo de salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

## 6 DISCUSSÃO

O polissacarídeo sulfatado da *H. musciformis* é caracterizado por ser uma κ-carragenina que tem um grupo sulfato no carbono 4 do resíduo β-D-galactose e uma ponte de 3,6-anidro no resíduo α-D-galactose (CREER et al., 1984; AZIZA et al., 2008). Confirmando o exposto acima a caracterização bioquímica do polissacarídeo da *H. musciformis* no presente estudo, apresentou um polímero do tipo K-carragenina com peso molecular de  $1,24 \times 10^5$  g/mol, estando dentro da faixa apresentada por Cosenza et al. (2014), que variou de 0,88 a  $2,87 \times 10^5$  g/mol. Além disto, o PLS apresentou um padrão de sulfatação de quase um radical sulfato para cada dois resíduos de monossacarídeos. Desta forma, acredita-se que a ação anti-inflamatória deste PLS proposta por Brito et al. (2012) é bem possivelmente devido ao conteúdo de radicais sulfatos presentes nesta biomolécula.

Os resultados farmacológicos do presente estudo demonstram claramente que o efeito anti-inflamatório do PLS da *H. musciformis* apresentado por Brito et al. (2012) foi reproduzido de forma clara no modelo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos (Figura 12). O PLS da *H. musciformis* na dose de 60 mg/kg administrado por via oral (v.o) reduziu os parâmetros inflamatórios macroscópicos importantes como peso úmido e escores de lesão, e além disto, este PLS demonstrou resultado satisfatório em todos os ensaios bioquímicos realizados: dosagem de MPO, citocinas (IL-1β e TNF-α), MDA, GSH e NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub>. Tais evidências destas ações promovidas pelo PLS da *H. musciformis* são mostradas na Figura 12 e detalhadas minuciosamente no decorrer deste texto.

Os modelos animais são amplamente usados para estudar a patogênese de doenças humanas e para testar novas terapêuticas (MATEUS et al., 2013). Ao longo da última década, muitos modelos animais de doenças inflamatórias intestinais (DIIs) têm surgido. Embora o número abundante de modelos possam dar a impressão de que qualquer perturbação do sistema imunitário leva a colite, a maioria dos animais não desenvolve as doenças intestinais conforme desejado. Nem qualquer um modelo mimetiza com precisão a doença em humanos, principalmente por causa da natureza fugaz e poligênica da DII (JONG et al., 2005).

Em seres humanos os eventos das DIIs ocorrem muito antes dos sintomas aparecerem. Assim, os estudos muitas vezes precisam ser retrospectivos, o que

pode causar muitos erros. Isso tem levado a estudos usando modelo animal (BRITO et al., 2012).

Dentre os modelos animais mais utilizados para a colite crónica, destaca-se o "modelo de hapteno", originalmente descrito por Morris et al. (1989). Este modelo envolve a administração única, intra-retal de um hapteno, o ácido trinitrobenzenossulfónico (TNBS), dissolvido em etanol a 50% (vol/vol) (Walace et al., 1995). A patogênese da DII é semelhante entre as doenças humanas e a colite induzida por TNBS (PAWAR et al., 2011). Esta é a razão pela qual tantos grupos de pesquisa usam este modelo para investigar novas abordagens para o tratamento de doença inflamatória intestinal (MATEUS et al., 2013).

Embora a propriedade do ácido trinitrobenzenossulfónico seja em parte responsável pelos danos da mucosa do intestino, o TNBS atua principalmente provocando uma antigenicidade das proteínas bacterianas intestinais por funcionar como um hapteno (NEURATH et al., 2000), assim promovendo o desenvolvimento de respostas imune e inflamatória (Figura 12).

A fase aguda da inflamação induzida por TNBS é presumivelmente essencial para estabelecer a progressão contínua da colite que é mediada pela imunidade dependente de células T (CHEON et al., 2012). Desta forma a indução da colite por instilação intra-retal de substâncias haptênicas do TNBS (MORRIS et al., 1989), resulta numa resposta imune mediada por células e induz uma inflamação transmural no intestino com características morfológicas e histopatológicas semelhantes aos das DIIs em humanos (DE ALMEIDA et al., 2013; CHEON et al., 2012).

O modelo experimental de colite ulcerativa induzida por TNBS é caracterizado por uma resposta inflamatória aguda, seguida por um espessamento da parede do cólon, ulcerações e infiltração de células imunitárias (ISIK et al., 2011; KANDASAMY, et al., 2010). Estas são as características principais para a atribuição dos escores macroscópicos de lesão proposto por Morris et al. (1989). Os resultados do presente estudo mostraram que os ratos do grupo controle (TNBS) tiveram um significativo aumento dos escores de lesão nos seus cólons quando comparados aos animais que receberam apenas salina intra-anal (Figura 3). Por outro lado os animais tratados com o PLS da *H. musciformis* na dose de 60 mg/kg apresentaram uma diminuição significativa dos escores macroscópicos de lesão dos

cólons, quando comparado ao grupo TNBS, demonstrando assim a redução de um parâmetro pró-inflamatório importante.

O processo inflamatório intestinal envolve uma série de eventos celulares e moleculares que resultam no aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular. Esse fato promove o extravasamento de granulócitos, especialmente polimorfonucleares (Figura 12). A migração e ativação de mediadores químicos inflamatórios, como metabólitos do ácido araquidônico, bradicininas e citocinas presentes em macrófagos, linfócitos e outros tipos celulares servem para iniciar, coordenar e amplificar o processo inflamatório (WITAJCENIS, 2010). Isto promove um aumento do peso úmido do tecido do cólon inflamado. Este, é considerado um indicador da gravidade e da extensão da resposta inflamatória. O peso úmido reflete a magnitude do edema e do infiltrado celular no tecido estudado (BUSSEROLLES et al., 2005).

O tratamento com PLS da *H. musciformis* promoveu a diminuição significativa do peso úmido dos 5 cm de cólon avaliado, quando comparado ao grupo controle (TNBS), sugerindo que este polissacarídeo possui uma importante ação antagônica durante o processo inflamatório intestinal, onde pode-se observar seu efeito pela redução do peso úmido e conseqüente diminuição do escores macroscópicos avaliados, podendo estar relacionado a diminuição de mediadores inflamatórios específicos.

Para se confirmar esses dados macroscópicos, avaliou-se histopatologicamente o tecido inflamado do cólon através de lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina. Os dados histológicos encontrados no grupo tratado com PLS da *H. musciformis* evidenciam mais claramente os dois resultados apresentados anteriormente.

As alterações histológicas na colite induzida por TNBS se assemelham a DII em humanos em termos de ulceração, inflamação e infiltração de leucócitos (ZHANG et al., 2006). A histologia do tecido intestinal de ratos submetidos à colite induzida por TNBS apresenta características singulares como, uma inflamação (edema) transmural envolvendo todas as camadas da parede do intestino, destruição da camada mucosa do cólon, necrose e perda de células glandulares e epiteliais, aparecimento de granulações extensivas com a presença de um maciço infiltrado de neutrófilos, fibroblastos e linfócitos, presentes principalmente na mucosa e

submucosa (SILVA et al., 2010). O tratamento dos animais com o PLS da *H. musciformis* conforme visto na Tabela 4 e principalmente representado pela Figura 5B, apresentou uma evidente reorganização da camada mucosa, diminuição do edema, proteção das células epiteliais e glandulares e principalmente uma diminuição do infiltrado celular, majoritariamente neutrófilos.

A infiltração de neutrófilos na mucosa inflamada é uma das mais proeminentes características histológicas observadas na DII (MARTIN et al., 2006; TALERO et al., 2008). Os neutrófilos são atribuídos como as células responsáveis por perturbar a integridade epitelial, causando lesões durante a colite (NOSÁL'OVÁ et al., 2000). Estes danos ao tecido são causados principalmente pelo processo oxidativo oriundos da atividade da mieloperoxidase (MPO), enzima encontrada preferencialmente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos ativados e que mediante a reação da MPO com  $H_2O_2$  e  $Cl^-$  produzem moléculas de hipoclorito ( $ClO^-$ ), um potente oxidante e microbicida. Portanto a MPO é usada como um bom marcador de inflamação, lesão tecidual e infiltração de neutrófilos nos tecidos gastrointestinais lesados (MARTÍN et al., 2004; BAMIAS et al., 2011). Confirmando os fatos, neste trabalho o grupo controle (TNBS) apresentou uma intensa atividade da mieloperoxidase (MPO), corroborando diretamente com os danos teciduais macroscópicos e histológicos já apresentados. Por outro lado o tratamento com o PLS da *H. musciformis*, apresentou uma drástica redução da atividade desta enzima, sugerindo que o PLS da *H. musciformis* possa agir diminuindo a migração de neutrófilos para o sítio da lesão, levando à proteção intestinal frente aos danos causados pela colite induzida por TNBS.

Atualmente tem sido demonstrado que os principais agentes quimiotáticos para os neutrófilos são citocinas pró-inflamatórias, tais como,  $IL-1\beta$  e  $TNF-\alpha$ , estas citocinas regulam a expressão de moléculas endoteliais vasculares que promovem a aderência de neutrófilos às células do endotélio (NEMETZ et al., 1999; SILVA et al., 2010). Estas citocinas são moléculas de sinalização importantes do sistema imune intestinal, portanto desempenham um papel importante nas DIIs.

Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que os níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a  $IL-1\beta$  e o  $TNF-\alpha$  estão aumentados nas DIIs ativas e correlacionam-se com a gravidade da inflamação (KIM, 2011; STROBER; FUSS, 2011), o que

confirma ainda mais o papel crítico destas citocinas pró-inflamatórias na patogênese da inflamação intestinal (YANG et al., 2014).

A IL-1 $\beta$  está envolvida tanto na iniciação como na amplificação da resposta inflamatória que conduz à lesão intestinal. Foi demonstrado que a IL-1 $\beta$  desempenha um papel importante na patogênese da inflamação intestinal, em modelos de inflamação intestinal induzida por TNBS, assemelhando-se muito com a doença em humanos em que os pacientes com DIIs têm níveis elevados de IL-1 $\beta$  no seu tecido intestinal (LIGUMSKY et al., 1990; ISAACS; SARTOR; HASKILL, 1992). Além disto, esta citocina tem um papel importante no aumento da permeabilidade intestinal, contribuindo para migração de neutrófilos e destruição da integridade intestinal (AL-SADI; MA, 2007).

O TNF- $\alpha$  é uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias, ela influencia diretamente o dano do tecido epitelial intestinal e juntamente com a IL-1 $\beta$  são mediadores chaves da progressão na DII (CHO et al., 2011). A expressão em excesso de TNF- $\alpha$  resulta em danos na barreira epitelial, iniciação da apoptose em células epiteliais e iniciação da secreção de quimiocinas pelas células epiteliais do cólon. Um aumento persistente da TNF- $\alpha$  na mucosa do cólon pode contribuir para os defeitos da barreira epitelial intestinal muito associado à inflamação visto nas DIIs (VIVINUS-NEBOT et al., 2013).

No modelo de colite experimental induzida por TNBS do presente estudo, a expressão de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foi significativamente aumentada no grupo controle (Figuras 7 e 8 respectivamente), confirmando assim o papel crítico destas citocinas na patogênese da inflamação intestinal. E por outro lado, após o tratamento dos animais com o PLS da *H. musciformis*, houve uma acentuada diminuição de ambas as citocinas dosadas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), comprovando sugestivamente a hipótese de que o PLS em questão atua modulando a liberação e ativação destas duas citocinas pró-inflamatória durante o processo inflamatório intestinal da colite, o que leva a uma diminuição da sinalização, da ativação e do recrutamento de neutrófilos para o sítio da lesão, reduzindo assim os danos teciduais e tendo como consequência a melhoria do quadro clínico e bioquímico dos animais com colite, conforme visto na Figura 12.

Neutrófilos ativados produzem espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio na mucosa intestinal induzindo estresse oxidativo, que desempenha um papel

crucial na patogênese da Doença Inflamatória Intestinal (MARTIN et al., 2006; TALERO et al., 2008). Devido ao aumento da infiltração de células inflamatórias, existe um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e uma exacerbação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), estas ultrapassam as defesas antioxidantes intestinais endógenas resultando em inflamação e dano oxidativo ao intestino (KANDASAMY et al., 2010; PAIOTTI et al., 2009; PREMANATHAN et al., 2012; OZ; ZHONG; DE VILLIERS, 2012).

O estado redox do epitélio intestinal desempenha um papel de manutenção da integridade e função celular. Um potente sistema endógeno antioxidante não enzimático que atua na função redox do intestino, protegendo frente aos danos causados por ROS é o sistema da glutatona (GSH) (BIASI et al., 2013). A glutatona (GSH) é um importante fator antioxidante não enzimático que está presente em todas as células. Este componente na sua forma reduzida (GSH) pode se ligar a compostos tóxicos, como os radicais livres, em reações dependentes ou não de enzimas (LI; LI; YE, 2010). A GSH é utilizada como substrato pelas enzimas das famílias da glutatona S-transferase (GST) e da glutatona peroxidase (GPx). As enzimas GST apresentam a capacidade de conjugar GSH às moléculas de drogas, peróxidos e outros produtos do processo oxidativo para detoxicação celular, enquanto GPx compõem o grupo de enzimas capazes de reduzir uma variedade de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos utilizando GSH como molécula redutora (OAKLEY, 2005). Após ser oxidada, a glutatona pode sofrer um novo processo de redução por meio da enzima glutatona redutase (GRed), retornando a seu estado de GSH. Havendo um desequilíbrio entre a GSH e sua forma oxidada (GSSG) ou conjugada, as células secretam o excesso da porção oxidada o que pode levar a depleção dos níveis de GSH (KUSHIMA, 2010).

As concentrações de GSH são reduzidos significativamente em pacientes com doença inflamatória do intestino e em modelos experimentais de colite (TAHAN et al., 2011). Confirmando o exposto acima, neste estudo os animais do grupo controle (TNBS) apresentaram consumo quase total dos níveis de GSH (Figura 9). Após o tratamento com o PLS da *H. musciformis*, observou-se uma manutenção ou reparo dos níveis de GSH dos animais com colite, isto leva a crer numa ação antioxidante endógena deste polissacarídeo sulfatado frente aos danos provocado

pelo estresse oxidativo proveniente da instilação de TNBS no cólon dos animais (Figura 12).

Para reforçar esta ideia, lançou-se mão de um importante marcador de radicais livres, stress oxidativo e lesão celular, o ácido malonildialdeído (MDA) (DENG et al., 2013). O MDA é um ácido carboxílico e o principal produto oriundo da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (WITAICENIS et al., 2012). O MDA é proveniente dos processos lipoperoxidativos, ocorre como uma consequência da lesão oxidativa do cólon (LOGUERCIO et al., 1996). O aumento dos níveis de MDA provoca ligação cruzada das proteínas plasmáticas à moléculas de ácido nucleico, sendo tóxico para a célula (Liu; Wang, 2011).

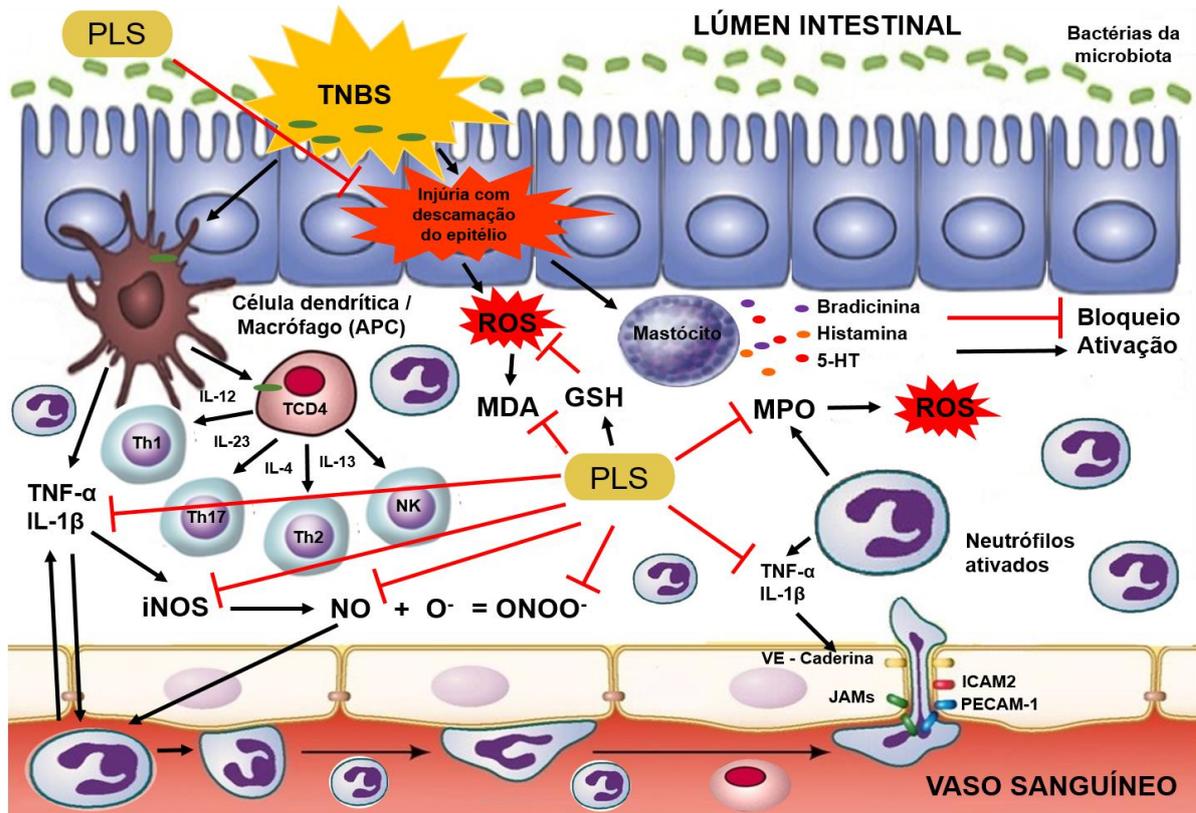
Muitos estudos têm demonstrado que a colite induzida por TNBS em ratos promove um intenso estresse oxidativo com destruição de membrana celular e consequente aumento dos níveis de MDA (Liu; Wang, 2011; JOO et al., 2015; Li et al., 2015).

De acordo com os dados apresentados na Figura 10, a terapia com o PLS da *H. musciformis* durante 3 dias resultou em uma diminuição dos níveis de MDA nos tecidos dos cólons de uma forma bastante notória, sugerindo que este PLS atue com sucesso na inibição da peroxidação lipídica induzida por TNBS. Isto reforça a credulidade no potencial antioxidante *in-vivo* deste polissacarídeo. Associando-se ao fato de que a inibição da geração de radicais livres contribui para diminuição do processo de infiltração de leucócitos para o tecido inflamado, impedindo assim a exacerbação do processo inflamatório no tecido colônicos (CESTARI; BASTOS; DI STASI, 2011).

Outro importante mediador pró-inflamatório e ativo prioritário na geração de espécies reativas de nitrogênio abordado neste estudo foi o óxido nítrico (NO). Alguns estudos indicam que o NO produzido de forma excessiva pode exacerbar as características patológicas da colite por um mecanismo de citotoxicidade direto, lesão nas células epiteliais do intestino, ativação de neutrófilos, vasodilatação e assim por diante (MCKENZIE et al., 1996). Além disso, o NO pode interagir com o superóxido e formar o radical peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) altamente tóxico, que aumenta reversivelmente a expressão de iNOS por ativação de NF-KB, o que leva a um ciclo vicioso (COOKE; DAVIDGE, 2002).

Na colite experimental em ratos, bem como na doença inflamatória do intestino em humanos, a geração de óxido nítrico do cólon e a atividade da síntese do óxido nítrico estão aumentadas. Além disso, o peroxinitrito, produto da interação do NO com o radical superóxido ( $O^{\cdot-}$ ), induz uma grave lesão da mucosa intestinal (RACHMILEWITZ; KARMELI; OKON, 1995). No presente estudo o tratamento dos animais com o PLS da *H. musciformis*, demonstrou uma significativa melhora da lesão do cólon induzida por TNBS, e isso se deve sobremaneira pela inibição da geração de espécies reativas de nitrogênio ou até mesmo pela diminuição da ação do próprio NO no cólon. Isto é claramente demonstrado na Figura 11 a qual retrata a dosagem de produtos de degradação do NO ( $NO_3NO_2$ ). Estes compostos expressam indiretamente o aporte de NO no tecido do cólon, portanto mostrando a contribuição do NO para a patogênese da lesão colônica na condição inflamatória induzida por TNBS.

Assim, conforme visto neste estudo, os níveis de nitrato e nitrito estando de fato expressos em baixas concentrações após o tratamento dos animais com o PLS da *H. musciformis*, permitem inferir que o polissacarídeo em questão também pode estar atuando de forma antagônica na produção, liberação ou diretamente no sítio de ação do óxido nítrico promovendo uma redução dos danos oriundos da ação deste gás no intestino dos animais com colite induzida por TNBS.



**Figura 12. Mecanismo pró-inflamatório da colite induzida pelo ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) e possíveis alvos da ação do polissacarídeo sulfatado (PLS) da *H. musciformis*.** A instilação de TNBS no cólon promove lesão de mucosa intestinal, liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), peroxidação lipídica marcada pelo ácido malonildialdeído (MDA) e liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ). As substâncias haptênicas do TNBS provoca uma imunogenicidade das estruturas bacterianas da microbiota, ativando ramos específico de resposta imune o que mimetiza a colite ulcerativa e a doença de crohn. As setas pretas indicam processo de ativação e as setas vermelhas indicam processo de bloqueio. Figura Adaptada a partir de Griseri et al., (2012) e Schmidt et al., (2011).

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo fornecem evidências claras do efeito anti-inflamatório e intestinal protetor do polissacarídeo sulfatado da *Hypnea musciformis* durante a colite induzida por TNBS em ratos. Diante de tais evidências, sugere-se que este efeito anti-inflamatório do PLS da *H. musciformis* na colite se deva através da atenuação do influxo de leucócitos para os tecidos do cólon, pela supressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e diminuição do aporte de radicais livres no tecido do cólon, evitando o estresse oxidativo e danos lesivos ao cólon. Assim diante dos resultados obtidos, podemos sugerir o polissacarídeo sulfatado extraído da *Hypnea musciformis* como um importante alvo de pesquisas para o desenvolvimento de uma alternativa terapêutica para pacientes com doenças inflamatórias do intestino, principalmente portadores de colite ulcerativa e doença de crohn.

## REFERÊNCIAS

- ALBALASMEH, A. A., BERHE, A. A. GHEZZEHEI, T. A. **A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry.** Carbohydrate Polymers. v. 97, p. 253– 261, 2013.
- AL-SADI, R. M.; MA, T.Y. **IL-1 $\beta$  Causes an Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability.** J. Immunol. v.178, p. 4641-4649, 2007.
- ALVES, M. G. C. F. et al. **Antioxidant, cytotoxic and hemolytic effects of sulfated galactans from edible red alga *Hypnea musciformis*.** J. Appl. Phycol. v. 24, p. 1217–1227, 2012.
- APPLEYARD, C. B; WALLACE, J.L. **Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs.** Am. J. Physiol. v. 269, p. 119-25, 1995.
- ARAÚJO, G. S. et al. **Administração oral dos polissacarídeos sulfatados da rodófitica *Gracilaria caudata* na sobrevivência de pós-larvas de tilápia.** Revista Ciência Agronômica, v. 39(4), p. 548-554, 2008.
- ARMANA, M.; QADERB, S. A. U. **Structural analysis of kappa-carrageenan isolated from *Hypnea musciformis* (red algae) and evaluation as an elicitor of plant defense mechanism.** Carbohydrate Polymers. v. 88, p. 1264– 1271, 2012.
- AZIZA, M. et al. **Seasonal variation of the growth, chemical composition and carrageenan extracted from *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux harvested along the Atlantic coast of Morocco.** Sci Res. Essays. v. 2, p. 509–514, 2008.
- BAMIAS, G. et al. **Cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis.** Discov. Med. v. 60, p. 459–467, 2011.
- BARROS F. C. N. et al. **Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh).** Carbohydrate Polymers. v. 92, p. 598– 603, 2013.
- BATISTA, J. A. et al. **Polysaccharide isolated from *Agardhiella ramosissima*: Chemical structure and anti-inflammation activity.** Carbohydrate Polymers. v. 99, p. 59– 67, 2014.
- BAUDITZ, J., WEDEL, S., LOCHS, H. **Thalidomide reduces tumour necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease.** Gut. v. 50, p. 196–200, 2002.
- BEAUGERIE, L.; SOKOL, H. **Clinical, serological and genetic predictors of inflammatory bowel disease course.** World J. Gastroenterol. v. 18(29), p. 3806–3813. 2012.

BERNSTEIN, C. N. et al. **The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study.** Am. J. Gastroenterol. v. 101, p. 1559–1568,

BESEDNOVA, N. N. et al. **Anti-inflammatory Effects of Sulphated Polysaccharides Extracted from Brown Marine Algae.** Biology Bulletin Reviews. v. 2(6), p. 525–532, 2012.

BIASI, F. et al. **Inflammatory bowel disease: mechanisms, redox considerations, and therapeutic targets.** Antioxid. Redox Signal. V. 19(14), p. 1711–1747, 2013.

BINGHAM, C. O. **The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation.** Journal of rheumatology. Supplement. v. 65, p. 3–9, 2002.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P., et al. **Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão.** Rev. Bras. Coloproct, v. 23(3), p. 172-182, 2003.

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

BRANDHORST, G. et al. **CD41 immune response as a potential biomarker of patient reported inflammatory bowel disease (IBD) activity.** Clin. Chim. Acta. v. 421, p. 31–33, 2013.

BRAVIN, I. C.; YONESHIQUE, V. Y. **Influência de fatores ambientais sobre o crescimento in vitro de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Rhodophyta).** Rev. Bras. Bot. v. 25(4), p. 469-474, 2002.

BRITO, T. V. et al. **Anti-inflammatory effect of a sulphated polysaccharide fraction extracted from the red algae *Hypnea musciformis* via the suppression of neutrophil migration by the nitric oxide signalling pathway.** J. Pharm. Pharmacol. 65, 724–733, 2013.

BRITO, T. V. et al. **Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats.** J. Pharm. Pharmacol. v. 66(8), p. 1161-70, 2014.

BURISCH, J.; MUNKHOLM, P. **The epidemiology of inflammatory bowel disease.** Scand J Gastroenterol. v. 17, 1-10, 2015.

BUSSEROLLES, J. et al. **Protection against 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colonic inflammation in mice by the marine products bolinaquinone and petrosaspongiolide M.** Biochemical pharmacology. v. 69(10), p. 1433–1440, 2005.

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

CAMPO, V. L. et al. **Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – a review.** Carbohydrate Polymers. v. 77(2), p. 167-180, 2009.

CASTANEDA, A. E. et al. **Cognitive functioning and depressive symptoms in adolescents with inflammatory bowel disease.** World J. Gastroenterol. V. 19, p. 1611–1617, 2013.

CESTARI, S. H.; BASTOS, J. K.; DI STASI, L. C. **Intestinal anti-inflammatory activity of *Baccharis dracunculifolia* in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis.** Evid Based Complement Alternat Med. v. 2011, p.1-9, 2011.

CHEON, G. J. et al. **Mechanisms of motility change on trinitrobenzenesulfonic Acid-induced colonic inflammation in mice.** Korean J. Physiol. Pharmacol. v. 16, p. 437-446, 2012.

CHO, E. J. et al. **Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Patrinia scabiosaefolia* in mice with ulcerative colitis.** J. Ethnopharmacol. v. 136, p. 428–435, 2011.

CHUNG, H. J. et al. **Toxicological evaluation of fucoidan from *Undaria pinnatifidain vitro and in vivo.*** Phytother. Res. v. 24, p. 1078, 2010.

CONG, Q. et al. **Structural characterization and effect on anti-angiogenic activity of afucoidan from *Sargassum fusiforme.*** Carbohydrate Polymers. v. 136, p. 899–907, 2016.

COOKE, C. L.; DAVIDGE, S. T. **Peroxynitrite increases iNOS through NF-KB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells.** American Journal of Physiology Cell Physiology. v. 282, p. 395–402, 2002.

COSENZA, V. A, NAVARRO, D. A., FISSORE, E. N., ROJAS, A.M., STORTZ. C.A. **Chemical and rheological characterization of the carrageenans from *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamoroux.** Carbohydrate Polymers. v. 102, p. 780-789, 2014.

COSENZA, V. A. et al. **Chemical and rheological characterization of the carrageenans from *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamoroux.** Carbohydr. Polym. v. 102, p. 780-789, 2014.

COSNES, J. et al. **Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases.** Gastroenterology. v. 140, p. 1785–1794, 2011.

CREER, C. W. et al. **Analysis of carrageenan from *Hypnea musciformis* by using k and l-carrageenases and 13C-NMR spectroscopy.** Carbohydr. Res. v. 129, p. 189–196, 1984.

DAMASCENO, S. R. B. et al. **Role of the NO/KATP pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis***

**against ethanol-induced gastric damage in mice.** Brazilian Journal of Pharmacognosy. v. 23(2), p. 320-328, 2013.

DE ALMEIDA, A. B. et al. **Anti-inflammatory intestinal activity of *Arctium lappa* L. (Asteraceae) in TNBS colitis model.** J. Ethnopharmacol. v. 146, p. 300-310, 2013.

DENG, J. S. et al. **The analgesic and anti-inflammatory bioactivities of eburicoic acid and dehydroeburicoic acid isolate from *Antrodia camphorata* on the inflammatory mediator expression in mice.** J. Agric. Food. Chem. v. 61 p. 5064–5071, 2013.

DOREA, C. M. P. G. et al. **A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects.** Carbohydrate Polymers. v. 91, p. 467–475, 2013.

ENGEL, M. A.; NEURATH, M.F. **New pathophysiological insights and modern treatment of IBD.** Journal of gastroenterology, v. 45(6), p. 571–83, 2010.

ESCRIG, A. J.; ORDONEZ, E.G.; RUPEREZ P. **Seaweed as a source of novel nutraceuticals: sulfated polysaccharides and peptides.** Adv. Food. Nutr. Res. v. 64, p. 325–337, 2011.

EVGENIKOS, N.; STEPHEN, J.G. **Papillary thyroid carcinoma associated with ulcerative colitis.** Postgrad. Med. Journal. v. 72(852), p. 621-622, 1996.

FARIAS, E. A. O. **Prospecção do rendimento da carragenina extraída da alga *Hypnea musciformis* coletada na Praia do Coqueiro, estado do Piauí, submetida a quatro tratamentos prévios.** Demetra. v. 9(4), p. 1019-1025, 2014.

FARIAS, W. R. L. et al. **Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates.** J. Biol. Chem. v. 275, p. 29299–29307, 2000.

FARMER, R. G. **Clinical features, laboratory findings and course of Crohn's disease.** Apud: KIRSNER, J.B. **Inflammatory Bowel Disease.** Philadelphia, PA: W.B. Saunders. p. 175–184, 1988.

FERNANDEZ, P. V.; ARATA, P. X.; CIANCIA, M. **Polysaccharides from *Codium* species: Chemical structure and biological activity. Their role as components of the cell wall.** Advances in Botanical Research. v. 71, p. 253–278, 2014.

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

da faculdade de Medicina da UFMG - Cenários da Saúde na Contemporaneidade, 2014.

FIOCCHI, C. **Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis.** Gastroenterology. v. 115(1), p. 182–205, 1998.

FONSECA, R. J. C. **Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities.** Thrombosis and Haemostasis, v. 99(3), p. 539-545, 2008.

GABURRI, P. D. et al. **Epidemiologia, aspectos clínicos e evolutivos da doença de Crohn: estudo de 60 casos.** Arq. Gastroenterol. v. 35, p. 240-246, 1998.

GANESAN, M.; THIRUPPATHI, S.; BRAVANATH, J. **Mariculture of *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux in South east coast of India.** Aquaculture. v. 256(1-4), p. 201-211, 2006.

GLOCKER, E. O. et al. **Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor.** N Engl J Med. v. 19, p. 361(21), 2009.

GREEN, L.C. et al. **Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids.** Anal Biochem. v.126, p.131–138, 1982. 2010.

GRISERI, T. et al. **Dysregulated Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Activity Promotes Interleukin-23-Driven Chronic Intestinal Inflammation.** Immunity. v. 37(6), p. 111-1129, 2012.

HOLLANDER, D. **Crohn's diseases a permeability disorder of the tight junction?** Gut. v. 29, p. 1621–1624, 1988.

ISAACS, K. L.; SARTOR, R. B.; HASKILL, S. **Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification.** Gastroenterology. v. 103, p. 1587–1595, 1992.

ISIK F. et al. **Protective effects of black cumin (*Nigella sativa*) oil on TNBS-induced experimental colitis in rats.** Dig. Dis. Sci. v. 56, p. 721-730, 2011.

JONG, Y. P. et al. **Disease Induction and Prevention in Experimental Models: Disease Induction and Prevention in Experimental Models of Inflammatory Bowel Disease.** Mucosal Immunology. v. 3, p. 1237-1254, 2005.

JOO, M. et al. **Anti-inflammatory Effects of Flavonoids on TNBS-induced Colitis of Rats.** Korean J. Physiol. Pharmacol. v. 19, p. 43–50, 2015.

KANDASAMY, R. et al. **Isatin down-regulates expression of atrial natriuretic peptide receptor A and inhibits airway inflammation in a mouse model of allergic asthma.** Int. Immunopharmacol. v. 10, p. 218–225, 2010.

KAPPELMAN, M. D. et al. **The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States.** Clin. Gastroenterol. Hepatol. v. 5, p. 1424–1429, 2007.

KIM, J. M. **Inflammatory bowel diseases and inflammasome.** Korean J. Gastroenterology = Taehan Sohwagi. Hakhoe chi. v. 58, p. 300–310, 2011.

KIM, M. H.; JOO, H. G. **Immunostimulatory effects of fucoidan on bonemarrow-derived dendritic cells.** Immunology Letters. v. 115(2), p. 138–143, 2008.

KLEBANOFF, S. J. **Myeloperoxidase.** Proc. Assoc. Am. Physicians. v. 111, p. 383–389, 1999.

KNIGHT, K. L. **Mucosal immunity: I Introduction to mucosal immunity.** Host Defense. 2013.

KRAVCHENKO, A. O. et al. **Structural peculiarities of polysaccharide from sterile form of Far Eastern red alga *Ahnfeltiopsis flabelliformis*.** Carbohydrate Polymers. v. 111, p. 1–9, 2014.

KRUG, F. J. **Método de prepare de amostras, fundamentos sobre preparo de amostra orgânicas e inorgânicas para análise elementar.** 1ª ed. Revisada. Dados internacionais de catalogação na publicação (CIP), Secção Técnica da Biblioteca – CENA/USP, Piracicaba, SP, 2010.

KUSHIMA, H. **Efeito dos extratos metanólicos das folhas de *Davilla elliptica* e *Davilla nitida* na vigência de colite experimental induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico em ratos.** Botucatu. f. 74, 2010. Tese (Doutor em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Farmacologia) Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista – UNESP.

LI, W.; LI, Z.; YE, Q. **Enzymatic synthesis of glutathione using yeast cells in two-stage reaction.** Bioprocess. Biosyst. Eng. v. 33(6), p. 675-682, 2010.

LI, Y. Y. et al. **Anti-inflammatory activities of cardamonin from *Alpinia katsumadai* through heme 2 oxygenase-1 induction and inhibition of NF-κB and MAPK signaling pathway in the 3 carrageenan-induced paw edema.** v. 25(2), p. 332-339, 2015.

LIGUMSKY, M. et al. **Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease—enhanced production during active disease.** Gut. v. 31, p. 686–689, 1990.

LIU, X.; WANG, J. **Anti-inflammatory effects of iridoid glycosides fraction of *Folium syringae* leaves on TNBS-induced colitis in rats.** Journal of Ethnopharmacology. v. 133, p. 780–787, 2011.

LOGUERCIO, C. et al. **Direct evidence of oxidativedamagein acute and chronic phases of experimental colitis in rats.** Digestive Diseases Sciences. v. 6, p. 1201–1211, 1996.

MACDONALD, T. T.; MONTELEONE, G.; PENDER, S. L. **Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease.** Scandinavian journal of immunology, v. 51(1), p. 2–9, 2000.

MARKS, D. J. B. **Crohn's Disease: an Immune Deficiency State.** Clinic Rev. Allerg. Immunol. v. 38, p. 20–31, 2010.

MARKS, D. L.; BUCHSBAUM, R.; SWAIN, T. **Measurement of total protein in plant samples in the presence of tannins.** Analytical Biochemistry. v. 147(1), p. 136-43, 1985.

MARTÍN A. R. et al. **Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats.** Biochem. Pharmacol. v.67, p. 1399–1410, 2004.

MARTIN, A. R. et al. **The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model.** British Journal of Pharmacology. v. 147, p. 873–885, 2006.

MATEUS, V. et al. **Development of TNBS-induced colitis: animal model to test new pharmacological approaches.** Acta. Farmacêutica Portuguesa. v. 2(2), p. 29-35, 3013.

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

MCKENZIE, S. J. et al. **Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease.** The Journal of Clinical Investigation. v. 98, p. 136–141, 1996.

MEISTER, A. **Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; Applications in research and therapy.** Pharmacol. Ther. v. 51, p. 155, 1991.

MELO, M. R. S. et al. **Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*.** Carbohydrate Polymers, v. 49(4), p. 491–498, 2002.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. **Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test.** Anal. Biochem. v. 86(1), p. 271-278, 1978.

MORRIS, G. P. et al. **Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon.** Gastroenterology. v. 96, p. 795-803, 1989.

MUSCH, M. W. et al. **T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.** J. Clin. Invest. v. 110(11), p. 1739-1747, 2002.

- NEMETZ, A. et al. **IL1B gene polymorphisms influence the course and severity of inflammatory bowel disease.** Immunogenetics. v. 49, p. 527–531, 1999.
- NEURATH, M. et al. **TNBS-colitis.** Int. Rev. Immunol. v. 19, p. 51–62, 2000.
- NOSÁL'OVÁ, V. et al. **Effect of Nacetylcysteine on colitis induced by acetic acid in rats.** Gen. Pharmacol. v.35, p. 77–81, 2000.
- OAKLEY, A. J. **Glutathione transferases: new functions.** Curr. Opin. Struct. Biol. v. 15, p. 716-723, 2005.
- OZ, H. S.; ZHONG, J.; DE VILLIERS, W. J. **Osteopontin ablation attenuates progression of colitis in TNBS model.** Dig. Dis. Sci. v. 57, p. 1554–1561, 2012.
- PAIOTTI, A. P. et al. **Effect of COX-2 inhibitor after TNBS-induced colitis in Wistar rats.** J. Mol. Histol. v. 40, p. 317–324, 2009.
- PAUL, G.; KHARE, V.; GASCHÉ, C. **Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10.** European journal of clinical investigation. v. 42(1), p. 95–109, 2012.
- PAWAR, P. et al. **Rectal gel application of *Withania somnifera* root extract expounds anti-inflammatory and mucorestorative activity in TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease.** BMC Complement Altern. Med. v. 11(34), p. 1-9, 2011.
- PEREIRA, J.G. et al. **Polysaccharides isolated from *Digenea simplex* inhibit inflammatory and nociceptive responses.** Carbohydrate Polymers. v. 108, p. 17–25, 2014.
- PILE, J. E. et al. **Interventional Effects of Plumbagin on Experimental Ulcerative Colitis in Mice.** Journal of Natural Products. v. 76(6), p. 1001-1006, 2012.
- PODOLSKY, D. K. **Inflammatory bowel disease.** N. Engl. J. Med. v. 347(6), p. 417-429, 2002.
- POMIN, V. H. **Structural and functional insights into sulfated galactans: a systematic review.** Glycoconjugate Journal. v. 27, p. 1–12, 2010.
- POMIN, V. H.; MOURAO, P.A.S. **Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans.** Glycobiology. v. 18, p. 1016–1027, 2008.
- PORRAS, M; MARTÍN, M. T; TORRES, R; VERGARA, P. **Cyclical upregulated iNOS and long-term downregulated nNOS are the bases for relapse and quiescent phases in a rat model of IBD.** Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. v. 290, p. 423–430, 2006.

PREMANATHAN, M. et al. **Antioxidant & anticancer activities of isatin (1H-indole-2,3-dione), isolated from the flowers of *Couroupita guianensis* Aubl.** Indian. J. Med. Res. v. 136, p. 822–826, 2012.

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

RACHMILEWITZ, D.; KARMELI, F.; OKON, E. **Sulfhydryl Blocker-Induced Rat Colonic Inflammation Is Ameliorated by Inhibition of Nitric Oxide Synthase.** Gastroenterology. v. 109, p. 98-106, 1995.

RAPOSO, F. A. Q. **Doença inflamatória intestinal.** Dissertação de mestrado (Universidade da Beira Interior Faculdade de Ciências da Saúde, Covilhã, Portugal, 2008).

REPKA, J. C. D. et al. **Proposta de um novo modelo experimental de indução de doença inflamatória intestinal.** Acta Cirúrgica Brasileira. v. 19(5), p. 548-554, 2004.

RIGAUD, D. et al. **Controlled trial comparing two types of enteral nutrition in treatment of active Crohn's disease: elemental versus polymeric diet.** Gut. v. 32: p. 1492-1497, 1991.

RODRIGUES, J. A. G. et al. **Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*.** Pharmacological Reports. v. 64, p. 282-292, 2012.

RODRIGUES, J. A. G. et al. **Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*.** Revista Ciência Agronômica. v. 40(2), p. 224-231, 2009.

RODRIGUES, M. et al. **Retocolite ulcerativa inespecífica.** In: Barbieri e Koda (ed.) **Doenças Gastroenterológicas em Pediatria.** São Paulo: Atheneu, v. 1, p. 283, 1996.

SANDS, B. E. **Inflammatory bowel disease: past, present, and future.** J. Gastroenterol. v. 42, p. 16–25, 2007.

SAXON, A. et al. **A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease.** J. Allergy Clin. Immunol. v. 86, p. 202-210, 1990.

SCHMIDT, E. P. et al. **On, Around, and Through: Neutrophil-Endothelial Interactions in Innate Immunity.** Physiology Published. v. 26(5), p. 334-347, 2011.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. **Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent.** Anal. Biochem. v. 24, p. 1992–2005, 1968.

SEKKAL, M.; LEGRAND, P. **A spectroscopic investigation of the carrageenans and agar in the 1500–100 cm<sup>-1</sup> spectral range.** *Spectrochimica Acta. Part. A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* v. 49(2), p. 209–221, 1993.

SHI, X. Z.; WINSTON, J. H.; SARNA, S. K. **Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis.** *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* v. 300, p. 41–51, 2011.

SHI, Y. et al. **Moxibustion activates mast cell degranulation at the ST25 in rats with colitis.** *World journal of gastroenterology: WJG.* v. 17, p. 3733–8, 2011.

SHIVANANDA, S. et al. **Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD).** *Gut.* v. 39, p. 690–697, 1996.

SILVA, M. S. et al. **Anti-inflammatory intestinal activity of *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes in TNBS colitis model.** *Journal of Ethnopharmacology.* v. 128, p. 467–475, 2010.

SILVA, R. O. et al. **A Sulfated-Polysaccharide Fraction from Seaweed *Gracilaria birdiae* Prevents Naproxen-Induced Gastrointestinal Damage in Rats.** *Mar. Drugs.* v. 10, p. 2618-2633, 2012.

SONNENBERG, A. **Geographic variation in the incidence of and mortality from inflammatory bowel disease.** *Dis Colon Rectum.* v. 29, p. 854-61, 1986.

SONNENBERG, A.; WASSERMAN, I.H. **Epidemiology of inflammatory bowel disease among U.S. military veterans.** *Gastroenterology.* v. 101, p. 122–130, 1991.

SORIANO, E. M. et al. **Frontiers on algae bioactive compounds.** *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* v. 21(2), p. 2, 2011.

SOUZA, M. A. L. P. et al. **Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características em um hospital universitário do sudeste do Brasil.** *Arq. Gastroenterol.* v. 39(2), p. 98-105, 2002.

STEVCEVA, L. **The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it.** *BMC Clin Pathol.* v. 1(1), p. 3, 2001.

STROBER, W.; FUSS, I.J. **Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases.** *Gastroenterology.* v. 140, p. 1756–1767, 2011.

SUDHARSANA, S. et al. **Antioxidant and anticoagulant activity of sulfated polysaccharide from *Gracilaria debilis* (Forsskal).** *International Journal of Biological Macromolecules.* v. 81, p. 1031–1038, 2015.

SUZUKI, H. et al. **Sulfhydryl blocker-induced colitis in the rat: immunological changes in thymus gland and colonic mucosa.** J. Gastroenterol. Hepatol. v. 9, p. 544–550, 1994.

SYNYTSYA, A. et al. **Mekabu fucoidan: Structural complexity and defensive effects against avianinfluenza A viruses.** Carbohydrate Polymers. v. 111, p. 633–644, 2014.

SZALAI, Z. et al. **Anti-Inflammatory Effect of Recreational Exercise in 83 TNBS-Induced Colitis in Rats: Role of NOS/HO/MPO System.** Oxidative medicine and cellular longevity, v. 2014, p. 1-11, 2014.

SZKARADKIEWICZ, A. et al. **Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients.** Archivum immunologiae et therapiae experimentalis, v. 57(4), p. 291–294, 2009

TAHAN, G. et al. **Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic acid-induced colitis in rats.** Dig. Dis. Sci. v. 56, p. 715–720, 2011.

TALERO, E. et al. **Acute and chronic responses associated with adrenomedullin administration in experimental colitis.** Peptides. v. 29, p. 2001–2012, 2008.

TAVARES-MURTA, B. M. et al. **Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia.** Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. v.138, p.93–99, 2008.

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

TURNER, J. R. **Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application.** Am. J. Pathol. V. 169(6), 1901-1909, 2006.

USOV, A. I. **Polysaccharides of the red algae.** Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. v. 65, p. 115–217, 2011.

VIJAYABASKAR, P.; VASEELA, N.; THIRUMARAN, G. **Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*.** Chinese Journal of Natural Medicines. v. 10(6), p. 0421–0428, 2012.

VILLANUEVA, R. D.; MONTANO, M. N. E. **Fine chemical structure of carrageenan from the commercially cultivated *kappaphycus striatum* (sacol variety) (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta).** J. Phycol. v. 39, p. 513-518, 2003.

VIVINUS-NEBOT, M. et al. **Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation.** Gut. 2013.

- WALLACE, J. L. et al. **Hapten-Induced Chronic Colitis in the Rat: Alternatives to Trinitrobenzene Sulfonic Acid.** Brief Communication. v. 33, p. 237-239, 1995.
- WEBER, C. R.; TURNER, J. R. **Inflammatory bowel disease: is it really just another break in the wall?** Gut. v. 56, p. 6–8, 2007.
- WENDT, E.; KESHAV, S. **CCR9 antagonism: potential in the treatment of Inflammatory Bowel Disease.** Clinical and Experimental Gastroenterology. v. 8, p.119–130, 2015.
- WIJESEKARA, I.; KIM, S. K. **Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: Prospects in the pharmaceutical industry.** Marine Drugs. v. 8, p. 1080–1093, 2010.
- WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. **Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae.** Carbohydrate Polymers. v. 84, p. 14–21, 2011.
- WIJESEKARA, I.; YOON, N. Y.; KIM, S. K. **Phlorotannins from Ecklonia cava (Phaeophyceae): Biological activities and potential health benefits.** Biofactors. v. 36(6), p. 408-414, 2010.
- WIJESINGHE, W. A. J. P.; JEON, Y. J. **Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review.** Carbohydrate Polymers. v. 88, p. 13–20, 2012.
- WITAICENIS, A. **Estudo comparativo dos efeitos de esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina no modelo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos.** Botucatu: f. 164, 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP.
- WITAICENIS, A. et al. **Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylesculetin, a natural coumarin: Comparison with prednisolone and sulphasalazine.** Chemico-Biological Interactions. v. 195, p. 76–85, 2012.
- XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. **Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease.** Nature. v. 448, p. 427–434, 2007.
- XU, X. R. et al. **Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease.** World J Gastroenterol. v. 20(12), p. 3255-3264, 2014.
- YANG, M. et al. **Effect of Astragalus polysaccharides on expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and NFATc4 in a rat model of experimental colitis.** Cytokine. v.70, p. 81–86, 2014.

YE, H. et al. **Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum***. Food Chemistry. v. 111, p. 428–432, 2008.

ZHANG, Z. et al. **Critical Role of IL-17 Receptor Signaling in Acute TNBS-induced Colitis**. Inflamm. Bowel Disease. v. 12(5), p. 382- 388, 2006.

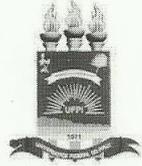
## **ANEXOS**

ANEXO 1. CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM  
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

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 o Projeto intitulado "**Avaliação da participação da via da Hemeoxigenase no possível efeito protetor da Gabapentina na colite induzida por tñbs em ratos**", protocolo nº **011/15**, sob a responsabilidade de **ANDRÉ LUIZ DOS REIS BARBOSA**- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), 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 da 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 19/06/2015.

Vigência do Projeto	<b>Julho/ 2015 à Março/ 2016</b>
Espécie/ linhagem	<b>Rato heterogênico/ wistar</b>
Nº de Animais	<b>72</b>
Peso/ Idade	<b>150-200 g</b>
Sexo	<b>Machos</b>
Origem	<b>Biotério Central do CCA/UFPI</b>

Teresina, 19 de Junho de 2015.

  
Prof.<sup>a</sup> Ivetete L. de Mendonça  
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
Coordenadora

## ANEXO 2. COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA CARBOHYDRATE POLYMERS

15/02/2016

Mensagem de Impressão do Outlook.com

[Imprimir](#)[Fechar](#)

---

### Thank you for your submission to Carbohydrate Polymers

---

**De:** Carbohydrate Polymers (ees.carbpol.0.3754dc.0be4ecfd@eesmail.elsevier.com)  
**Enviada:** segunda-feira, 15 de fevereiro de 2016 18:29:10  
**Para:** andreluiz@ufpi.edu.br  
**Cc:** tarcisio\_biohappy@hotmail.com; clarkfc@gmail.com; renan.oliveira25@yahoo.com.br; junior\_mossoro@outlook.com; simiaojunior11@gmail.com; alv\_17@yahoo.com.br; pedrogsoares@yahoo.com.br; lucianoscsep@hotmail.com; claramyrla@yahoo.com.br; rpaula@dqoi.ufc.br; souzamar.ufc@gmail.com; pfreitas@bioquimica.ufc.br

Dear Dr. Reis Barbosa,

Thank you for sending your manuscript Sulfated polysaccharide from the marine algae Hypnea musciformis inhibits TNBS-induced intestinal damage in rats for consideration to Carbohydrate Polymers. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?

For Carbohydrate Polymers, the average editorial time (in weeks) from submission to first decision is: 5.7  
and from submission to final decision is: 9.01.

What happens next?

Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Elsevier Editorial System (EES).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EES will be "With Editor".
2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of Carbohydrate Polymers, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".

Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".

3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

15/02/2016

Mensagem de Impressão do Outlook.com

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/160/p/8045/](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/)

How can I track the progress of my submission?

You can track the status of your submission at any time at <http://ees.elsevier.com/CARBPOL>

Once there, simply:

1. Enter your username: Your username is: andreluiz@ufpi.edu.br

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/CARBPOL/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/CARBPOL/automail_query.asp)

2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu

3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in Carbohydrate Polymers.

Kind regards,

Professor John Kennedy, Professor Manuel Coimbra

If you require further assistance, you are welcome to contact our Researcher Support team 24/7 by live chat and email or 24/5 by phone: <http://support.elsevier.com>