

Israel Matos

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA MISTURA DE TRITERPENOS  
PENTACÍCLICOS  $\alpha,\beta$ -AMIRINA NO MODELO DE COLITE  
INDUZIDA PELO DSS EM CAMUNDONGOS

Trabalho de Conclusão de Curso  
submetido ao Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do  
Grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas

Orientador: Prof. Dr. João Batista  
Calixto

Florianópolis  
2013



Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Matos, Israel  
EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA MISTURA DE TRITERPENOS  
PENTACÍCLICOS ?,?-AMIRINA NO MODELO DE COLITE INDUZIDA  
PELO DSS EM CAMUNDONGOS / Israel Matos ; orientador, João  
Batista Calixto - Florianópolis, SC, 2013.  
51 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. inflamação intestinal. I.  
Batista Calixto, João. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.



Israel Matos

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA MISTURA DE TRITERPENOS  
PENTACÍCLICOS  $\alpha,\beta$ -AMIRINA NO MODELO DE COLITE  
INDUZIDA PELO DSS EM CAMUNDONGOS

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final pelo curso de graduação em Ciências Biológicas.

Florianópolis, 04 de novembro de 2013.

---

Prof<sup>a</sup>, Dr. Maria Risoleta Freire Marques  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof João Batista Calixto, Dr.  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Allisson Freite Bento, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Rodrigo Marcon, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina



Este trabalho é dedicado aos meus pais  
Laura e Eliézer e à minha avó Elsa.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao meus pais, Laura e Eliézer, por tudo.

Ao professor João João Batista Calixto, por ter me aceito em seu laboratório e ter me orientado com seriedade e rigidez, tornando-me uma pessoa e um profissional melhor.

À minha avó, por todo amor e carinho, sempre.

Aos amigos da graduação: Beatriz, Mariana, Mayara, Carime, Ricardo, Jairo, Piera, Renato, Jonathan, Gilmara, Fred, Ronds pelas risadas e bons momentos durante esses cinco anos de UFSC.

Aos meus amigos Vanessa, Yuri, Mariana e Luís pela amizade incondicional.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas, que me possibilitaram tanto aprendizado durante esses cinco anos de graduação.

Aos amigos do LAFEX: Allisson, Rodrigo, Rafael, Rafaela, Maíra Bicca, Geci, Flávia, Kathryn, Juliana, Edinéia, Fabiana, Robson, Aline, Carol, Jarbas, Ana Flávia, Lizi, Kéllen e Raquel, pelos momentos alegres e convivência no laboratório.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido durante a realização desse trabalho



## RESUMO

A mistura de triterpenos pentacíclicos  $\alpha,\beta$ -amirina, extraída de plantas do gênero *Potrium* já possui propriedades anti-inflamatórias reportadas pela literatura, sendo um potencial composto para o tratamento de diversas condições inflamatórias severas. Evidências recentes indicam que  $\alpha,\beta$ -amirina exerce suas propriedades anti-inflamatória através do sistema canabinoide. Nós verificamos os efeitos da  $\alpha,\beta$ -amirina no processo inflamatório usando o modelo de colite induzida por sulfato de dextrana sódica (DSS) em camundongos e investigamos sua interação com os receptores canabinoides. Nossos resultados mostraram que os tratamentos preventivo e terapêutico reduziram significativamente o índice de atividade da doença, perda de peso, dano no cólon, bem como a atividade das enzimas mieloperoxidase e N-acetilglicosaminidase. Além disso,  $\alpha,\beta$ -amirina reduziu os níveis de fator de necrose tumoral  $\alpha$ , interleucina 1- $\beta$  e da quimiocina CXCL/1, enquanto que aumentou os níveis de interleucina 4. Além disso, também foi observado que  $\alpha,\beta$ -amirina levou à redução significativa dos níveis de RNAm das moléculas de adesão VCAM-1, PCAM-1, integrina-2 $\beta$  bem como marcadores de proliferação celular, como a proteína Ki67, CD68 de macrófagos e P-selectina. De forma interessante, nossos resultados também mostraram que o bloqueio farmacológico do receptor canabinoide 1, mas não do receptor canabinoide 2, reverteu significativamente os efeitos benéficos da administração oral de  $\alpha,\beta$ -amirina na colite induzida por DSS. Além disso, nossos dados demonstraram que tanto os níveis de RNAm como expressão das proteínas MGL1 e FAAH, que degradam endocannabinoides, são significativamente reduzidas no cólon dos animais tratados com  $\alpha,\beta$ -amirina. Juntos, estes resultados sugerem a  $\alpha,\beta$ -amirina como uma potencial ferramenta farmacológica para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

**Palavras-chave:**  $\alpha,\beta$ -amirina, doenças inflamatórias intestinais, sistema canabinoide



## ABSTRACT

The pentacyclic triterpene  $\alpha,\beta$ -amyrin has been previously reported as an effective compound in the treatment of several inflammatory conditions. Recent evidence indicates that  $\alpha,\beta$ -amyrin displayed its effects through interaction with the cannabinoid pathway. We assessed the anti-inflammatory effects of the  $\alpha,\beta$ -amyrin in the dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice and investigated whether its effects were associated with the interaction with the cannabinoid system. Our results showed that the oral preventive or therapeutic treatment with  $\alpha,\beta$ -amyrin significantly reduced disease activity, body weight loss, colonic damage, as well as colonic myeloperoxidase and N-acetylglucosaminidase activities. Moreover,  $\alpha,\beta$ -amyrin decreases the colonic pro-inflammatory mediators tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$  and keratinocyte-derived chemokine (CXCL1/KC), while up-regulating the IL-4 levels. Additionally, we also observed that the  $\alpha,\beta$ -amyrin caused a significant reduction of the adhesion molecules mRNA expression for intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), platelet cell adhesion molecule 1 (PCAM-1),  $\alpha_2$ -integrin and protein expression for proliferation marker Ki67, the macrophage molecule CD68 and for adhesion molecule P-selectin. Interestingly, our results also showed that the cannabinoid receptor 1 (CB1), but not CB2, pharmacological blockade significantly reversed the beneficial effects of  $\alpha,\beta$ -amyrin in DSS-induced colitis. Besides, our data demonstrated that mRNA expression for both the endocannabinoid hydrolase monoglyceride lipase 1 (MGL1) and fatty acid amide hydrolase (FAAH) were significantly reduced in the colon of  $\alpha,\beta$ -amyrin treated mice. Altogether, these results suggest that the  $\alpha,\beta$ -amyrin might possess potential therapeutic interest for the treatment of IBD, and also provide new insights for the underlying mechanisms.

**Keywords:**  $\alpha,\beta$ -amyrin, inflammatory bowel disease, cannabinoid system.



## INTRODUÇÃO

Doença Inflamatória Intestinal (IBD) é um termo genérico empregado para descrever as duas principais formas clínicas que afetam o trato gastrointestinal, que são a Doença de Crohn (CD) e a Colite Ulcerativa (UC). CD é uma condição inflamatória que pode afetar todo o trato gastrointestinal, enquanto que a UC está restrita à região do cólon (Braumgart e Sandborn, 2007; Kaser, 2007). O tratamento atual mais efetivo para as IBDs são anticorpos anti-TNF (Baumgart e Sandborn, 2007), entretanto, seu mecanismo de ação bem como sua efetividade continuam incertos e o seu uso está relacionado com o surgimento de diversos efeitos colaterais (Kaser, 2007; Perrier e Turgeerts, 2011). Portanto, a busca por novos alvos terapêuticos para o tratamento das IBDs tem merecido atenção nos últimos anos, principalmente compostos ativos originados de plantas.

Produtos naturais são fontes atrativas de novos compostos com propriedades terapêuticas que podem ser empregados em diversas doenças (Calixto, 2004). Neste contexto, os triterpenos pentacíclicos são bons candidatos devido a seus diversos efeitos farmacológicos, incluindo propriedades anti-inflamatórias, anti-carcinogênica, antiviral, antibacteriana, anti-nociceptivo, gastroprotetora e hepatoprotetora, além de propriedades citotóxicas e cardioprotetoras (Baltina, 2003; Katerere, 2003; Oliveira, 2004a, 2004b, 2004c; Ukiva, 2002). O triterpeno pentacíclico  $\alpha,\beta$ -amirina é uma mistura (1:1) de dois isômeros, que estão associados com efeitos anti-inflamatórios e anti-nociceptivos, quando utilizados por via oral, principalmente através da diminuição de mediadores pró-inflamatórios, redução da desgranulação de mastócitos e diminuição da migração de células inflamatórias (Medeiros, 2007; Oliveira, 2004a,2005). Estudos recentes têm demonstrado que o efeito anti-inflamatório e anti-nociceptivo da  $\alpha,\beta$ -amirina ocorrem devido a sua habilidade de interagir com o sistema canabinoide (Chicca, 2012; da Silva, 2011).

Canabinoides têm sido usados por milhares de anos devido a suas propriedades psicoativas, entretanto, nos últimos 20 anos a identificação de dois receptores canabinoides, tipo 1 (CB1) e tipo 2 (CB2), ambos ligados à proteína G, têm contribuído enormemente para o entendimento da importância das funções biológicas do sistema canabinoide (Croxford e Yamamura, 2005). Embora as funções dos canabinoides ainda não sejam totalmente entendidas, é bastante aceito que o receptor CB1 é abundante no sistema nervoso central e sua ativação tem sido associada com o controle de doenças neurológicas, mais notavelmente o controle da dor (Croxford, 2003; Paszcuk, 2011). Por outro lado, o receptor CB2 é mais encontrado na periferia e exerce um papel importante no sistema imune tanto no sistema nervoso central quando periférico (Croxford, 2003; Croxford e Yamamura, 2005).

Diversas evidências têm demonstrado que a ativação tanto do receptor CB1 quanto CB2 por agonistas canabinoides seletivos protege contra inflamação intestinal experimental em camundongos (Kimball, 2006). Além disso, um estudo conduzido por nosso grupo mostrou que quando administrado via oral, o sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno, um agonista CB2, leva à melhora da colite induzida por sulfato de dextrana sódica (DSS) e pela colite induzida por oxazolona (Bento, 2011). Neste presente estudo, foi investigado a possível ação anti-inflamatória do tratamento via oral com  $\alpha,\beta$ -amirina na colite induzida por DSS em camundongos e determinado se seu efeito está ou não associado à sua capacidade de interagir com a via canabinoide. Os achados aqui apresentados indicam que quando administrada via oral, a mistura de  $\alpha,\beta$ -amirina melhora a condição de colite causada por DSS, com seus efeitos mediados pela ativação dos receptores CB1 e também pela inibição de enzimas que degradam endocanabinoides.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Foram utilizados camundongos CD1 machos, pesando entre 25 – 30 g obtidos do Biotério setorial do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Os animais foram mantidos em gaiolas isoladas com ventilação, sob condições estéreis com controle de temperatura ( $22 \pm 1$  °C) e umidade (60 – 80%) em ciclo de 12 horas claro/escuro, além de livre acesso à água e ração. Os animais foram aclimatizados por no mínimo dois dias antes do início dos testes. Todos os protocolos usados foram submetidos e aprovados ao comitê de ética local.

### 2.2 Indução da colite experimental induzida por DSS

O protocolo experimental foi conduzido como descrito anteriormente por Ghia (2008). Em resumo, a colite experimental foi induzida em camundongos CD1 machos (5-7 por grupo) oferecendo uma solução de 3% de DSS na água de beber dos animais por um período de 5 dias, que era reposta a cada 48 horas. No final do dia 5 a solução de DSS era substituída por água até o sétimo dia quando os animais foram sacrificados e tiveram os cólons coletados e analisados. O grupo controle recebeu apenas água filtrada do dia 0 ao dia 7. Os animais eram examinados uma vez ao dia quando cada animal recebeu um escore para consistência das fezes, presença de sangue fecal e perda de peso. Estes eventos são utilizados para determinar o Índice de Atividade da Doença (IAD) como descrito anteriormente (Bento, 2011; Ghia, 2008). Os escores foram definidos da seguinte forma: a perda de peso recebia escore zero caso o peso corporal do animal mudasse 1% do peso inicial; 1 para uma mudança de 1-5%; 2 para uma mudança de 5-10%; 3 para 10-15%; e 4 para uma perda superior a 15%. A consistência das fezes recebia escore zero para ausência de diarreia; 2 para fezes com bolos fecais úmidos e frouxamente formados; e 4 para bolos fecais amorfos, úmidos e pegajosos. A presença de sangue fecal recebia escore de zero para ausência de sangue; 2 para sangramento não evidente

(sangue oculto); e 4 para sangramento evidente. No final do dia 7, os cólons foram analisados considerando a consistência das fezes em seu interior, a espessura do cólon e o seu crescimento (a partir de 1 cm acima do ânus até o cécum). Estes três aspectos foram utilizados para medir o dano macroscópico de cada animal. Somado a isto, a porção distal de cada cólon foi imediatamente separada e fixada em uma solução de formaldeído 4%, embebido em parafina e depois seccionada em cortes de 5  $\mu$ m de espessura antes de serem desparafinizados. Os cortes foram corados com uso da técnica padrão de H&E e foram utilizados para definir o escore microscópico como descrito anteriormente por Kimball (2004).

### 2.3 Tratamentos

A série de tratamentos a seguir foi designada para investigar a propriedade anti-inflamatória da mistura de  $\alpha,\beta$ -amirina na colite induzida por DSS em camundongos. A mistura de 1:1 de  $\alpha,\beta$ -amirina foi diluída em 5% Tween 80 mais 5% etanol em solução salina (PBS). Os animais foram tratados duas vezes ao dia por via oral (gavagem) com 1, 3 ou 10 mg/kg do dia 0 ao dia 7 (tratamento preventivo) ou 10 mg/kg do dia 3 ao dia 7 (tratamento terapêutico). Para avaliar a possível relação entre  $\alpha,\beta$ -amirina e o sistema canabinoide, outro grupo de experimentos foram conduzidos com camundongos que receberam AM251, o antagonista seletivo do CB1 (10 mg/kg i.p.) ou AM630, o antagonista seletivo do CB2 (10 mg/kg i.p.) uma vez ao dia, 30 minutos antes do primeiro tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (10 mg/kg) do dia 0 ao dia 7. As doses de  $\alpha,\beta$ -amirina, AM251 e AM630 foram selecionadas baseadas em estudos anteriores (Bento, 2011; Storr, 2009). Grupo controle recebeu solução veículo apenas.

### 2.4 MPO e NAG

A migração de neutrófilos e de macrófagos para o tecido do cólon foi quantificada indiretamente através da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG), respectivamente. Para isso, os cólons

foram removidos, limpos, homogeneizados em tampão EDTA/NaCl (10 mM; pH 4,7) e centrifugados a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado resultante foi re-suspendido em 111 µL de tampão 1 gelado (NaCl 0,1M; NaPO<sub>4</sub> 0,02 M; EDTA sódico 0,015 M; pH 7,4) ao qual foi adicionado 333 µL de NaCl 0,2% gelado e, após 30 segundos, 333 µL de NaCl 1,6% contendo glicose 5% (gelado). A solução foi centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado formado foi outra vez suspenso em tampão 2 gelado (NaPO<sub>4</sub> 0,5 M e 5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB); pH 5,4). As amostras obtidas foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas em banho Maria (37°C), sendo esse procedimento repetido 3 vezes. Após o último descongelamento, as amostras foram centrifugadas novamente a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C, e 25 µl do sobrenadante foram utilizados para o ensaio de atividade da MPO e da NAG.

A reação enzimática para análise da atividade da MPO foi realizada na presença de tetrametilbenzidina (TMB) 1,6 mM, NaPO<sub>4</sub> 80 mM e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,3 mM. A absorbância foi medida por espectrofotometria em 690 nm e os resultados foram expressos como densidade ótica por miligrama de tecido.

A atividade da NAG foi mensurada adicionando-se 2.25 mmol/L de p-nitrofenil-2-acetamido-β-glicopiranosido e 100 µL com 50mmol/L de tampão citrato (pH 4,5). A absorbância foi medida através de um espectrofotômetro com comprimento de onda de 405 nm e os resultados também foram expressos em densidade ótica por miligrama de tecido.

## 2.5 Determinação dos níveis de citocinas

Os níveis teciduais de IL-1β, TNF-α, CXCL1/KC e IL-4 foram avaliados como descrito anteriormente, com poucas modificações. Resumidamente, os cólons foram removidos e homogeneizados em solução salina tamponada com fosfato (PBS, composição: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM, pH 7,2-7,4), contendo Tween 20 (0,05%), fluoreto de fenilmetilsulfonila 0,1 mM, cloreto de benzometônio 0,1 mM, EDTA sódico 10 mM, e aprotinina A 2 ng/mL. O homogenato foi centrifugado a 3.000 x g por 10 minutos a 4°C, e o

sobrenadante armazenado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise. A dosagem de proteínas existentes nas amostras foi realizada segundo o método de Bradford (1976). Os níveis das citocinas foram determinados utilizando-se *Kits* específicos de ELISA (*enzyme-linked immuno-sorbent assay*), de acordo com as recomendações do fabricante.

## 2.6 Extração de RNA e PCT em Tempo Real

### 2.6.1. Extração do RNA total

A extração do RNA total será realizada através da homogeneização dos tecidos (côlon) em 1 mL de reagente de TRizol® (Invitrogen, SP, Brazil), conforme recomendações do fabricante. Para isso serão adicionados 200 $\mu\text{L}$  de clorofórmio ao homogenato, sendo este posteriormente submetido à agitação e centrifugação (12.000 x g, 15 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A fase aquosa contendo o RNA será transferida para um novo tubo, ao qual serão adicionados 500  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico. O conteúdo do tubo será misturado por inversão e posteriormente mantido em repouso à temperatura ambiente por 10 min. A mistura será centrifugada (12.000 x g, 15 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), sendo o pellet resultante ressuspenso em 1 mL de etanol gelado. O RNA será novamente centrifugado (7.000 x g, 5 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), o etanol desprezado e o pellet será dissolvido em água ultra pura (Invitrogen®). A concentração e a pureza do RNA serão determinadas em espectrofotômetro pela absorbância a 260 nm ( $A_{260}$ ) e pela razão das absorbâncias  $A_{260}/A_{280}$ , respectivamente. O RNA será aliqotado e estocado em freezer a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

### 2.6.2. Confeção do DNA complementar (*Reação de Transcrição Reversa*)

A fim de determinar a expressão do RNAm de citocinas no côlon de camundongos, será realizado o ensaio de transcrição reversa seguido pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Para a reação da transcrição reversa, as amostras contendo 300ng de RNA total foram incubadas com 1 $\mu\text{L}$  de oligo dT 15, 1  $\mu\text{L}$  do mix de dNTP (10 mM) e com água ultra pura para um volume final de 12  $\mu\text{L}$ . Essas

amostras foram aquecidas por 5 min a 65 °C, resfriadas por 5 min a 4 °C e acrescidas de 4µL de tampão de primeira fita (Tris-HCl 250mM, pH 8.3, KCl 375 mM e MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 2µl de DTT 0,1 mM, e 1µL de inibidor de RNase (2500 U). Posteriormente, essa mistura será incubada a 37 °C por 2 min e a enzima M-MLV (1 µL, 200 U) adicionada. Após a adição da enzima, as amostras serão mantidas a 37 °C por 50 min e a inativação da reação será realizada por incubação a 75 °C por 15 min. O DNA complementar (DNAc) será estocado a 4 °C até a realização da reação de PCR em tempo real.

### *2.6.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real*

O DNAc será amplificado em duplicada utilizando o kit Master Mix TaqMan® Universal PCR, com primers específicos para camundongos, com marcação 3'quencher MGB e FAM, para os alvos e GAPDH (NM\_008084.2), o qual será utilizado como controle endógeno. A reação de PCR será realizada em uma placa de reação óptica de 96 poços. Cada reação conterà: 1 µL de DNAc, 5 µL de master mix, 0,5 µL de primer e 3,5 µL de água ultra pura, em um volume final de 10 µL. As amplificações serão realizadas em um termociclador (StepOne Plus, Applied Biosystems) para 40 ciclos. A fluorescência será coletada a cada ciclo de amplificação e os dados serão analisados utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para a quantificação relativa.

## 2.7 Análise Imuohistoquímica

A expressão dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> será detectada em cortes histológicos confeccionados a partir de blocos de parafina contendo amostras da porção final do cólon. Os cortes teciduais de espessura de 5µm serão mantidos em estufa a uma temperatura de 70-90 °C até a completa fusão da parafina ao redor dos cortes. Posteriormente os tecidos serão desparafinizados em xilol (xileno) e hidratados por passagens sucessivas em etanol seguindo concentrações decrescentes (100%, 90 %, 80 % e finalmente etanol 70 %). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos será realizado com o objetivo de eliminar o desenvolvimento de reações inespecíficas falso-positivas. Para tanto, as

lâminas serão imersas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 1,5 % em metanol absoluto (v/v) por 20 min, com posterior lavagem em água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas serão submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formaldeído e parafina. Para este fim, será preparada uma solução composta por 180 mL de ácido cítrico 0,1 M e 820mL de citrato de sódio 0,1M; pH 6,0. As lâminas serão imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada, e mantidas em banho-maria ajustado para 95-98 °C, durante 45 min. Logo após, ainda como parte do processo de reativação antigênica através do calor, as lâminas serão retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 min à temperatura ambiente, e posteriormente lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, estas serão submersas em PBS.

Os anticorpos primários serão diluídos em Solução Reinascence (Biocare Medical, Concord, CA, EUA). A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas serão mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2-8 °C, durante 12-16 horas. A seguir, as lâminas serão lavadas com PBS à temperatura ambiente. Após lavagem, as lâminas serão incubadas com um polímero de detecção (PicTure™ MAX Polymer detection kit), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras serão então submetidas a uma revelação colorimétrica com *kit* comercial, através de uma solução cromógena contendo 0,03% de 3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahydroclorídrico (DAB). Após a revelação, serão realizadas: a contracoloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris; a desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70 %, etanol 80 %, 90 % e etanol absoluto); a diafanização em xilol e a montagem em ENTELLAN®. A leitura das lâminas será realizada em microscópio óptico (Leica, São Paulo, SP), em aumento de 200 x, sendo analisados todos os campos da lâmina. As imagens serão registradas com auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, USA). O resultado positivo será revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelos anticorpos. Serão analisados três cortes histológicos da

amostra de cada animal, sendo que cada grupo experimental será constituído de, no mínimo, três animais. Os resultados serão expressos em unidades arbitrárias. Todos os grupos experimentais serão processados sob as mesmas condições experimentais. As configurações para aquisição das imagens serão idênticas para todos os tecidos. As imagens serão transferidas para um computador onde a intensidade da coloração dos pixels para o CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> serão calculadas para cada imagem utilizando o software NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

## 2.8 Drogas e reagentes

DSS (w/v, 30.00-50.000) foi obtido da MP Biomedicals (Solon, OH, EUA).  $\alpha,\beta$ -amirina (mistura 1:1) foi isolada da resina da planta *Protium kleinii* como descrita anteriormente, com pureza de 95% (Otuki, 2005a; Vitor, 2009). O antagonista seletivo do receptor CB1 (AM251) e CB2 (AM630) foram obtidos da Tocris Bioscience (Ellisville, MO, EUA). Formaldeído foi obtido de Merck (Frankfurt, Darmstadt, Alemanha). Peróxido de hidrogênio, Tween 20, Tween 80, EDTA, aprotinina, PBS, H&E e tetrametilbenzidina foram comprados de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Kits TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL1/KC e IL/4 foram comprados de R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA). Primers para camundongos TNF $\alpha$ , CXCL1/KC, VCAM-1, ICAM-1, PCAM-1, Integrina- $\beta$ 2, MGL1, FAAH, CB1 e GAPDH (NM\_008084.2) e TagMan Universal PCR Master Mix foram comprados da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). Anti-Ki67 foi comprado de Abcam (Cambridge, MA, EUA) e anti-CD-88 obtido da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). Anticorpos secundários EnVision Plus, estreptavidina-HRP e cromógeno 3.3-diaminobenzidina foi comprado da Dako Cytomation (Carpinteria, CA, EUA).

## 2.9 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média e seus respectivos limites de confiança, em nível de 95%. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio de análise de variância

(ANOVA), seguida pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método de *Newman Kewls*, quando apropriado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como indicativos de significância. O software utilizado para análise foi o “Graph Pad Prism®” versão 4.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 O tratamento com $\alpha,\beta$ -amirina melhora tanto o índice de atividade da doença como o dano no cólon na colite induzida por DSS

Sabe-se que camundongos tratados com DSS 3% desenvolvem uma doença caracterizada por diarreia com sangue e perda de peso expressiva (Wang, 2011). Para verificar o potencial efeito dos triterpenos pentacíclicos  $\alpha,\beta$ -amirina na colite induzida por DSS, os animais foram tratados com diferentes doses (1, 3 e 10 mg/kg) duas vezes ao dia do dia 0 ao dia 7 (tratamento preventivo). Nossos resultados mostram que a dieta que incluiu DSS levou a uma perda de peso significativa, bem como um aumento do dano macroscópico e redução do cólon (Figura 1A-D). Entretanto, o tratamento preventivo com  $\alpha,\beta$ -amirina (1-10 mg/kg via oral) resultou em uma redução significativa do IAD e protegeu significativamente os animais de uma perda de peso expressiva, dano macroscópico e redução do comprimento do cólon. Somado a isto, o tratamento terapêutico (do dia 3 ao dia 7) com  $\alpha,\beta$ -amirina (10 mg/kg via oral) também reduziu significativamente os sinais inflamatórios do modelo de colite, como o IAD, perda de peso corporal, dano macroscópico e encurtamento do cólon (Figura 1A-D).

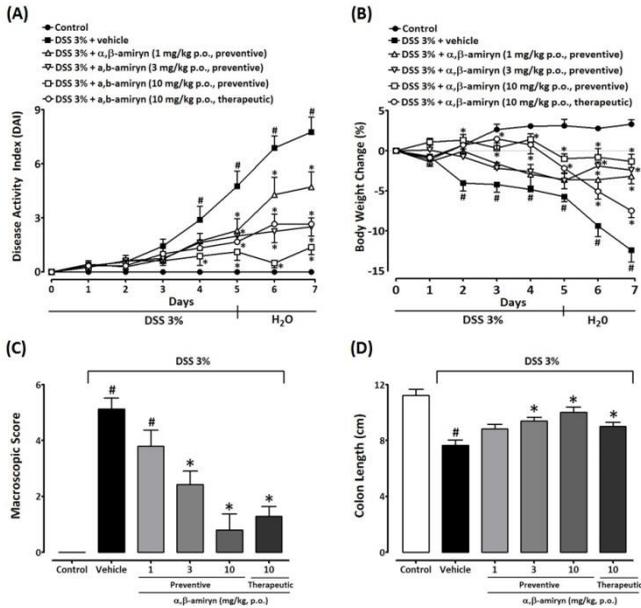


Figura 1.  $\alpha,\beta$ -amirina protege contra a colite induzida pelo DSS. Camundongos receberam DSS (3%) por 5 dias e água filtrada por mais dois dias. Os animais foram tratados por gavagem com uma dose de 1, 3 ou 10 mg/kg de  $\alpha,\beta$ -amirina duas vezes ao dia do dia 0 ao dia 7 (tratamento preventivo) ou com 10 mg/kg do dia 3 ao dia 7 (tratamento terapêutico). Ambos os tratamentos reduziram os danos o índice de atividade da doença (A), perda de peso (B), dano macroscópico no cólon (C) e aumentam a comprimento do cólon (D) quando comparados com o grupo controle. Cada coluna representa a média com seu desvio. 5-7 animais por grupo. # $P < 0.05$  em relação ao grupo controle; \* $P < 0.05$  em relação ao grupo tratado com DSS.

### 3.2 Tratamento com $\alpha,\beta$ -amirina reduz a infiltração de células inflamatórias e melhora o dano microscópico no cólon.

Trabalhos anteriores mostram que o dano no cólon na colite induzida por DSS está diretamente relacionado à infiltração massiva de leucócitos na mucosa intestinal (Baumgart e Carding, 2007). Por este motivo, foi verificado se os efeitos anti-inflamatórios da administração via oral de  $\alpha,\beta$ -amirina estava associada com alterações na infiltração celular no cólon. Sete dias após o início do tratamento com DSS, a

infiltração de neutrófilos e monócitos na mucosa intestinal foi indiretamente verificada através da atividade das enzimas MPO e NAG, respectivamente (Figura 2A e 2B). Tanto o tratamento preventivo quanto o tratamento terapêutico com  $\alpha,\beta$ -amirina (10mg/kg) reduziu significativamente tanto a atividade da enzima MPO quanto da NAG (Figura 2A e 2B).

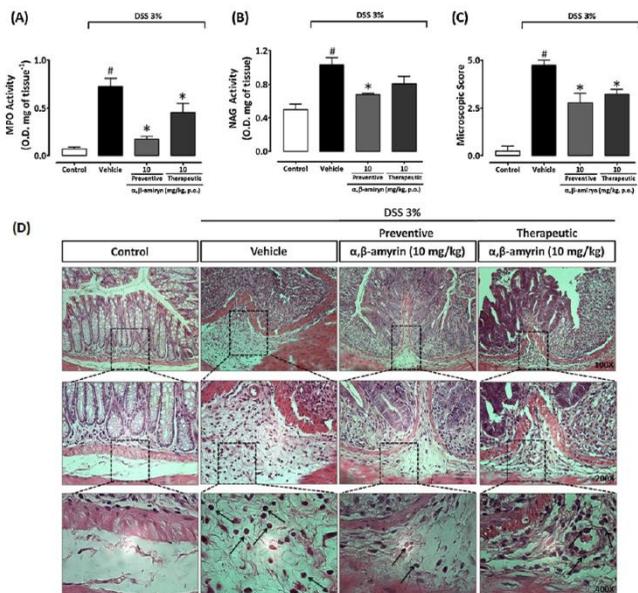


Figura 2  $\alpha,\beta$ -amirina reduz o filtrado celular e melhora o dano microscópico no cólon. Sete dias após o tratamento via oral com  $\alpha,\beta$ -amirina, os cólons foram processados para avaliação histológica e medição da atividade das enzimas MPO e NAG. Ambos os tratamentos com  $\alpha,\beta$ -amirina (10 mg/kg) reduziram a atividade da MPO (A) e da NAG (B). Além disso, diminuíram o dano microscópico (C). Cada coluna representa a média com seu desvio. 5-7 animais por grupo. <sup>#</sup>P<0.05 em relação ao grupo controle; <sup>\*</sup>P<0.05 em relação ao grupo tratado com DSS.

Somado a isto, os tecidos foram processados para observação histológica e são apresentados em três aumentos diferentes (100x, 200x e 400x). Nos cólons do grupo controle, nenhuma alteração histopatológica foi observada. Entretanto, os cortes corados em H&E revelaram uma pronunciada infiltração celular na lamina própria e

mucosa intestinal no grupo tratado somente com DSS. Além disso, este grupo apresentou um espessamento da mucosa e, às vezes, ulcerações, mostrando uma distorção das criptas intestinais e uma massiva infiltração polimorfonuclear (PMN), as quais resultaram no dano microscópico (Figura 2C e 2D). Por outro lado, a avaliação histológica dos cólons tratados tanto com o tratamento preventivo quanto terapêuticos (10 mg/kg via oral) revelaram uma redução da resposta inflamatória, resultando na diminuição da infiltração de leucócitos e redução do dano tecidual microscópico comparado com os animais que receberam apenas DSS (Figura 2C e 2D).

### 3.3 O tratamento com $\alpha,\beta$ -amirina reduz os níveis de mediadores pró-inflamatórios no cólon e aumenta os níveis de IL-4 em camundongos.

Tem sido descrito que a colite induzida por DSS causa um influxo de células inflamatórias na mucosa intestinal, que está relacionado diretamente com o aumento da produção de diversos mediadores pró-inflamatórios, tanto pelas células epiteliais como por células inflamatórias residentes e recrutadas (Rogler e Andus, 1998). Nossos resultados mostram que o tratamento com DSS resultou em um aumento significativo dos níveis de citocinas como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , além da quimiocinas CXCL1/KC (Figura 3A-C). Da mesma forma, DSS induziu um aumento significativo de RNAm para CXCL1/KC, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Figura suplementar 1A e 1B). Tanto o tratamento preventivo quanto terapêutico com  $\alpha,\beta$ -amirina (10mg/kg) reduziu significativamente tanto os níveis de proteínas quanto o de RNAm de TNF- $\alpha$  e CXCL1/KC (Figura 3A e 3B e Figura suplementar 1A e 1B). O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina também reduziu os níveis de IL-1 $\beta$  no tratamento preventivo, mas não no terapêutico (Figura 3B). Além disso, foram medidos os níveis da produção de IL-4 no cólon, já que este mediador está associado com a resolução da colite (Bento, 2011). Nossos resultados mostram que o tratamento com DSS não alterou significativamente comparado com o grupo controle no tratamento preventivo (Figura 3D). Entretanto,  $\alpha,\beta$ -amirina (10 mg/kg) no regime terapêutico, aumentou significativamente os níveis de IL-4 no cólon dos animais com colite induzida por DSS, sugerindo que IL-4 pode estar

envolvida com os efeitos anti-inflamatórios desencadeados pela  $\alpha,\beta$ -amirina (Figura 3D).

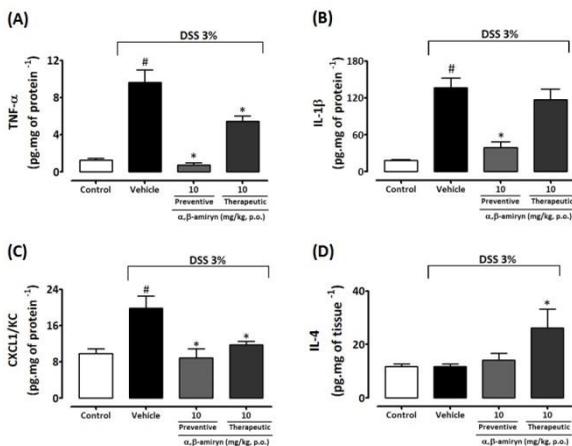


Figura 3. O tratamento preventivo e terapêutico com  $\alpha,\beta$ -amirina reduz os níveis de mediadores inflamatórios. No final do sétimo dia, os cólons foram processados e avaliados. Ambos os tratamentos (10 mg/kg) reduziram os níveis de TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), CXCL1/KC (C) e aumentaram a IL-4 (D) quando analisados por ELISA. Cada coluna representa a média com seu desvio. 5-7 animais por grupo. #P<0.05 em relação ao grupo controle; \*P<0.05 em relação ao grupo tratado com DSS.

### 3.4 O tratamento preventivo com $\alpha,\beta$ -amirina reduz a expressão de moléculas de RNAm para moléculas de adesão no cólon

Sabendo que o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina reduziu a infiltração de leucócitos na mucosa intestinal, foi verificado se esta diminuição estava associada com a inibição de moléculas de adesão no cólon. Nossos resultados mostram que o tratamento com DSS aumenta expressivamente a expressão de RNAm para moléculas de adesão, tais como VCAM-1, ICAM-1, PCAM-1 e  $\beta$ 2-integrina (Figura 4A-D). Como mostrado na Figura 4, o tratamento preventivo via oral com  $\alpha,\beta$ -amirina (10 mg/kg) resultou em uma diminuição significativa de RNAm

para moléculas de adesão VCAM-1 (A), ICAM-1 (B), PCAM-1 (C) e  $\beta$ 2-integrina (D) na colite induzida por DSS. Estes dados sugerem que há uma importante correlação entre a redução do infiltrado celular e a expressão de moléculas de adesão, um evento que pode ter contribuído para a melhora da colite.

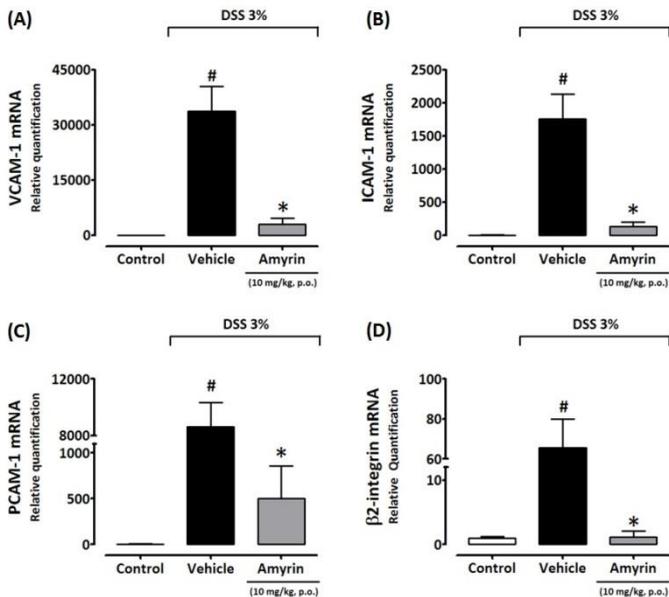


Figura 4. O tratamento via oral com  $\alpha,\beta$ -amirina diminui os níveis de moléculas de adesão na colite induzida por DSS. No final do sétimo dia, os cólons foram coletados e processados para avaliação de RNAm para moléculas de adesão celular. O tratamento preventivo com  $\alpha,\beta$ -amirina (10 mg/kg) reduziu os níveis de VCAM-1 (A), ICAM-1 (B), PCAM-1 (C) e  $\beta$ 2-integrina (D) quando analisados por PCR em tempo real. Cada coluna representa a média com seu desvio. 5-7 animais por grupo. #P<0.05 em relação ao grupo controle; \*P<0.05 em relação ao grupo tratado com DSS.

3.5 O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina reduz a coloração para marcadores de proliferação celular, adesão celular e infiltração de macrófagos.

Como mostrado anteriormente, o influxo celular é um passo crucial para a inflamação intestinal, bem como a proliferação celular e a adesão. Ki67 é uma proteína nuclear necessária para a proliferação celular (Gerder, 1984) e CD68 é um marcador clássico de macrófagos (Kunz-Schughart, 2003). Além disso, P-selectina é também uma importante molécula de adesão celular envolvida na transmigração no intestino inflamado (Schurmann, 1995). Por estes motivos, foi verificado o papel da  $\alpha,\beta$ -amirina na expressão de Ki67, CD68 e P-selectina na colite induzida por DSS. Como mostrado na figura 5, a dieta com DSS induziu um aumento significativo em Ki67, CD68 e P-selectina no cólon, quando comparados com o grupo controle. Entretanto, o tratamento preventivo via oral com  $\alpha,\beta$ -amirina reduziu significativamente a presença de todos estes marcadores (Figura 5A-D). De fato, os efeitos anti-inflamatórios da  $\alpha,\beta$ -amirina parece estar relacionado com o influxo celular no cólon, o que pode levar a uma redução da proliferação celular e levar ao uma melhora na inflamação intestinal.

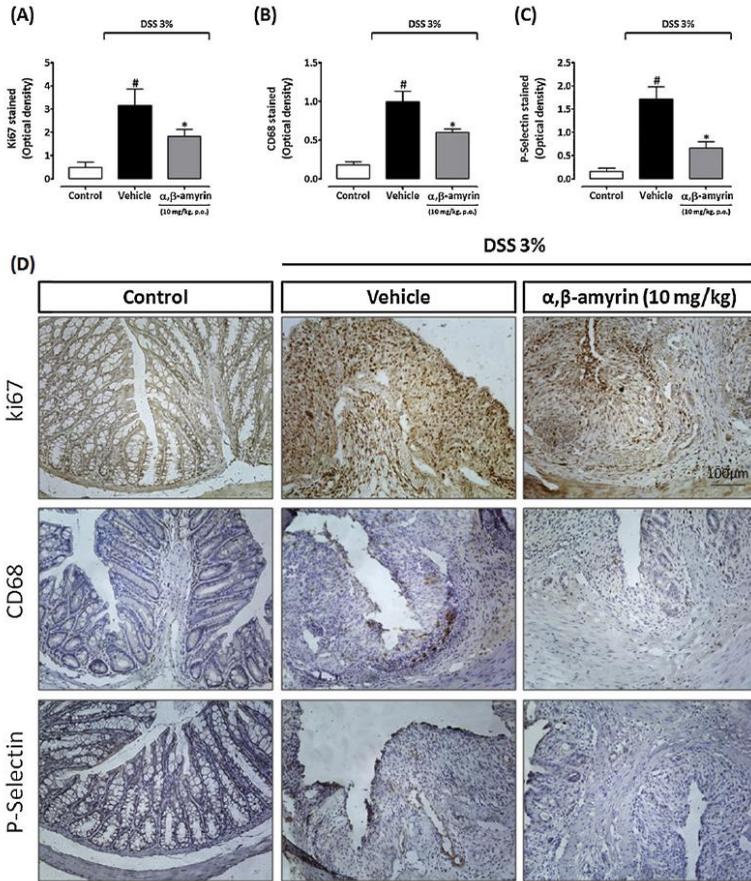


Figura 5. O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina reduz Ki67, CD68 e P-selectina no c33lon. Ap33s o s33timo dia de tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina, amostras de c33lon foram processadas para an33lise imunohistoqu33mica. O tratamento via oral com  $\alpha,\beta$ -amirina (10 mg/kg) reduziu significativamente a marca33o do marcador de prolifera33o Ki67 (A), do marcador de macr33fago CD68 (B) e da mol33cula de ades33o P-selectina (C). A m33dia de intensidade da colora33o de Ki67, CD68 e P-selectina foram determinadas fazendo an33lise de imagens e foram arbitrariamente representadas em (D). Cada coluna representa a m33dia com seu desvio. 5-7 animais por grupo. <sup>#</sup>P<0.05 em rela33o ao grupo controle; <sup>\*</sup>P<0.05 em rela33o ao grupo tratado com DSS.

### 3.6 Os efeitos da mistura de $\alpha,\beta$ -amirina é dependente da via canabinoide

Publicações recentes do nosso grupo de pesquisa sugerem que a atividade anti-inflamatória da mistura de  $\alpha,\beta$ -amirina é dependente, pelo menos em parte, de uma interação com os receptores CB1 e CB2 (da Silva, 2011). Além disso, outras publicações mostram que a  $\alpha,\beta$ -amirina parece estar relacionada com a inibição de hidrolases de endocanabinoides (Chicca, 2012). Por este motivo verificamos se o bloqueio farmacológico dos receptores CB1 e CB2 poderia reverter os efeitos benéficos da mistura de  $\alpha,\beta$ -amirina na colite induzida por DSS. Nossos dados sugerem que o tratamento sistêmico com AM251 (10 mg/kg i.p.), um antagonista seletivo do receptor CB1, parcialmente, mas ainda assim significativamente, reverte o índice de atividade da doença seguida pelo tratamento via oral com  $\alpha,\beta$ -amirina na colite induzida por DSS (Figura 6A). Por outro lado, o tratamento com AM630 (10 mg/kg i.p.), um antagonista seletivo do receptor CB2, não altera o efeito protetor da  $\alpha,\beta$ -amirina bem como seus efeitos anti-inflamatórios (Figura 6B).

Em seguida foi avaliado se o tratamento via oral com  $\alpha,\beta$ -amirina poderia interferir com a expressão de RNAm para as hidrolases de endocanabinoides, como a lipase monogliridio 1 (MGL1) e a hidrolase amida de ácidos graxos (FAAH). Resultados mostrados na Figura 6C e 6D mostram que o tratamento preventivo com  $\alpha,\beta$ -amirina (10 mg/kg) levou a uma redução da expressão de RNAm tanto de MGL1 quanto de FAAH, sugerindo que os efeitos benéficos da  $\alpha,\beta$ -amirina na colite induzida por DSS possa estar relacionada com a modulação da expressão das hidrolases endocanabinoides. Além disso, investigamos a expressão de receptores CB1 no cólon normal e no cólon inflamado. Nossos resultados mostraram que os animais tratados com DSS apresentam um aumento significativo de RNAm para receptores CB1 quando comparado com o grupo controle (Figura 6E).

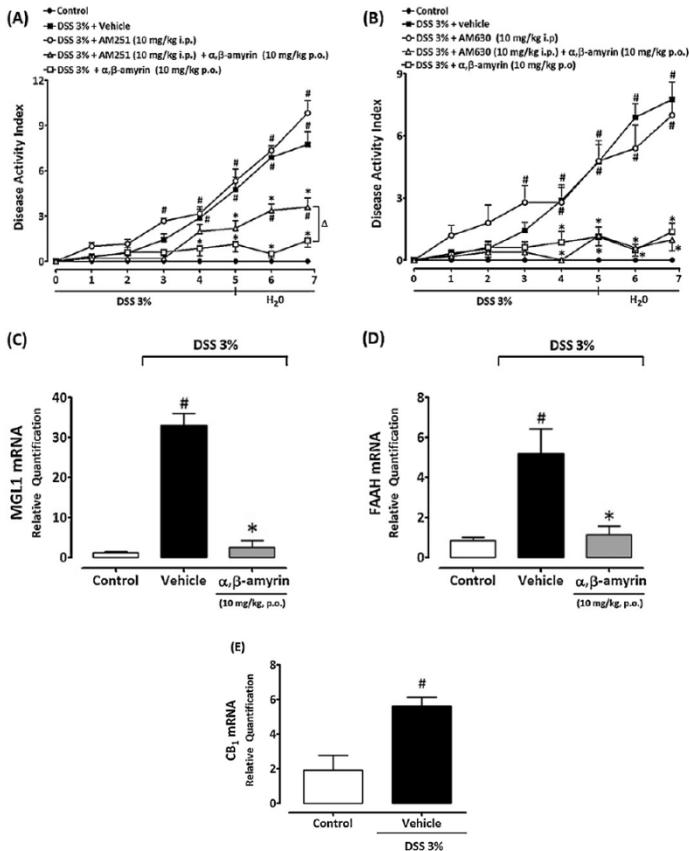


Figura 6. O antagonismo do receptor CB1, mas não do CB2, reverte o efeito anti-inflamatório da  $\alpha,\beta$ -amirina. O tratamento preventivo via oral com  $\alpha,\beta$ -amirina (10 mg/kg) melhora significativamente o índice de atividade da doença, mas o tratamento com o antagonista seletivo para o receptor CB1, o AM 251, impediu a melhora do índice de atividade da doença (A). Entretanto, o bloqueio dos receptores CB2 com o seu antagonista seletivo, o AM630, não reverteu os efeitos benéficos da  $\alpha,\beta$ -amirina. No final do sétimo dia, foi encontrando um aumento dos níveis de RNAm para as hidrolases de endocanabinoides MGL1 (C) e FAAH (D) nos animais tratados somente com DSS, entretando a  $\alpha,\beta$ -amirina reduziu a expressão destas enzimas (C,D). Os animais tratados com DSS mostraram um aumento significativo do receptor CB1 no cólon quando comparados com o grupo controle. Cada coluna representa a média com seu desvio. 5-7 animais por grupo. # $P < 0.05$  em relação ao grupo controle; \* $P < 0.05$  em relação ao grupo tratado com DSS.

## 4 DISCUSSÃO

Recentemente, grandes esforços têm sido realizados para encontrar novas formas de tratamento para as doenças inflamatórias intestinais. Neste contexto, compostos derivados de plantas, como os triterpenos, têm se revelado como moléculas bastante promissoras para o tratamento de doenças inflamatórias e de dor. No presente trabalho, foi mostrado que a mistura de isômeros pentacíclicos  $\alpha,\beta$ -amirina (1:1) apresenta uma propriedade anti-inflamatória quando administrada via oral no modelo de colite induzida por DSS, um modelo de inflamação intestinal bastante difundido, reduzindo a infiltração de leucócitos, produção de citocinas pró-inflamatórias e inibição da expressão de moléculas de adesão, levando a uma atenuação da colite. Além disso, confirmando e estendendo achados anteriores, os resultados aqui apresentados demonstram que a mistura de  $\alpha,\beta$ -amirina exerce seu efeito benéfico através de mecanismos envolvidos com a via canabinoide.

Os efeitos anti-inflamatórios e anti-nociceptivos da mistura de  $\alpha,\beta$ -amirina têm sido descritos em diferentes modelos (Medeiros 2007; Otuki 2005a, 2005b; Vitor 2009). Além disso, de forma particular, publicações recentes de nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que  $\alpha,\beta$ -amirina, quando administrada por via oral, protege camundongos contra a colite induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzeno (TNBS) em diferentes doses que não apresentaram evidência de efeitos toxicológicos (Vitor 2009). Existe um aumento crescente de experimentos indicando que a colite induzida por TNBS é um modelo eficiente para o estudo de respostas dependentes de células T helper na mucosa intestinal, enquanto que a colite induzida por DSS está associada principalmente com mecanismos de resposta inata (Wirtz, 2007) e acredita-se que simula a colite ulcerativa que ocorre em humanos (Boismenu e Chen, 2000). Devido a estas diferenças entre os dois modelos e considerando o fato de que a colite induzida por DSS é o modelo animal para inflamação intestinal mais utilizado, decidimos

investigar o potencial efeito anti-inflamatório da mistura de  $\alpha,\beta$ -amirina e seus possíveis mecanismos de ação neste modelo.

O efeito da administração oral de DSS em camundongos por alguns dias é caracterizado por uma diarreia com sangue intensa, perda de peso expressiva e uma infiltração massiva de granulócitos que resulta em dano no cólon e aumento da atividade da doença (Boismenu e Chen, 2000; Wirtz, 2007). Nossos resultados estão de acordo com estes achados anteriores, já que o DSS causa um aumento significativo no IAD e perda de peso corporal, o qual está associado com o dano do cólon e seu encurtamento. Como demonstrado anteriormente, o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina diminuiu consistentemente todos estes parâmetros recuperando a aparência saudável dos animais, similar ao grupo controle. De fato, nossos dados anteriores mostram que o tratamento preventivo e terapêutico com  $\alpha,\beta$ -amirina melhora os sinais inflamatórios causados pela colite induzida pelo TNBS, e protege camundongos contra danos no cólon (Vitor 2009). Efeitos estes associados com a habilidade de reduzir a infiltração de polimorfonucleares e macrófagos no cólon.

O influxo descontrolado de leucócitos no tecido inflamado é um dos eventos mais típicos na patogênese das doenças inflamatórias intestinais (Kaser, 2010). Muitos trabalhos sugerem que células PMN estão diretamente relacionadas com o dano causado no cólon, evento que está associado com a má nutrição levando à perda de peso (Bento, 2008; Brown e Mayer, 2007; Ray, 2012). Nossos dados sugerem que o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina reduz significativamente a atividade das enzimas MPO e NAG, que são marcadores indiretos da atividade de neutrófilos e macrófagos, respectivamente, e também reduziu a marcação de CB68, um medidor direto de macrófago. Além disso,  $\alpha,\beta$ -amirina também foi efetiva para reduzir tanto a migração de PMN quanto a infiltração de leucócitos quando verificado por análises microscópicas. Da mesma forma, Vitor em colaboradores (2009) demonstraram que o tratamento via oral com  $\alpha,\beta$ -amirina de fato reduz os níveis de MPO no cólon de camundongos com colite induzida por

TNBS, um efeito que pode estar relacionado com a redução da infiltração de PMN. Além disso, outros estudos mostram que a  $\alpha,\beta$ -amirina também reduz a atividade da MPO na peritonite experimental (Holanda Pinto, 2008), no edema de orelha induzida por TPA (Otuki, 2005b) e na pancreatite experimental (Melo, 2010, 2011), sugerindo que este triterpeno pentacíclico tem um papel importante no controle do influxo celular.

Há um aumento crescente de evidências mostrando que o aumento da infiltração de leucócitos na mucosa intestinal causa uma produção massiva de citocinas pró-inflamatórias, o que contribui para o dano no cólon (Rogler e Andus, 1998; Strober e Fuss, 2011). Nossos dados sugerem que o tratamento oral, tanto preventivo quanto terapêutico, com  $\alpha,\beta$ -amirina reduz os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , duas citocinas intrínsecas associadas com a patogênese da colite, incluindo um infiltrado e proliferação celular incontrolados. O aumento na produção de TNF- $\alpha$  parece estar relacionado com o incremento da expressão de Ki67, um marcador de proliferação, e nossos resultados estão alinhados com esta evidência. Entretanto, o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina reduziu a coloração para Ki67, sugerindo um papel relevante no impedimento da proliferação celular no intestino. Além disso, também foi observado uma redução na quimiocinas CXCL1/KC nos animais tratados com  $\alpha,\beta$ -amirina. É bastante reconhecido que CXCL1/KC é quimioatraente para PMN agindo através da sua ligação seletiva com o receptor de quimiocinas CXCR2 (Peiser, 2012) e trabalhos anteriores mostraram que o bloqueio farmacológico destes receptores reduz significativamente a inflamação causada pela colite induzida pelo TNBS (Bento, 2008). Portanto, os efeitos benéficos da mistura de  $\alpha,\beta$ -amirina deve ocorrer, pelo menos em parte, devido a sua habilidade de modular os níveis de citocinas e quimiocinas. Somado a isto, nossos dados sugerem um aumento significativo da citocina anti-inflamatória IL-4 causado pela administração de  $\alpha,\beta$ -amirina, sugerindo que esta citocina também está relacionada com a proteção da mucosa intestinal, como descrito anteriormente (Bento, 2011; Kim e Chung, 2012).

De acordo com os resultados acima, acreditamos que a redução observada do influxo de leucócito no cólon e a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias podem ser dependentes da inibição da expressão de moléculas de adesão. Resultados obtidos através de imunistoquímica revelaram um aumento significativo na coloração das moléculas de adesão P-CAM1 e RNAm para VCAM-1, PCAM-1, ICAM-1 e  $\beta$ 2-integrina nos animais que foram tratados com a dieta de DSS. Entretanto, o tratamento via oral com  $\alpha,\beta$ -amirina reduziu a expressão destes marcadores significativamente no cólon. De fato, moléculas de adesão celular parecem ser críticas para a patogênese das doenças inflamatórias intestinais (Danese, 2005; Thomas e Baumgart, 2012) e anticorpos para VCAM-1 e ICAM-1 estão sendo testados na colite experimental com resultados promissores (Burns, 2001). Além disso, tem sido demonstrado que um aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  pode induzir a expressão de VCAM-1 e ICAM-1 através da via no NF- $\kappa$ B (Rajan, 2008), indicando que o controle de mediadores pró-inflamatórios parece ser crucial para a redução da expressão de moléculas de adesão seguido de uma diminuição do infiltrado celular e melhora da colite.

Foi recentemente publicado que, através do uso dos antagonistas seletivos para os receptores canabinoides 1 e 2 e também de nucleotídeos anti-sense, que a  $\alpha,\beta$ -amirina interage com o sistema canabinoide, fazendo com que seus efeitos sejam relevantes para explicar suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas. Além disso, Chicca e colaboradores (2012) demonstraram recentemente que a mistura de  $\alpha,\beta$ -amirina exerce seu efeito benéfico, pelo menos em parte, através de uma inibição de hidrolases de endocanabinoides, sem interagir diretamente com os receptores canabinoides. Existe evidência suficiente para mostrar que, quando ativados, os receptores CB1 e CB2 reduzem significativamente os níveis de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de moléculas de adesão durante a colite experimental (Bento, 2011; Kimball, 2006; Storr, 2009). Recentemente, foi demonstrado que camundongos knockout para receptor CB1 ou CB2 exibem maior susceptibilidade para o desenvolvimento de colite induzida por TNBS,

mostrando uma piora na inflamação intestinal acompanhado de uma superprodução de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Engel, 2010). A administração do agonista HU210 do receptor CB1 também reduziu os escores da inflamação e atividade da enzima MPO (Massa, 2004). Foi demonstrado que ambos os receptores estão mais expressos no intestino inflamado (Bento, 2011; Massa, 2004; Wright, 2005).

Levando em conta os achados acima, verificamos em seguida se o efeito protetor da  $\alpha,\beta$ -amirina na colite induzida por DSS é mediado através de sua interação com a via canabinoide. Nossos resultados mostram que o bloqueio com antagonista seletivo do receptor CB1, mas não do CB2, reverteu significativamente os efeitos benéficos causados pela  $\alpha,\beta$ -amirina na colite induzida por DSS, o que está de acordo com dados anteriores que sugerem o fato de que este composto pode interagir com os receptores canabinoides (da Silva, 2011). Além disso, confirmando e promovendo outros achados anteriores, mostramos que o receptor CB1 está significativamente mais expresso durante a colite induzida por DSS, sugerindo que ele possui um importante papel durante a inflamação intestinal (Massa, 2004). Também demonstramos que o RNAm no cólon para as hidrolases endocanabinoides MGL1 e FAAH foram significativamente reduzidas pelo tratamento via oral com  $\alpha,\beta$ -amirina em camundongos. Esses achados confirmam resultados em publicações anteriores e sugerem que a ação do triterpeno pentacíclico  $\alpha,\beta$ -amirina é dependente, pelo menos em parte, de sua habilidade de interferir com o sistema canabinoide, notavelmente por inibir as vias da MGL1 e FAAH. Além disso, é bastante provável que o aumento de MGL1 e FAAH durante inflamação intestinal piore a colite devido ao aumento da degradação de endocanabinoides, como o 2-araquidonoglicerol (2-AG) (Chicca, 2012), o que por sua vez reduz a ativação dos receptores. Entretanto, mais estudos devem ser feitos para clarificar esta hipótese.

Concluindo, demonstramos aqui que a mistura de triterpenos pentacíclicos  $\alpha,\beta$ -amirina exibe um efeito marcante na resolução da inflamação intestinal em um modelo animal bastante difundido. Além

disso, os efeitos benéficos da  $\alpha,\beta$ -amirina como um efeito preventivo e terapêutico pode estar associado à redução da infiltração celular e proliferação no cólon e também da redução de citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias, bem como uma diminuição de RNAm para moléculas de adesão celular. Finalmente, corroboramos que os efeitos da  $\alpha,\beta$ -amirina exerce suas atividades benéficas através da modulação do receptor CB1 e da supressão das hidrolases de endocanabinoides. Juntos, estes resultados sugerem que a  $\alpha,\beta$ -amirina é um composto promissor para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

## 5 REFERÊNCIAS

Baltina, L.A., Flekhter, O.B., Nigmatullina, L.R., Boreko, E.I., Pavlova, N.I., Nikolaeva, S.N., Savinova, O.V., Tolstikov, G.A., 2003. Lupane triterpenes and derivatives with antiviral activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 13, 3549–3552.

Baumgart, D.C., Carding, S.R., 2007. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 369, 1627–1640.

Baumgart, D.C., Sandborn, W.J., 2007. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 369, 1641–1657.

Bento, A.F., Leite, D.F., Claudino, R.F., Hara, D.B., Leal, P.C., Calixto, J.B., 2008. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. *Journal of Leukocyte Biology* 84, 1213–1221.

Bento, A.F., Leite, D.F., Marcon, R., Claudino, R.F., Dutra, R.C., Cola, M., Martini, A.C., Calixto, J.B., 2012. Evaluation of chemical mediators and cellular response during acute and chronic gut inflammatory response induced by dextran sodium sulfate in mice. *Biochemical Pharmacology* 84, 1459–1469.

Bento, A.F., Marcon, R., Dutra, R.C., Claudino, R.F., Cola, M., Leite, D.F., Calixto, J.B., 2011. beta-Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPARgamma pathway. *American Journal of Pathology* 178, 1153–1166

Boismenu, R., Chen, Y., 2000. Insights from mouse models of colitis. *Journal of Leukocyte Biology* 67, 267–278.

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

Brown, S.J., Mayer, L., 2007. The immune response in inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology* 102, 2058–2069.

Burns, R.C., Rivera-Nieves, J., Moskaluk, C.A., Matsumoto, S., Cominelli, F., Ley, K., 2001. Antibody blockade of ICAM-1 and VCAM-1 ameliorates inflammation in the SAMP-1/Yit adoptive transfer model of Crohn's disease in mice. *Gastroenterology* 121, 1428–1436.

Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., Santos, A.R., 2004. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica* 70, 93–103.

Chicca, A., Marazzi, J., Gertsch, J., 2012. The antinociceptive triterpene beta-amyrin inhibits 2-arachidonoylglycerol (2-AG) hydrolysis without directly targeting CB receptors. *British Journal of Pharmacology* 167, 1596–1608.

Croxford, J.L., 2003. Therapeutic potential of cannabinoids in CNS disease. *CNS Drugs* 17, 179–202.

Croxford, J.L., Yamamura, T., 2005. Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *Journal of Neuroimmunology* 166, 3–18.

da Silva, K.A., Paszcuk, A.F., Passos, G.F., Silva, E.S., Bento, A.F., Meotti, F.C., Calixto, J.B., 2011. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpeno alpha,beta-amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. *Pain* 152, 1872–1887.

Danese, S., Semeraro, S., Marini, M., Roberto, I., Armuzzi, A., Papa, A., Gasbarrini, A.,  
2005. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease: therapeutic implications for gut inflammation. *Digestive and Liver Disease* 37, 811–818.

Engel, M.A., Kellermann, C.A., Burnat, G., Hahn, E.G., Rau, T., Konturek, P.C., 2010. Mice lacking cannabinoid CB1-, CB2-receptors or both receptors show increased susceptibility to trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis. *Journal of Physiology and Pharmacology* 61, 89–97.

Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U., Stein, H., 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of Immunology* 133, 1710–1715.

Ghia, J.E., Blennerhassett, P., Collins, S.M., 2008. Impaired parasympathetic function  
increases susceptibility to inflammatory bowel disease in a mouse model of depression. *Journal of Clinical Investigation* 118, 2209–2218.

Holanda Pinto, S.A., Pinto, L.M., Cunha, G.M., Chaves, M.H., Santos, F.A., Rao, V.S.,  
2008. Anti-inflammatory effect of alpha, beta-amyrin, a pentacyclic triterpeno from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology* 16, 48–52.

Kaser, A., Zeissig, S., Blumberg, R.S., 2010. Inflammatory bowel disease. *Annual Review of Immunology* 28, 573–621.

Katerere, D.R., Gray, A.I., Nash, R.J., Waigh, R.D., 2003. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. *Phytochemistry* 63, 81–88.

Kim, H.S., Chung, D.H., 2012. IL-9-producing invariant NKT cells protect against DSS-induced colitis in an IL-4-dependent manner. *Mucosal Immunology* 6, 347–357.

Kimball, E.S., Schneider, C.R., Wallace, N.H., Hornby, P.J., 2006. Agonists of cannabinoid receptor 1 and 2 inhibit experimental colitis induced by oil of mustard and by dextran sulfate sodium. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver* 291, G364–G371.

Kimball, E.S., Wallace, N.H., Schneider, C.R., D'Andrea, M.R., Hornby, P.J., 2004. Vanilloid receptor 1 antagonists attenuate disease severity in dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Neurogastroenterology and Motility* 16, 811–818.

Kunz-Schughart, L.A., Weber, A., Rehli, M., Gottfried, E., Brockhoff, G., Krause, S.W., Andreesen, R., Kreutz, M., 2003. The “classical” macrophage marker CD68 is strongly expressed in primary human fibroblasts. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 87, 215–223.

Massa, F., Marsicano, G., Hermann, H., Cannich, A., Monory, K., Cravatt, B.F., Ferri, G.L., Sibaev, A., Storr, M., Lutz, B., 2004. The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *Journal of Clinical Investigation* 113, 1202–1209.

Medeiros, R., Otuki, M.F., Avellar, M.C., Calixto, J.B., 2007. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by

phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *European Journal of Pharmacology* 559, 227–235.

Melo, C.M., Carvalho, K.M., Neves, J.C., Morais, T.C., Rao, V.S., Santos, F.A., Brito, G.A., Chaves, M.H., 2010. alpha,beta-Amyrin, a natural triterpenoid ameliorates larginine-induced acute pancreatitis in rats. *World Journal of Gastroenterology* 16, 4272–4280.

Melo, C.M., Morais, T.C., Tome, A.R., Brito, G.A., Chaves, M.H., Rao, V.S., Santos, F.A., 2011. Anti-inflammatory effect of alpha,beta-amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Inflammation Research* 60, 673–681.

Oliveira, F.A., Chaves, M.H., Almeida, F.R., Lima Jr., R.C., Silva, R.M., Maia, J.L., Brito, G.A., Santos, F.A., Rao, V.S., 2005. Protective effect of alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 103–108.

Oliveira, F.A., Lima-Junior, R.C., Cordeiro, W.M., Vieira-Junior, G.M., Chaves, M.H., Almeida, F.R., Silva, R.M., Santos, F.A., Rao, V.S., 2004a. Pentacyclic triterpenoids, alpha,beta-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 78, 719–725.

Oliveira, F.A., Vieira-Junior, G.M., Chaves, M.H., Almeida, F.R., Florencio, M.G., Lima Jr., R.C., Silva, R.M., Santos, F.A., Rao, V.S., 2004b. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. *Pharmacological Research* 49, 105–111.

Oliveira, F.A., Vieira-Junior, G.M., Chaves, M.H., Almeida, F.R., Santos, K.A., Martins, F.S., Silva, R.M., Santos, F.A., Rao, V.S., 2004c. Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicinsensitive primary afferent neurons. *Planta Medica* 70, 780–782.

Otuki, M.F., Ferreira, J., Lima, F.V., Meyre-Silva, C., Malheiros, A., Muller, L.A., Cani, G.S., Santos, A.R., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2005a. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 313, 310–318.

Otuki, M.F., Vieira-Lima, F., Malheiros, A., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2005b. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology* 507, 253–259.

Paszczuk, A.F., Dutra, R.C., da Silva, K.A., Quintao, N.L., Campos, M.M., Calixto, J.B., 2011. Cannabinoid agonists inhibit neuropathic pain induced by brachial plexus avulsion in mice by affecting glial cells and MAP kinases. *PLoS ONE* 6, e24034.

Peiser, M., Tralau, T., Heidler, J., Api, A.M., Arts, J.H., Basketter, D.A., English, J., Diepgen, T.L., Fuhlbrigge, R.C., Gaspari, A.A., Johansen, J.D., Karlberg, A.T., Kimber, I., Lepoittevin, J.P., Liebsch, M., Maibach, H.I., Martin, S.F., Merk, H.F., Platzeck, T., Rustemeyer, T., Schnuch, A., Vandebriel, R.J., White, I.R., Luch, A., 2012. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69, 763–781.

Perrier, C., Rutgeerts, P., 2011. Cytokine blockade in inflammatory bowel diseases. *Immunotherapy* 3, 1341–1352.

Rajan, S., Ye, J., Bai, S., Huang, F., Guo, Y.L., 2008. NF-kappaB, but not p38 MAP kinase, is required for TNF-alpha-induced expression of cell adhesion molecules in endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 105, 477–486.

Ray, K., 2012. Inflammation: Colitis, microbiota and malnutrition. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9, 490.

Rogler, G., Andus, T., 1998. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Surgery* 22, 382–389.

Schurmann, G.M., Bishop, A.E., Facer, P., Vecchio, M., Lee, J.C., Rampton, D.S., Polak, J.M., 1995. Increased expression of cell adhesion molecule P-selectin in active inflammatory bowel disease. *Gut* 36, 411–418.

Storr, M.A., Keenan, C.M., Zhang, H., Patel, K.D., Makriyannis, A., Sharkey, K.A., 2009. Activation of the cannabinoid 2 receptor (CB2) protects against experimental colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* 15, 1678–1685.

Strober, W., Fuss, I.J., 2011. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, 1756–1767.

Tanasescu, R., Constantinescu, C.S., 2010. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology* 215, 588–597.

Thomas, S., Baumgart, D.C., 2012. Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammopharmacology* 20, 1–18.

Ukiya, M., Akihisa, T., Tokuda, H., Suzuki, H., Mukainaka, T., Ichiishi, E., Yasukawa, K., Kasahara, Y., Nishino, H., 2002. Constituents of Compositae plants III. Antitumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers. *Cancer Letters* 177, 7–12.

Vitor, C.E., Figueiredo, C.P., Hara, D.B., Bento, A.F., Mazzuco, T.L., Calixto, J.B., 2009. Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes, alpha- and beta-amyrin, in a mouse model of colitis. *British Journal of Pharmacology* 157, 1034–1044.

Wang, Bin, Gong, X., Wan, Jing-yuan, Zhang, Li, Zhang, Zhuo, Li, Hong-zhong, Min, Su, 2011. Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute lung injury. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pupt.2011.04.001>.

Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., Neurath, M.F., 2007. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature Protocols* 2, 541–546.

Wright, K., Rooney, N., Feeney, M., Tate, J., Robertson, D., Welham, M., Ward, S., 2005. Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology* 129, 437–453.