

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**O EFEITO ANTIOXIDANTE DA *Boswellia serrata* NO MODELO EXPERIMENTAL
DE COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO**

RENATA MINUZZO HARTMANN

Porto Alegre - RS

2012

RENATA MINUZZO HARTMANN

**O EFEITO ANTIOXIDANTE DA *Boswellia serrata* NO MODELO EXPERIMENTAL
DE COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Norma Possa Marroni

Porto Alegre – RS

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Hartmann, Renata Minuzzo

O efeito antioxidante da *Boswellia serrata* no modelo experimental de colite induzida por ácido acético / Renata Minuzzo Hartmann. -- 2012.
76 f.

Orientadora: Norma Possa Marroni.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Retocolite Ulcerativa Indeterminada. 2. Estresse Oxidativo. 3. Antioxidantes. 4. *Boswellia serrata*. 5. Modelo experimental de colite. I. Marroni, Norma Possa, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Carinhosamente dedico este trabalho a minha mãe pelo amor incondicional, pela educação, dedicação e presença em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Norma Possa Marroni, pela confiança, incentivo, ensinamentos, atenção, exemplo, apoio, orientação e, acima de tudo, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa e pela valiosa oportunidade de aprender a cada dia. Minha eterna gratidão. Ao Dr. Cláudio Marroni, pelas correções e sugestões para a finalização deste trabalho.

Ao Dr. Henrique Sarubbi Fillmann, pela imensa ajuda, tranquilidade, paciência, disponibilidade e por sempre compartilhar os seus conhecimentos. A sua dedicação e seu incentivo foram essenciais para a realização do nosso trabalho.

À Profa. Dra. Maria Isabel Morgan Martins pelo auxílio, colaboração e sugestões durante a execução deste trabalho.

A todos os professores, colegas e amigos do Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes da ULBRA, agradeço pelos ensinamentos e experiências compartilhadas, em especial a Silvia uma amiga querida que esteve sempre disposta para me ajudar, auxiliar e incentivar. E agradeço também a Graziella e a Renata Ferrari pela ajuda e sugestões.

Às minhas queridas colegas e amigas, Elizângela, Josieli e Tatiele, obrigada pela amizade, convivência, afetividade e auxílio. A minha grande amiga Francielli, pela confiança, ajuda, apoio, carinho, pelas angústias e felicidades compartilhadas, e pela amizade que me dedica nesses anos. Agradeço a oportunidade de ter conhecido vocês e por tornarem o nosso ambiente de trabalho um local que tenho imensa alegria em estar.

Aos meus familiares e amigos agradeço o amor, preocupação, força e compreensão nos momentos de ausência. Mãe, avó e tios, obrigada por possibilitarem tantas coisas maravilhosas ao longo da minha vida. A minha amiga-irmã Janaína, agradeço pelo carinho, confiança, amizade e por dividir comigo tristezas e alegrias ao longo dessa nossa amizade. Um amigo de verdade é aquele que acredita em ti, mesmo que tu deixes de acreditar em ti mesmo.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente me auxiliaram em algum momento da realização desse trabalho e que estiveram presentes em mais esta etapa da minha vida.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

RESUMO

Introdução: A retocolite ulcerativa indeterminada é uma doença inflamatória que envolve exclusivamente o cólon e o reto, sendo caracterizada por infiltrado leucocitário e úlceras superficiais na mucosa intestinal. A produção e liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio parecem ser cruciais na determinação da fisiopatologia da doença, pois resultam em dano oxidativo. A partir dessas informações, a busca por opções terapêuticas com propriedades antioxidantes são importantes e têm sido testadas na colite experimental. **Objetivo:** Este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do extrato seco da planta *Boswellia serrata* em modelo experimental de colite induzida por ácido acético sobre os danos teciduais, a pressão anal esfinteriana, o estresse oxidativo, a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx) e atividade da glutatona (GSH), a concentração dos metabólitos do óxido nítrico e expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) por imunohistoquímica. **Material e métodos:** Foram utilizados 25 ratos Wistar machos, com peso médio de 350g, divididos em 5 grupos: Controle (CO); Controle+*Boswellia serrata* (C+B); Colite (CL); Colite+*Boswellia serrata* (CL+B) e *Boswellia serrata*+Colite (B+CL). Os animais foram submetidos à administração intracolônica por enema com solução de ácido acético diluído a 4% e com volume de 4 mL. O tratamento com o extrato aquoso da planta via oral, na dose de 34,2 mg/Kg diluído em 4 mL de solução fisiológica, ocorreu uma vez ao dia durante 48 horas antes e após a indução da colite. Foi realizada a medida de pressão anal esfinteriana dos animais. As análises histológicas do intestino foram através da coloração de Hematoxilina-Eosina e realizada imunohistoquímica com anticorpo iNOS. O homogeneizado do intestino foi utilizado para avaliação da lipoperoxidação (LPO) através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), avaliação dos metabólitos do óxido nítrico pela técnica de nitritos e nitratos totais, avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx e avaliação da GSH. **Resultados:** Na análise da pressão anal esfinteriana os animais dos grupos CL+B e B+CL apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo CL. Nos níveis de LPO e metabólitos do óxido nítrico foi observada uma diminuição significativa nos grupos CL+B e B+CL quando comparados ao grupo CL. A atividade da SOD mostrou um aumento no grupo CL e

uma diminuição significativa nos grupos CL+B e B+CL equivalendo à média do grupo CO. A GPx e GSH apresentaram um aumento significativo nos grupos CL+B e B+CL em relação ao grupo CL. **Conclusão:** Sugerimos que a administração do extrato da planta *Boswellia serrata* possa ser uma possibilidade de terapia antioxidante na colite ulcerativa.

Palavras-chave: *Boswellia serrata*, colite ulcerativa, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Introduction: Ulcerative rectocolitis is an inflammatory disease that involves only the colon and rectum, being characterized by leukocyte infiltrate and superficial ulcers in the intestinal mucosa. The production and release of reactive oxygen and nitrogen species appears to be crucial in determining the pathophysiology of the disease, since both result in oxidative damage. Therefore, the search for treatment options with antioxidant properties is important currently and has been tested in experimental colitis. **Objective:** This study aimed to evaluate the effects of dry extract of *Boswellia serrata* plant in an experimental model of colitis induced by acetic acid on tissue injury, anal sphincter pressure, oxidative stress, on the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione (GSH), concentration of nitric oxide metabolites and expression of inducible nitric oxide synthase enzyme (iNOS) by immunohistochemistry. **Methods:** We used 25 male Wistar rats with an average weight of 350g, divided into 5 groups: control (CO), Control + *Boswellia serrata* (CO+B); Colitis (CL); Colitis + *Boswellia serrata* (CL+B) and *Boswellia serrata* + colitis (B+CL). The animals were submitted to intracolonic administration by enema with acetic acid solution diluted to 4% in a volume of 4 ml. The treatment with aqueous plant extract was performed orally at a dose of 34.2 mg/kg diluted in 4 ml of saline. The administration occurred once daily for 48 hours before and after the induction of colitis. We performed the measurement of anal sphincter pressure animals. Histological analyzes of bowel the after were made staining with hematoxylin-eosin and immunohistochemistry, performed with iNOS antibody. The homogenized intestine was used for evaluation of lipid peroxidation (LPO) through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), assessment of nitric oxide metabolites by the technique of total nitrites and nitrates and evaluation of the antioxidant enzymes SOD, GPx and GSH. **Results:** The analysis of anal sphincter pressure of the animals in groups CL+B and B+CL showed a significant increase when compared to the CL group. LPO and nitric oxide metabolites levels demonstrated significant decrease in groups CL+B and B+CL when compared to CL. SOD activity showed an increase in CL group and a significant decrease in groups CL+B and B+CL, remaining to the average of the CO group. The GPx and GSH showed a significant increase in groups CL+B and B+CL group when compared to

CL group. **Conclusion:** We suggest that the administration of *Boswellia serrata* plant extract may be a possibility of antioxidant therapy in ulcerative colitis.

Keywords: *Boswellia serrata*, ulcerative colitis, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características histológicas que auxiliam na distinção entre a RCUI e DC.....	19
Figura 2: Modelo esquemático do padrão da distribuição das lesões da DC e RCUI.	20
Figura 3: Hipótese para a etiopatogenia da retocolite ulcerativa indeterminada.	22
Figura 4: Processo da formação de algumas espécies reativas de oxigênio.	25
Figura 5: Representação esquemática da reação da LPO.....	27
Figura 6: Síntese do NO.....	30
Figura 7: Vista geral da planta <i>Boswellia serrata</i>	35
Figura 8: Vista geral das folhas e flores da planta <i>Boswellia serrata</i>	35
Figura 9: Vista geral dos frutos da planta <i>Boswellia serrata</i>	36
Figura 10: Resina obtida do tronco.	36
Figura 11: Estruturas dos ácidos β -boswellico e α -boswellico.	37
Figura 12: Estruturas de quatro ácidos triterpenos pentacíclicos.....	38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Origem botânica da planta <i>Boswellia serrata</i>	34
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
AA	Ácido acético
<i>B. serrata</i>	<i>Boswellia serrata</i>
CAT	Catalase
CO	Controle
CUI	Colite Ulcerativa Indeterminada
DSS	Dextran sulfato de sódio
DC	Doença de Crohn
DII	Doença inflamatória intestinal
e^-	Elétron
EO	Estresse oxidativo
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
Fe	Ferro
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione oxidada
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H/E	Hematoxilina e Eosina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
IL	Interleucina
LPO	Lipoperoxidação
LT	Leucotrieno
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
$O^{\cdot -}$	Oxigênio singlet
O ₂	Oxigênio
$O_2^{\cdot -}$	Ânion radical superóxido
$^{\cdot}OH$	Radical hidroxil
ONOO $^-$	Peroxinitrito
RL	Radical livre
RCUI	Retocolite Ulcerativa Indeterminada
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1 REFERENCIAL TEÓRICO	19
1.1 DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL (DII).....	19
1.1.1 Retocolite ulcerativa indeterminada	21
1.1.2 Modelos experimentais de colite ulcerativa indeterminada	23
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES.....	24
1.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio e Radicais Livres	24
1.2.1.1 <i>Colite e Estresse Oxidativo</i>	28
1.2.2 Estresse Nitrosativo	29
1.2.2.1 <i>Colite e Óxido Nítrico</i>	30
1.2.3 Antioxidantes	32
1.3 <i>Boswellia serrata</i>	33
2 OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVO GERAL	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
4 ARTIGO PUBLICADO.....	50
Effect of <i>Boswellia serrata</i> on antioxidant status in an experimental model of colitis rats induced by acetic acid.....	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
PERSPECTIVAS FUTURAS	69
ANEXOS	70
ANEXO A – Análises para posteriores publicações	71
ANEXO A1 - Efeito da administração de <i>Boswellia serrata</i> nos níveis de metabólitos do óxido nítrico.	71

ANEXO A2 - Efeito da administração de <i>Boswellia serrata</i> na expressão da óxido nítrico sintase induzível.....	72
ANEXO B - Produção científica durante a vigência do mestrado.....	73

INTRODUÇÃO

A Doença inflamatória intestinal (DII) é um termo geral para doenças inflamatórias crônicas envolvendo o trato gastrointestinal. As mais frequentes são a Retocolite Ulcerativa Indeterminada (RCUI) e a Doença de Crohn (DC) (1).

A etiologia da retocolite ulcerativa inespecífica e da doença de Crohn decorre de uma complexa interação entre agentes exógenos e/ou alterações endógenas de causa indeterminada, cujo resultado final é um processo inflamatório (2).

A inflamação tem um papel importante na patogênese da RCUI, pois as substâncias oxidantes que participam do processo da inflamação podem causar lesões e destruição dos tecidos desencadeando um desequilíbrio entre agressão e defesa caracterizando estresse oxidativo (3,4). Em alguns estudos comprovou-se a existência de alterações nos níveis oxidativos de biopsias de mucosas de cólon procedentes de pacientes com esta enfermidade (2).

Desta forma, a inibição ou neutralização destes radicais livres, juntamente com uma ativação dos sistemas antioxidantes endógenos, tanto enzimáticos como não enzimáticos, poderia ser benéfico no tratamento da DII (5). Assim, o estudo de novos compostos com atividade antioxidante é uma importante abordagem para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da DII, o que é comprovado por muitos estudos que mostram os efeitos benéficos de diferentes substâncias com propriedades antioxidantes em modelos experimentais de colite ulcerativa (6).

Estudos anteriores em nosso laboratório demonstraram que a administração da glutamina, um potente antioxidante, em modelo de colite experimental indeterminada (CUI) induzida por ácido acético (AA) e no modelo induzido por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), melhorou a lesão colônica e o perfil inflamatório (7,8).

Nos últimos anos, vem ocorrendo cada vez mais o uso de fitoterápicos desenvolvidos a partir do extrato de plantas consideradas medicinais, para tratamento de diferentes doenças. Esses produtos naturais sob forma de (chás, infusões, óleos, fitoterápicos) estão sendo pesquisados na tentativa de estudar seus princípios ativos que podem ser utilizados na clínica médica (9).

Entre os fitoterápicos atualmente utilizados está a *Boswellia serrata* (*B. serrata*). Essa planta contém compostos que atuam no organismo apresentando baixa toxicidade e com poucos efeitos colaterais. Os seus princípios ativos são responsáveis por efeitos anti-inflamatórios benéficos em diversas doenças como asma, osteoartrite e doenças intestinais (10,11).

Estudos sugerem que a espécie *B. serrata* apresenta substâncias com propriedades antioxidantes, as quais são responsáveis pela prevenção ou diminuição dos danos oxidativos gerados por espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres (RL) (12).

Os principais compostos presentes no extrato da *B. serrata* são os ácidos boswellicos que se mostram potentes inibidores da 5-lipoxigenase, enzima que desencadeia a síntese dos leucotrienos (LT). Por essa razão, o extrato da *B. serrata* está sendo utilizado no tratamento da retocolite ulcerativa indeterminada, a qual é um processo inflamatório que envolve a mucosa do intestino grosso, comprometendo um grande segmento do mesmo (13,14). Esse processo está associado com o aumento da formação de leucotrienos, causando quimiotaxia, quimiocinese, síntese de radicais superóxido e liberação de enzimas lisossômicas pelos fagócitos (13).

Este trabalho pretende avaliar o estresse oxidativo, o envolvimento do óxido nítrico e os danos teciduais em animais submetidos ao modelo experimental de colite ulcerativa indeterminada induzida por AA. Os animais foram divididos em cinco grupos (n=5 animais em cada grupo) e tratados com o extrato seco da planta *B. serrata* (Védica® - Apsen Farmacêutica) diluído em solução fisiológica e administrado aos animais por gavagem. Os procedimentos com os animais seguiram de acordo com o preconizado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de

Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) bem como o preconizado no *Principles for Research Involving Animals* (NAS) (15).

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL (DII)

As doenças inflamatórias intestinais (DII) caracterizam-se por uma inflamação crônica do trato gastrointestinal com períodos de sintomas exacerbados e intervalos de remissão dos mesmos. Podem apresentar uma causa ou agente patogênico específico como infecções, parasitoses, enterocolite pós-irradiação ou actínica, isquêmica e também pode ter causa desconhecida como nos casos da retocolite ulcerativa indeterminada e da doença de Crohn (16).

Ambas as doenças apresentam sintomas extremamente desagradáveis como desconforto, dores abdominais, sangramento, perda de peso e alteração intestinal (diarréia e constipação), assim afetando a qualidade de vida dos pacientes. Entretanto, apesar da similaridade em alguns fatores a RCUI e a DC diferem na fisiopatologia e suas características histológicas facilitam a distinção entre as doenças (figura 1) (17).

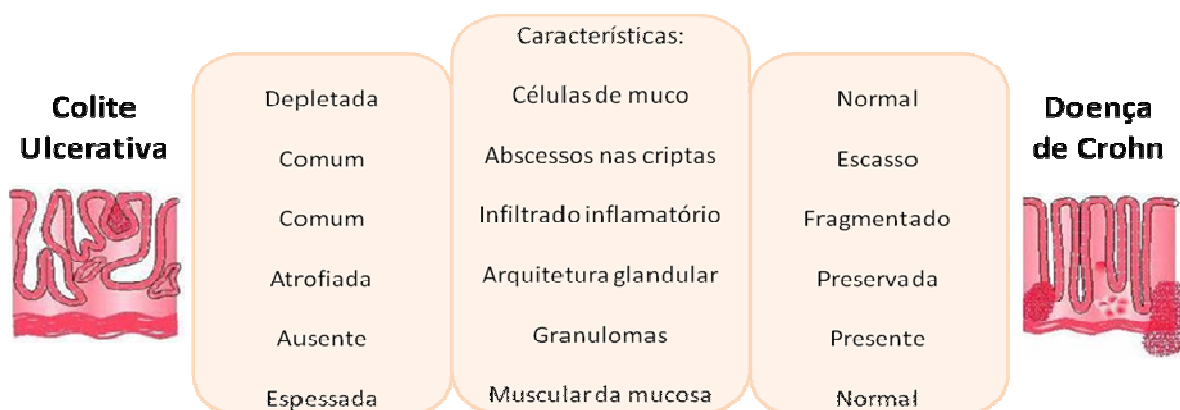


Figura 1: Características histológicas que auxiliam na distinção entre a RCUI e DC.
Fonte: Adaptada (18).

A RCUI envolve exclusivamente o reto e cólon, sendo caracterizada por inflamação que ocorre normalmente na camada superficial da parede intestinal, na mucosa e submucosa, apresentando abscessos nas criptas, infiltração de leucócitos e eosinófilos e comumente ocorrendo ulcerações superficiais, edema, necrose no epitélio e hemorragia (16, 17).

A DC pode afetar qualquer segmento do trato digestivo desde a boca até o ânus, sendo caracterizada por processo inflamatório transmural, aparecimento de perfurações e estenose com lesões focais ou difusas (figura 2) (16-18).

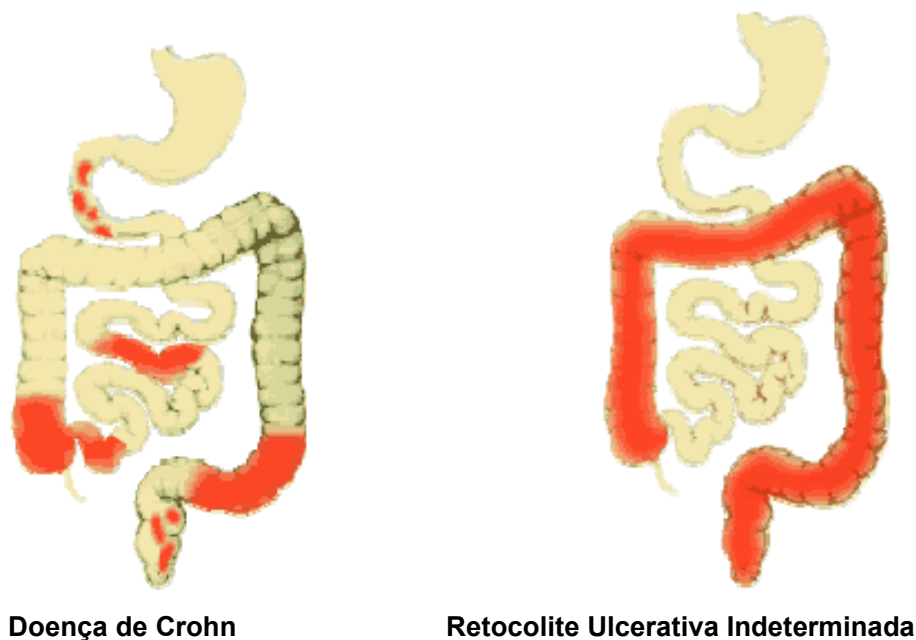


Figura 2: Modelo esquemático do padrão da distribuição das lesões da DC e RCUI.

Fonte: Adaptada (19).

A associação entre o câncer de cólon e as DII tem mostrado um risco elevado entre os pacientes portadores de RCUI e DC, sendo fatores de pré-disposição tanto a extensão e duração da doença, quanto as complicações extra-intestinais e idade do paciente. Estudos demonstram que a propensão de desenvolver câncer é maior em pacientes com RCUI do que em pacientes com DC (20).

1.1.1 Retocolite ulcerativa indeterminada

A RCUI ocorre no mundo inteiro, porém a maioria dos casos da doença é registrada nos países desenvolvidos e tem aumentado continuamente na Europa Ocidental, Ásia e América do Sul (21). Estudos revelam que a prevalência da RCUI na América do Norte é de aproximadamente 10 a 200 casos por cem mil pessoas e na Europa é de 160 a 320 casos por cem mil habitantes (22).

No Brasil, existem poucos estudos sobre os aspectos epidemiológicos sobre a RCUI e a maioria desses estudos, apenas descrever as características clínicas e a frequência de internação hospitalar. Alguns dados recentes do Ministério da Saúde mostram o número de internações dos pacientes portadores de enterocolites, incluindo a RCUI. No Rio Grande do Sul, o número de internações é de aproximadamente 67 em todo o estado, sendo que a maioria dessas internações ocorrem em Porto Alegre com 16 internações (23).

Alguns fatores como idade, sexo e diferença étnica influenciam na incidência da doença. Ocorre um predomínio da retocolite ulcerativa indeterminada em pacientes do sexo masculino. Apesar de a doença ser relatada em diferentes idades, o maior pico de ocorrência é registrado entre a segunda e quarta década, podendo ocorrer um segundo pico na sexta década de vida (22, 24).

Na retocolite ulcerativa indeterminada, vários mecanismos são descritos na etiologia da doença, principalmente os fatores de ordem genética, dietética, imunológica e ambiental. Porém, a série de episódios que desenvolvem tal processo inflamatório ainda é uma incógnita, pois a célula epitelial, as bactérias e a resposta imunológica parecem também estar associadas a essa doença (figura 3) (24).

Os sintomas clínicos da RCUI incluem crises de diarreia, com presença de sangue e secreção de muco, dor abdominal e perda de peso (25, 26). Esses sintomas podem permanecer por tempo indeterminado: dias, semanas ou meses. Após esse intervalo, ocorre uma regressão com intervalo assintomático que pode perdurar por anos ou décadas até ocorrer uma recidiva da doença (24). A fase ativa da doença caracteriza-se por abscessos nas criptas e úlceras que se estendem até a camada muscular. Conforme a doença evolui para a fase crônica ocorre o

rompimento das criptas para dentro da lâmina própria e da submucosa, assim difundindo o processo inflamatório por todo o tecido (27).

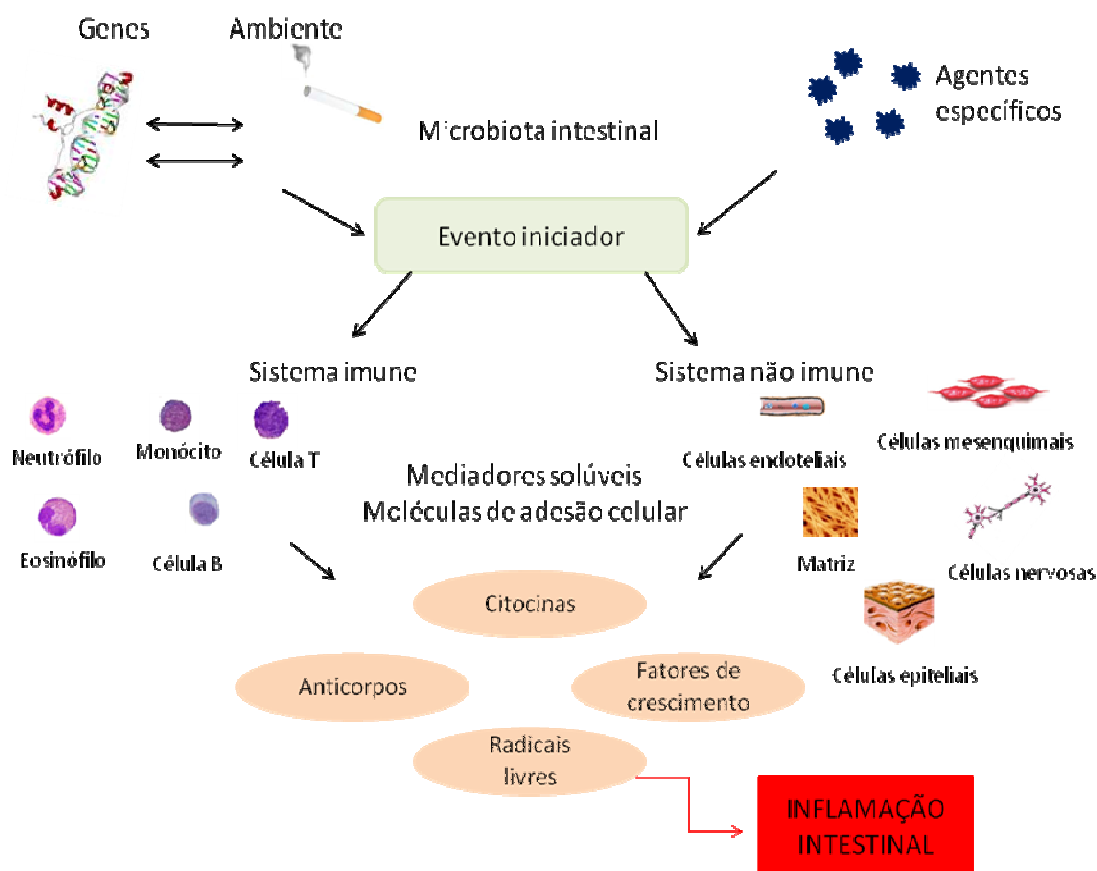


Figura 3: Hipótese para a etiopatogenia da retocolite ulcerativa indeterminada.
Fonte: Adaptada (24).

Algumas manifestações extra-intestinais podem ocorrer em pacientes com RCUI, tais como manifestações cutâneas, articulares, oculares, hepáticas e renais. Os pacientes com DII podem apresentar anemia leve e dispneia decorrente da queda da taxa de hemoglobina (13,20).

1.1.2 Modelos experimentais de colite ulcerativa indeterminada

A pesquisa em modelos experimentais de colite ulcerativa indeterminada tem uma função extremamente importante para o estudo da patogênese dessa doença, porque se sabe que ela não tem uma causa definida. Estudos apontam que a eficácia dos modelos experimentais de CUI pode auxiliar na avaliação da fisiologia, e no aspecto molecular no uso de drogas indutoras da doença (28).

Os modelos experimentais podem ser desenvolvidos de diferentes maneiras, cada um classificado de acordo com as suas características como em casos agudos e crônicos de colite e com formas diferentes de indução, por via oral ou via retal, podendo ser tóxicas, imunomediadas, infecciosas e espontâneas (28, 29).

Os modelos químicos de colite têm muitas semelhanças com a retocolite ulcerativa indeterminada dos humanos. A colite nos modelos animais tem início definido e são caracterizadas pela desregulação de citocinas e tornaram-se ferramentas úteis para estudar a patologia da doença com potencial para a caracterização da modulação imunológica e inflamatória na iniciação e perpetuação da patogênese da doença (6, 7, 30).

Dos vários modelos experimentais existentes de CUI, normalmente os químicos são os mais utilizados. As características desses modelos incluem perda de peso, diarreia e sangramento retal. As substâncias indutoras mais conhecidas são o ácido trinitrobenzenosulfônico, o ácido acético e o dextran sulfato de sódio (DSS) (30).

A colite induzida por TNBS assemelha-se à RCUI humana nas suas características histológicas, incluindo infiltração da mucosa do cólon por neutrófilos e macrófagos e aumento da produção de mediadores inflamatórios, incluindo as citocinas pró-inflamatórias. A dose e duração desse modelo podem ser adaptadas para caracterizar uma colite aguda ou crônica. Estudos indicam que o modelo de CUI induzida por TNBS é útil para testar novas estratégias terapêuticas (8, 31).

O modelo de colite por DSS tem sido amplamente utilizado para investigar os mecanismos da doença. Histologicamente, o modelo de DSS mostra extenso dano

tecidual e processo inflamatório alterando a integridade epitelial, aumentando a permeabilidade e resultando em uma reação imunitária contra antígenos luminais (32, 33).

A colite induzida por enema de ácido acético em animais de pequeno porte é um método simples e reproduzível. Esse modelo apresenta similaridades com DII em humanos quanto a aspectos histológicos e metabólicos relacionados ao ácido araquidônico (34).

O modelo por AA promove o desenvolvimento de edema da submucosa, infiltrado inflamatório, úlceras no cólon, destruição das criptas e depleção das células caliciformes. Por ser um modelo de características agudas é possível investigar os componentes envolvidos na inflamação, bem como avaliar a eficácia de novas drogas nesta fase aguda da doença (6, 34, 35).

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

1.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio e Radicais Livres

O metabolismo do oxigênio (O_2) é um dos responsáveis pelo fornecimento de energia celular para as células do organismo, pois mantém as funções bioquímicas intracelulares. Entretanto, alguns efeitos tóxicos como a geração de espécies reativas de oxigênio podem ocorrer durante o processo de redução da molécula de oxigênio à água (H_2O) na cadeia respiratória mitocondrial (36).

A presença de ERO é encontrada em todos os sistemas biológicos sendo produtos do metabolismo celular normal. Nas membranas mitocôndrias encontram-se as proteínas transportadoras de elétrons que reduzem a molécula de oxigênio à água durante o processo de respiração. A molécula de O_2 para a sua redução completa em H_2O requer uma redução tetravalente, ou seja, quatro sucessivas transferências de elétrons, assim resultando na formação de H_2O . A maior parte do

O_2 (aproximadamente 95%) recebe os quatro elétrons de uma só vez. Entretanto, em 5% das vezes, a molécula de O_2 recebe um elétron de cada vez ocorrendo uma redução monovalente, ocasionado à formação de intermediários reativos (Figura: 4) (37, 38).

Os intermediários da redução monovalente do O_2 são ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio *singlet* (1O_2) e radical hidroxil ($^{\bullet}OH$). Todos são denominados ERO por serem capazes de existir de forma independente. Dois desses intermediários são chamados de radicais livres (RL), são eles o $O_2^{\bullet-}$ e $^{\bullet}OH$ (39).

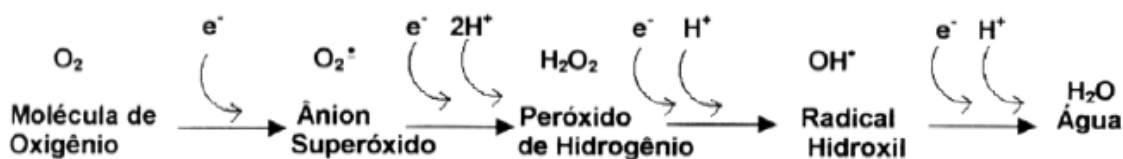


Figura 4: Processo da formação de algumas espécies reativas de oxigênio.

Fonte: Adaptada (4).

Os RL são definidos como qualquer espécie química capaz de existir independentemente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo espécies paramagnéticas, com alto grau de reatividade química e vida média curta, sendo capazes de atacar qualquer biomolécula (40). Esses radicais podem ser formados em situações fisiológicas ou patológicas e são danosos às células e ao organismo quando produzidos em grande quantidades (40, 41).

O radical ânion superóxido é constituído pela redução do O_2 molecular por um elétron após aporte energético. Normalmente, é removido pela reação de dismutação que consiste na reação de dois ânions superóxidos catalisados pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 é geralmente produto da dismutação do ânion superóxido pela enzima SOD. As enzimas oxidativas são capazes de formar e degradar o H_2O_2 , sendo normalmente encontradas nos peroxissomas. As

mais comuns são a catalase (CAT), D-amino oxidase, urato oxidase, B-oxidase de ácidos graxos e glutathione peroxidase (GPx). O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, pode reagir com outro ânion superóxido ou com metais de transição, conforme as reações de Fenton (Reação 1) e Haber-Weiss (Reação 2), formando o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) (40).



O radical $\cdot\text{OH}$ é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta, dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Esses radicais frequentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. A sua formação ocorre a partir da reação do peróxido de hidrogênio com um ânion superóxido ou com íons de ferro (reação 1). Esse RL possui a capacidade de atravessar as membranas e reagir com biomoléculas, como os lipídios insaturados e DNA (41).

A formação dos RL pode ocorrer durante o metabolismo normal de toda célula, pela perda ou pelo ganho de um elétron de um não radical. Eles podem também ser formados quando uma ligação covalente é quebrada, na fissão homolítica onde cada um dos átomos fica com um elétron, formando um radical (41). Os RL exercem algumas funções importantes com efeitos benéficos ou prejudiciais no organismo dos seres vivos (42), tais como:

EFEITOS BENÉFICOS:

- Sinalização celular;
- Fagocitose;
- Regulação do crescimento celular.

EFEITOS PREJUDICIAIS:

- Peroxidação dos lipídios;
- Oxidação de proteínas;
- Danos ao DNA.

O excesso na formação endógena de RL pode ser causada por: (1) ativação aumentada de fagócitos; (2) interrupção dos processos normais de transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial; (3) aumento da concentração de íons metálicos de transição por escape do grupamento heme de proteínas em locais de

lesão ou doenças metabólicas e (4) por níveis diminuídos das defesas antioxidantes (43). Os RL podem causar reações em cadeia e danos às membranas celulares levando à lipoperoxidação (LPO) promovendo aumento na fluidez da membrana e quebra das funções secretórias e dos gradientes iônicos (44).

A reação da lipoperoxidação é um processo natural de renovação das membranas celulares. Essa reação ocorre em cadeia com as etapas de iniciação, propagação e terminação.

A iniciação é o primeiro passo dessa reação. O radical livre remove um átomo de hidrogênio de um ácido poli-insaturado. Na fase de propagação, ocorrem duas reações: 1) o carbono radical do lipídio tende a se estabilizar por rearranjo molecular, produzindo dienos conjugados que rapidamente reagem com o oxigênio formando um radical peroxil; 2) o radical peroxil capta um próton de outra molécula de lipídio, assim formando um hidroperóxido. Na etapa final, dois radicais peroxil reagem entre si, formando um tetróxido instável que se decompõe, dando origem ao oxigênio *singlet* e a carbonilas excitadas (figura 5) (45).

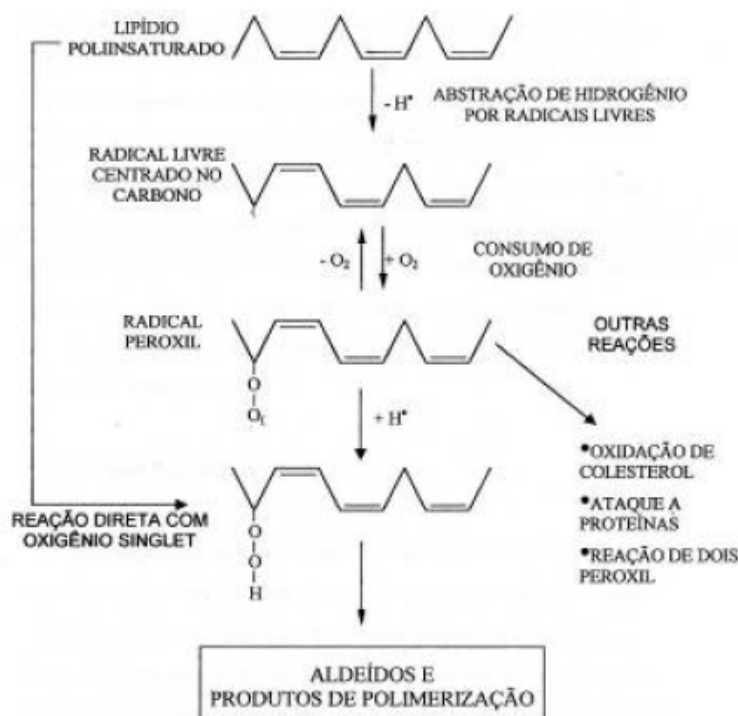


Figura 5: Representação esquemática da reação da LPO.
Fonte: Adaptada (41).

A produção excessiva dos radicais livres, quando ultrapassam a capacidade antioxidante ou quando ocorre uma diminuição das defesas antioxidantes no organismo, favorece o que denominamos de estresse oxidativo (43, 46).

1.2.1.1 Colite e Estresse Oxidativo

A destruição celular que ocorre nas DII, como na retocolite ulcerativa inespecífica, pode ser desencadeada pelo aumento da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na mucosa inflamada (47). A infiltração leucocitária na RCUI deve-se à ruptura da barreira colônica com a invasão bacteriana; assim, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas e metabólitos do ácido araquidônico e liberação de radicais livres de oxigênio. Esses fatores podem levar ao dano oxidativo (47, 48).

Estudos de Tüzün *et al.*, (2002) demonstraram que ERO são produzidas em excesso na RCUI gerando um aumento da lipoperoxidação, quando comparados a indivíduos normais (49). No estudo de Fillmann *et al.*, (2006) em animais com colite ulcerativa indeterminada induzida por ácido acético, foi avaliado o nível de lipoperoxidação através da técnica das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e observaram um elevado índice de LPO nos animais com colite comparados aos do grupo controle (35). Os mesmo resultados foram observados por Sklyarov *et al.*, (2011). Esse aumento da LPO foi comprovado medindo os níveis de malondialdeído (MDA) o qual é um marcador para lipoperoxidação e lesão tecidual (34).

Evidências sugerem que as ERO produzidas em excesso pela mucosa intestinal podem ser patogênicos na doença inflamatória intestinal. As principais fontes que desencadeiam a geração de ERO na mucosa são os neutrófilos e leucócitos ativados (50). Pravda (2005) aponta as ERO como as principais responsáveis pela cascata de eventos que leva à colite ulcerativa. Os colonócitos (células do cólon) são induzidos a gerar um excesso de RL que compromete a

barreira local da mucosa colônica e causa uma ativação imune transitória produzindo citocinas inflamatórias (51).

O infiltrado inflamatório, característico da RCUI, pode estar associado à ativação de neutrófilos e leucócitos e à elevada produção de ERO (50). Esses elementos levam à lesão tecidual resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α) produzido pelos macrófagos e células T, e a ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), mediador da ativação de genes envolvidos no processo inflamatório (7, 8, 47).

Estudos realizados por Takagi *et al.*, (2011) em modelo experimental de CUI induzido por dextran sulfato de sódio (DSS) avaliaram o nível de acumulação de neutrófilos pela técnica de mieloperoxidase (MPO) e a concentração de TNF- α no tecido intestinal, demonstrando que a atividade da MPO e o nível de TNF- α estavam aumentados na mucosa do intestino grosso de animais após a administração de DSS (52). Desta forma, a inibição ou neutralização dos radicais livres e das vias envolvidas na inflamação, juntamente com uma ativação dos sistemas antioxidantes endógenos, tanto enzimáticos como não enzimáticos, poderia ser benéfica no tratamento da DII (5, 7, 8).

Baseados nessas evidências, inúmeros estudos sugerem que a administração de antioxidantes podem ser benéfica para o tratamento da retocolite ulcerativa indeterminada, pois possuem propriedades que contribuem para a lesão tecidual, processo inflamatório e dano oxidativo.

1.2.2 Estresse Nitrosativo

O óxido nítrico (NO) é considerado um radical livre inorgânico que participa de muitos processos fisiológicos e patológicos, sendo um sinalizador ou fator de relaxamento derivado do endotélio e também age como um regulador na adesão plaquetária, na agregação de neutrófilos e na citotoxicidade de macrófagos (53,54).

A síntese do NO ocorre pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), através da conversão de L-arginina e oxigênio em L-citrulina e NO (figura 6). Existem três formas de NOS identificadas: óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) encontrada no endotélio vascular e a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) que regula a transmissão neuronal, ambas constitutivas. A óxido nítrico sintase induzível (iNOS) identificada primeiramente nos macrófagos está relacionada aos danos teciduais e presente na inflamação e apoptose celular (54, 55).

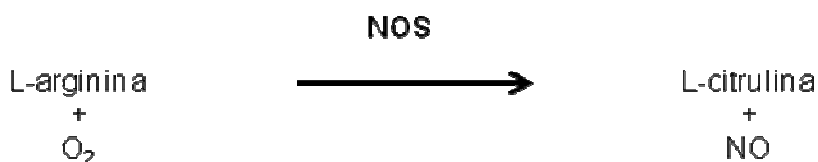


Figura 6: Síntese do NO.
Fonte: Adaptada (54).

O NO pode ser dividido de acordo com o mecanismo de ação da molécula com sua célula alvo. Esse mecanismo pode ocorrer de duas formas: quando interage diretamente com a molécula do sistema alvo e quando existem intermediários de espécies reativas de oxigênio como o $\text{O}_2^{\bullet-}$ que podem reagir com o NO, podendo levar à formação de espécies reativas de nitrogênio (ERN), como o peroxinitrito (ONOO^-) (53-55).

A produção exacerbada de espécies reativas de nitrogênio é conhecida como estresse nitrosativo. Isso ocorre quando a geração de ERN em algum sistema excede a habilidade do sistema em neutralizá-las e eliminá-las (56).

1.2.2.1 Colite e Óxido Nítrico

O óxido nítrico sob condições fisiológicas desempenha um papel significativo no fornecimento para os processos de modulação de impulsos nervosos, regulação da integridade e motilidade intestinal, assim como a citoproteção do intestino grosso (57). Estudos experimentais com animais sugerem que o óxido nítrico tem

ação inibitória sobre a musculatura lisa, promovendo o relaxamento do esfíncter anal (35).

Os mecanismos para o desenvolvimento da RCUI podem incluir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (interleucinas) e radicais livres e o aumento da síntese óxido nítrico, juntamente com uma elevada expressão da forma induzível (iNOS) (34, 58). Essas alterações causam diminuição da barreira da mucosa colônica, inflamação, ulcerações e hemorragias no intestino grosso. Estudos relatam que na mucosa intestinal de pacientes com RCUI foi observado um aumento da expressão da iNOS (59, 60).

Estudos têm demonstrado que a liberação de NO está associada à regulação da iNOS que, quando expressada, gera danos críticos às células da mucosa e submucosa do intestino (57, 61). A iNOS apresenta expressão aumentada em focos de inflamação associada com ulcerações e depleção das células caliciforme (54). Coburn *et al.* (2012) observaram uma expressão aumentada da iNOS em animais com CUI experimental pela análise de *Western Blot* em tecidos do intestino, corroborando com o estudo de Kazi *et al.* (2009) que demonstraram a mesma expressão elevada; porém pela análise de PCR em tempo real (RT-PCR) também foi observado o aumento dos níveis de NO nos animais com CUI (62, 31). Leitão *et al.*, (2011) observaram, no modelo experimental de mucosite que é considerada uma doença inflamatória, o aumento da expressão da iNOS nas amostras de jejuno avaliado por imunohistoquímica (63).

No presente estudo demonstramos a existência de infiltrado inflamatório na mucosa e submucosa do intestino de animais com colite induzida por AA. Na avaliação dos níveis dos metabólitos do óxido nítrico, pela técnica de nitritos e nitratos (NO₂/NO₃), foi observado um aumento significativo de NO no intestino dos animais com colite comparados aos controles (ANEXO A). A expressão da iNOS também foi avaliada por imunohistoquímica, observando-se uma intensa marcação da enzima no grupo colite e a ausência da mesma no grupo controle (ANEXO A1).

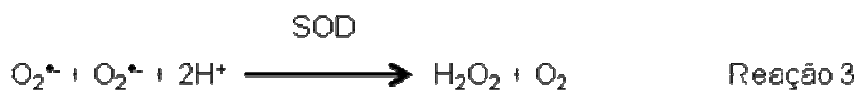
1.2.3 Antioxidantes

O organismo para compensar os danos causados por processos oxidativos possui um sistema antioxidante, constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos que atuam conjuntamente na proteção celular impedindo ou retardando o dano oxidativo. A função desses compostos é manter os níveis intracelulares de ERO em baixas concentrações e para isso atuam prevenindo a formação dessas espécies ou combatendo-as uma vez que tenham sido formadas (64).

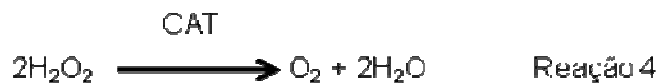
O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Existem, também, as defesas secundárias que impedem a propagação da LPO e as terciárias, enzimas responsáveis pelo reparo de danos já instalados (42).

O sistema enzimático encarregado de detoxificação das ERO é formado por muitas enzimas. Dentre elas estão: enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (46).

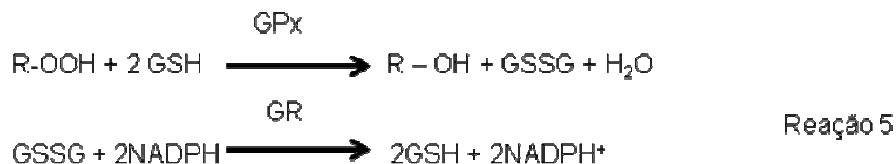
A SOD tem por principal função atuar na dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 e O_2 , sendo o primeiro menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas (reação 3) (65).



O H_2O_2 apesar de não ser considerado um RL, reage facilmente originando o $\bullet OH$. A remoção dos peróxidos ocorre por meio das enzimas CAT e da GPx. A CAT mostra mais afinidade ao peróxido de hidrogênio, de metila e etila, enquanto a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos (reação 4) (66).



Entre as peroxidases que geralmente usam o grupo heme, sobressai-se a atividade da GPx que está localizada no citosol e na matriz mitocondrial. Essa enzima catalisa a redução do peróxido de hidrogênio através da glutathiona reduzida (GSH) que será regenerada pela ação da glutathiona redutase (GRd) com consumo de NADPH ocorrendo a razão celular entre a glutathiona reduzida e a oxidada (GSH/GSSG) (reação 5) (41).



O sistema de defesa não-enzimático é formado por antioxidantes hidrossolúveis, como o α -tocoferol, também conhecido como vitamina E, promovendo a inibição da peroxidação de lipídios. O ácido ascórbico, conhecido também por vitamina C, atua como *scavenger* do radical ânion superóxido e radical hidroxil (41, 67, 68).

Os polifenóis, outro grupo de antioxidantes, são compostos por um ou mais anéis aromáticos que possuem grupos hidroxilas capazes de quelar metais e varrer radicais livres. Nesse grupo são encontrados os flavonóides quelantes de metais, varredores de radicais livres e neutralizantes do oxigênio *singlet* (69, 70).

1.3 *Boswellia serrata*

Desde tempos remotos, as plantas e seus produtos têm sido utilizados como principais recursos de alimento, abrigo, roupas, aromas, fragrâncias como também valiosos para medicamentos para a humanidade (9). No reino vegetal a família de *Burseraceae* é representada com 17 gêneros e 600 espécies, amplamente distribuídas em todas as regiões tropicais. Os gêneros mais estudados e importantes dessa família são a *Cammiphora* e *Boswellia*. Esta compreende mais de 20

espécies. Essas plantas têm valor comercial, pois produzem substâncias utilizadas como matéria-prima de bálsamo e óleos (71, 72).

A origem botânica de espécies de *Boswellia* tem sido caracterizada como (73):

Divisão: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisão: <i>Angiospermae</i>
Tribo: <i>Rosopsida</i>
Subtribo: <i>Rosidae</i>
Classe: <i>Anacardiales</i>
Família: <i>Burseraceae</i>
Genêro: <i>Boswellia</i>
Espécie: <i>Boswellia serrata</i>

Quadro 1: Origem botânica da planta *Boswellia serrata*.

Fonte: Adaptada (73).

A espécie *Boswellia serrata* é encontrada principalmente na Índia, mas se distribui também pela região nordeste da costa da África e Oriente Médio. As árvores dessa espécie são normalmente de tamanho médio, medindo uma altura de 3 a 12 metros (figura 7). As suas folhas são longas, serrilhadas, opostas, sésseis com forma variada em ovaladas e lanceoladas (figura 8) (74).

A planta *B. Serrata* permanece com folhas por 2-3 semanas antes e durante a floração e frutificação. Em média, cada ramo produz $7,2 \pm 2,3$ inflorescências e cada inflorescência produz aproximadamente 20 flores actinomorfas com coloração branca e rosa (figura 8). Os frutos menores que 1 cm de comprimento são cápsulas globosas e secas (figura 9), sendo a produção de fruto escassa nessa espécie, interferindo na reprodução da planta (75).

A partir da casca do tronco é obtido o óleo-goma-resina, o qual tem sido amplamente utilizado na medicina tradicional indiana. O óleo-goma-resina é extraído

de uma incisão no tronco da planta, contendo óleos voláteis 5-10%, goma de 20-30 % e resina de 50-60% (79).



Figura 7: Vista geral da planta *Boswellia serrata*.
Fonte: Adaptada (76).



Figura 8: Vista geral das folhas e flores da planta *Boswellia serrata*.
Fonte: Adaptada (77).



Figura 9: Vista geral dos frutos da planta *Boswellia serrata*.
Fonte: Adaptada (78)

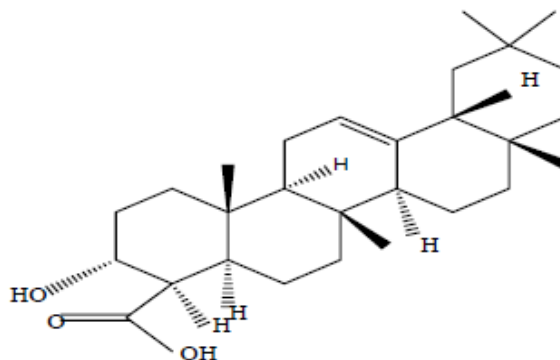
A característica desse óleo, no momento da extração, é semissólido. Entretanto, aos poucos torna-se sólido e a resina endurecida é dividida em pequenas partes e dividida de acordo com sua cor, forma e tamanho (figura 10) (79).



Figura 10: Resina obtida do tronco.
Fonte: Adaptada (78).

A resina obtida a partir da casca contém alguns constituintes químicos identificados como: alcalóides, terpenóides, taninos, fenóis, saponinas e triterpenos pentacíclicos. Os constituintes majoritários da resina são os ácidos triterpenos pentacíclicos, conhecidos como ácidos boswellicos (BA) (figura 11) (79, 80).

β – ácido boswellico



α – ácido boswellico

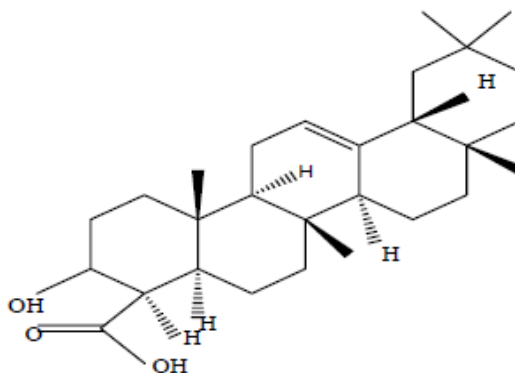


Figura 11: Estruturas dos ácidos β -boswellico e α -boswellico.
Fonte: Adaptada (80).

Os ácidos boswellicos estão divididos em: β -boswellico, α -boswellico, 3-acetil- β boswellico, 3-acetil- α -boswellico, 11-ceto- β -boswellico (KBA), 3-acetil-11-ceto- β boswellico (AKBA) (figura 12) (80).

Estudos recentes demonstram que o extrato de *B. Serrata* apresenta propriedades antioxidantes como os compostos fenólicos: flavonóides e taninos (81). A partir de investigações realizadas por Sharma et al. (2011) foi sugerido o efeito antioxidante do extrato aquoso de *B. serrata* pois demonstrou alta capacidade de inibir alguns radicais livres, tais como: o radical ânion superóxido e radical hidroxil (82).

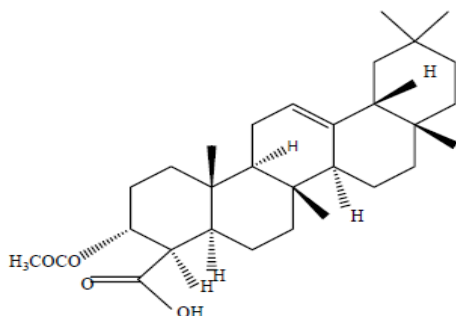
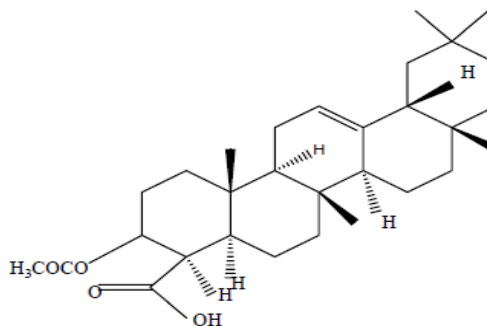
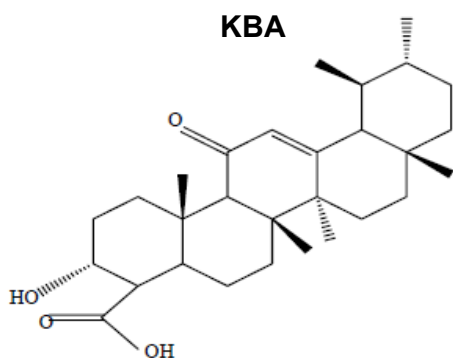
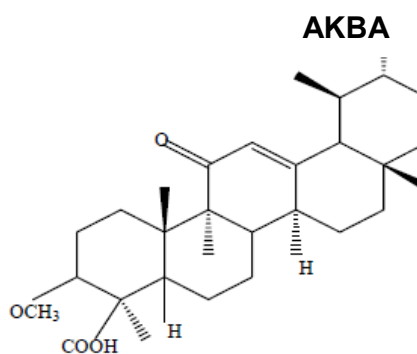
β – acetil - ácido boswellico α – acetil - ácido boswellico11 – ceto – β – ácido boswellico11 – acetil – ceto – β – ácido boswellico

Figura 12: Estruturas de quatro ácidos triterpenos pentacíclicos.
Fonte: Adaptada (80).

A maioria dos extratos de plantas apresenta uma ação antioxidante devido à presença de flavonóides. Assim, são capazes de diminuir os efeitos oxidativos gerados pelos RL e, por consequência, as doenças implicadas a eles (83).

Os princípios ativos da *B. serrata* com atividade farmacológica mais estudada são os ácidos boswellicos, pois possuem ação anti-inflamatória, antiaterosclerótica, anti-fibrótica, antimicrobiana, anti-tumorais e também antiulcerativa (11, 81, 84-86). O extrato da *B. serrata* é utilizado para o tratamento de doenças com características inflamatórias, pois se sugere que esses compostos têm ação direta na inibição/diminuição da síntese de leucotrienos (LT), os quais estão envolvidos na iniciação e manutenção da inflamação, onde a enzima chave do processo é a 5-lipoxigenase (87-89).

A investigação desses compostos está sendo realizada para o tratamento de algumas doenças como: artrite reumatóide, osteoartrite, asma brônquica e doenças intestinais inflamatórias como retocolite ulcerativa indeterminada e doença de *Crohn* (11, 73, 90-92).

Trabalhos com modelos experimentais de doenças inflamatórias evidenciam a ação anti-inflamatória do extrato de *B. serrata*. Anthoni *et al.* (2006) utilizaram o tratamento no modelo de colite ulcerativa indeterminada e observaram a atenuação significativa do recrutamento de leucócitos (14). Latella *et al.* (2008) administraram via oral o extrato de *B. serrata* conjugado com *Scutellaria* e demonstraram que o extrato de *B. serrata* possui atividade anti-inflamatória e imunomoduladora devido aos princípios ativos contidos no extrato (93). Krieglstein *et al.* (2001) em modelo experimental de ileíte, também observou uma inibição da adesão de leucócitos nos animais tratados (94). Esses estudos relataram uma atividade protetora do extrato de *B. serrata* contra a lesão tecidual da mucosa do intestino grosso e íleo de ambos os modelos (93, 94).

Pesquisas clínicas sugerem que o extrato de *B. serrata* exerce efeitos positivos no tratamento de algumas doenças como a retocolite ulcerativa indeterminada e osteoartrite. Além disso, mostrou uma melhora dos sintomas em pacientes com tumores cerebrais.

Gupta *et al.* (1997) evidenciaram que *B. serrata* seria um tratamento eficaz para RCUI, pois 14 dos 20 pacientes tratados mostraram uma melhora dos sintomas da doença e entraram em remissão (95). Além disso, o tratamento com o extrato, quando comparado com o tratamento convencional por sulfassalazina, não demonstrou efeitos colaterais, o que não impede o seu uso prolongado.

Kirste *et al.* (2011) demonstraram que pacientes portadores de tumores cerebrais que realizaram o tratamento com o extrato de *B. serrata* demonstraram um benefício na resposta à radiação e uma redução do edema cerebral no grupo tratado com o extrato (96). Gupta *et al.* (2011) observaram que os pacientes com osteoartrite que receberam a administração do extrato via oral e tópica relataram uma melhora da dor e dos sintomas relacionados a essa doença (97).

Estudos experimentais utilizando o extrato obtido da resina da planta *Boswellia serrata* são necessários para compreender seus efeitos e seus mecanismos de ação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antioxidante do extrato da resina da planta *Boswellia serrata* no modelo experimental de colite induzida por ácido acético nos diferentes grupos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar as alterações na pressão anal esfinteriana nos diferentes grupos de animais submetidos à colite experimental e à ação da *Boswellia serrata*;
- 2) Avaliar as alterações histológicas da porção distal do intestino grosso dos animais, através da coloração por hematoxilina e eosina;
- 3) Analisar a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) por imunohistoquímica;
- 4) Avaliar os níveis de lipoperoxidação no intestino grosso dos animais através das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- 5) Avaliar a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) no intestino grosso dos animais;
- 6) Avaliar os níveis de GSH no intestino grosso dos animais;
- 7) Avaliar os metabólitos do Óxido Nítrico (nitritos/nitratos) no intestino grosso dos animais.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Podolsky DK, Fiocchi C. Cytokines, chemokines, growth factors, eicosanoids and other bioactive molecules in inflammatory bowel disease. In: Kirsner JB, ed. Inflammatory bowel disease. 5th edn. Philadelphia: WB Saunders, 2000, p.191-207.
2. Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1996 Oct;4(10):2078-86.
3. Carrier J, Aghdassi E, Platt I, Cullen J, Allard JP. Effect of oral iron supplementation on oxidative stress and colonic inflammation in rats with induced colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001 Dec;15(12):1989-99.
4. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th edn. New York:Oxford University Press Inc; 2007.
5. Nielsen OH, Rask-Madsen J. Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1996;216:149-59.
6. Tahan G, Aytac E, Aytekin H, Gundun F, Dogusoy G, Aydin S, et al. Vitamin E has a dual effect of anti-inflammatory and antioxidant activities in acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Can J Surg*. 2011 Oct;54(5):333-8.
7. Fillmann H, Kretzmann NA, San-Miguel B, Llesuy S, Marroni N, González-Gallego J, et al. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and downregulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicology*. 2007 Jul 17;236(3):217-26.
8. Kretzmann NA, Fillmann H, Mauriz JL, Marroni CA, Marroni N, González-Gallego J, et al. Effects of glutamine on proinflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa B and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Nov;14(11):1504-13.
9. Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect*. 2001 Mar;109 Suppl 1:69-75.
10. Safayhi H, Sailer ER, Ammon HP. Mechanism of 5-Lipoxygenase Inhibition by Acetyl-11-keto- β -boswellic Acid. *Mol Pharmacol*. 1995 Jun;47(6):1212-6.
11. Ke F, Yadav PK, Ju LZ. Herbal medicine in the treatment of ulcerative colitis. *Saudi J Gastroenterol*. 2012 Jan-Feb;18(1):3-10.

12. Hartmann RM, Morgan Martins MI, Tieppo J, Fillmann HS, Marroni NP. Effect of *Boswellia serrata* on Antioxidant Status in an Experimental Model of Colitis Rats Induced by Acetic Acid. *Dig Dis Sci*. 2012 Aug;57(8):2038-44.
13. Hugot JP, Zouali H, Lesage S, Thomas G. Etiology of the inflammatory Bowel diseases. *Int. J. Colorectal. Dis*. 1999 Feb;14(1):2–9.
14. Anthoni C, Laukoetter MG, Rijcken E, Vowinkel T, Mennigen R, Müller S, et al. Mechanisms underlying the anti-inflammatory actions of boswellic acid derivatives in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Jun;290(6):G1131–7.
15. Goldim JR, Raymundo MM. Pesquisa em saúde e direitos dos animais. (HCPA, Porto Alegre),1997.
16. Robbins, Cotran. Fundamentos de Patologia. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.
17. Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P, Shanahan F, et al. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res*. 2007 Feb;6(2):546-51.
18. Misiewicz JJ, Pounder RE, Venables CW. Diseases of the gut and pancreas. 2nd ed. Oxford; Blackwell Scientific: 1994.
19. Stenson WF, Tremaine WJ, Cohen RD. Inflammatory bowel disease. In: Yamada T, Alpers D, Kalloo N, et al. (Eds.) *Atlas of Gastroenterology*. 4nd Ed. Wiley-Blackwell; 2009.
20. Pohl C, Hombach A, Kruis W. Inflammatory bowel disease and cancer. *Hepatogastroenterology*. 2000 Jan-Feb;47(31):57-70.
21. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*. 2002 Sep 19;347(12):911-20.
22. Lakatos L, Lakatos PL. Changes in the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Orv Hetil*. 2007a Feb 4;148(5):223-8.
23. DATASUS - Informações de Saúde – Assistência a Saúde [homepage na internet]. Internações de pacientes com enterocolites no Rio Grande do Sul. [acesso em 5 nov 2012]. Disponível em: www.datasus.gov.br
24. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. 1998 Jul;115(1):182-205.
25. Lakatos L, Lakatos PL. Medical therapy of inflammatory bowel diseases: ulcerative colitis. *Oiv Hetil*. 2007b Jun 24;148(25):1163-70.
26. Rossignol DA. Hyperbaric oxygen treatment for inflammatory bowel disease: a systematic review and analysis. *Med Gas Res*. 2012 Mar 15;2(1):6.

27. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):427-34.
28. Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2004 Sep-Oct;50(2):81-92.
29. El Yousfi M, Breuillé D, Papet I, Blum S, André N, Mosoni L, et al. Increased tissue protein synthesis during spontaneous inflammatory bowel disease in HLA-B27 rats. *Clin Sci (Lond)*. 2003 Oct;105(4):437-46.
30. Mizoguchi A. Animal models of inflammatory bowel disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012;105:263-320.
31. Kazi AH, Qian Z. Crocetin Reduces TNBS-Induced Experimental Colitis in Mice by Downregulation of NFκB. *Saud J Gastroenterol*. 2009 July-Sep;15(3): 181–187.
32. López-Posadas R, Requena P, González R, Suárez MD, Zarzuelo A, Sánchez de Medina, et al. Bovine glycomacropeptide has intestinal antiinflammatory effects in rats with dextran sulfate-induced colitis. *J Nutr*. 2010 Nov;140(11):2014-9.
33. Damiani CR, Benetton CA, Stoffel C, Bardini KC, Cardoso VH, Di Giunta G, et al. Oxidative stress and metabolism in animal model of colitis induced by dextran sulfate sodium. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Nov;22(11):1846-51.
34. Sklyarov AY, Panasyuk NB, Fomenko IS. Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis. *J. Physiol Pharmacol*. 2011 Feb;62(1):65-73.
35. Fillmann HS, Kretzmann N, Llesuy S, Fillmann LS, Marroni NP. O Papel do Óxido Nítrico na Pressão Anal Esfincteriana de Ratos Submetidos à Colite Experimental. *Rev Bras Coloproctol*. 2006 Dez;26:437–442.
36. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 1973 Jul;134(3):707-16.
37. Morgan-Martins MI. A Reposição de Estrogênio Diminui o Dano Oxidativo, Aumenta a Atividade das Enzimas Antioxidantes e melhora a Função Cardíaca em Ratas. Porto Alegre. Tese [Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.
38. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:143-83.
39. Maxwell SR. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. 1995 Mar;49(3):345-61.
40. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994 Sep 10;344(8924):721-4.
41. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*. 1999 Oct;31(4):261-72.

42. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):312-22.
43. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47-95.
44. Kozlov AB, Ostrachovitch EA, Afanas'ev IB. Mechanism of inhibitory effects of chelating drugs on lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Biochem Pharmacol.* 1994 Mar 2;47(5):795-9.
45. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
46. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007 Nov;35(Pt 5):1147-50.
47. Grisham MB. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet.* 1994 Sep 24;344(8926):859-61.
48. Closa D, Folch-Puy E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life,* 2004 Apr;56(4):185-91.
49. Tüzün A, Erdil A, Inal V, Aydın A, Bağcı S, Yeşilova Z, et al. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Biochem.* 2002 Oct;35(7):569-72.
50. Aslan M, Nazligu Y, Bolukbas C, Bolukbas FF, Horoz M, Dulger AC, et al. Peripheral lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with ulcerative colitis. *Pol Arch Med Wewn.* 2011 Jul-Aug;121(7-8):223-9.
51. Pravda J. Radical Induction Theory of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2005 Apr 28;11(16):2371-84.
52. Takagi T, Naito Y, Uchiyama K, Suzuki T, Hirata I, Mizushima K, et al. Carbon monoxide liberated from carbon monoxide-releasing molecule exerts an anti-inflammatory effect on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Dig Dis Sci.* 2011 Jun;56(6):1663-71.
53. Fang FC. Perspective series, host/pathogen interactions. Mechanism of nitric oxide related antimicrobial activity. *J Clin Invest.* 1997 Jun 15; 99(12):2818-25.
54. Liaudet L, Soriano FG, Szabó C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med.* 2000 Apr;28(4 Suppl):N37-52.
55. Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:203-36.
56. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.

57. Porras M, Martín MT, 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*. 2006 Mar;290(3):G423-30.
58. Dudhgaonkar SP, Tandan SK, Kumar D, Raviprakash V, Kataria M. Influence of simultaneous inhibition of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in experimental colitis in rats. *Inflammopharmacology*. 2007 Oct;15(5):188-95.
59. Blázovics A, Hagymási K, Prónai L. Cytokines, prostaglandins, nutritive and non nutritive factors in inflammatory bowel diseases. *Orv Hetil*. 2004 Dec 12;145(50):2523-9.
60. Alkim C, Sakiz D, Alkim H, Livaoglu A, Kendir T, Demorsoy H, et al. Thrombospondin-1 and VEGF in inflammatory bowel disease. *Libyan J Med*. 2012;7. doi:10.3402/ljm.v7i0.8942.
61. Miller MJ, Sadowska-Krowicka H, Chotinaruemol S, Kakkis JL, Clark DA. Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. *J. Pharmacol Exp Ther*. 1993 Jan;264(1):11-6.
62. Coburn LA, Gong X, Singh K, Asim M, Scull BP, Allaman MM et al. L-arginine supplementation improves responses to injury and inflammation in dextran sulfate sodium colitis. *Plos One*. 2012;7(3):e33546. doi: 10.1371/journal.pone.0033546.
63. Leitão RF, Brito GA, Orjá RB, Braga-Neto MB, Bellaguarda EA, Silva JV et al. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. *BMC Gastroenterol*. 2011 Aug 16;11:90.
64. Sies H. Strategies of antioxidant defence. *Eur J. Biochem*. 1993 Jul 15;215(2):213-9.
65. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 1979 Jul;59(3):527-605.
66. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J*. 1992 Jun;6(9):2675-83.
67. Viswanatha Swamy AH, Wangikar U, Koti BC, Thippeswamy AH, Ronad PM, Manjula DV. Cardioprotective effect of ascorbic acid on doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats. *Indian J Pharmacol*. 2011 Sep;43(5):507-11.
68. John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nutr Biochem*. 2001 Sep;12(9):500-4.
69. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. 2000 Jul;63(7):1035-42.
70. van Acker AS, van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(3):331-42.
71. Vollesen, K. Burseraceae. In: Hedberg I, Edwards S (eds), *Flora of Ethiopia*, vol 3. Ethiopia: Addis Ababa: Addis Ababa University, 1989, p.442-478.

72. Basch E, Boon H, Davies-Heerema T, Foppo I, Hashmi S, Hasskarl J, et al. *Boswellia*: an evidence-based systematic review by the Natural Standard Research Collaboration. *J Herb Pharmacother*. 2004;4(3):63-83.
73. Siddigui MZ. *Boswellia serrata*, a potential antiinflammatory agent: an overview. *Indian J Pharm Sci*. 2011 May;73(3):255-61.
74. Sunnichan VG, Mohan Ram HY, Shivanna KR. Reproductive biology of *Boswellia serrata* the source of salai guggul, an important gum-resin. *Bot J Linn Soc*. 2005;147:73-82.
75. Gromm N. *Frankincense and Myrrh: A Study of the Arabian Incense Trade*. United Kingdom: Longman Group United Kingdom; 1981. p. 285.
76. Index of Medicinal Herbs – Herbal Supplements Resource [homepage na internet]. Medicinal Herb: *Boswellia serrata*. [acesso 4 ago 2012]. Disponível em: <http://www.herbal-supplement-resource.com>
77. Sallaki – Ayurvedayogashram – Salakki (*Boswellia serrata*). [acesso em 4 ago 2012]. Disponível em: <http://www.ayurvedayogashram.com/sallaki.asp>
78. Shalakki – AyurvedicDietSolutions [homepage na internet]. Shalakki: *Boswellia serrata*. [acesso em 4 ago 2012]. Disponível em: <http://www.ayurvedicdietsolutions.com/shallaki.php>
79. Siddigui MM, Afag SH, Asif M. Chemical standardization of 'kundur' (Oleo-Gum-Resin of *Boswellia serrata* Roxb). *Anc Sci Life*. 1984 Jul;4(1):48-50.
80. Krüger P, Danesshar R, Eckert GP, Klein J, Volmer DA, Bahr U, et al. Metabolism of boswellic acids in vitro and in vivo. *Drug Metab Dispos*. 2008 Jun;36(6):1135-42.
81. Zeeyaaddin K, Lajshmi N, Abid M, Ibrahim M. Evaluation of antiulcer activity of *Boswellia serrata* bark extracts using aspirin induced ulcer model in albino rats. *J Med Allied Sci*. 2011 Jan [acesso em 15 de setembro de 2011]; 1(1):14-20. Disponível em: <http://www.jmas.in>
82. Sharma A, Upadhyay J, Jain A, Kharya MD, Namdeo A, Mahadik KR. Antioxidant activity of aqueous extract of *Boswellia serrata*. *J Chem Bio Phy Sci* [periódicos na internet]. 2011 Jun [acesso em 15 de setembro de 2011]; 1(1):60-71. Disponível em: <http://www.jcbosc.org/>
83. Márquez L, Pérez-Nievas BG, Gárate O, García-Bueno B, Madrigal JL, Menchén L, et al. Anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract in a model of colitis. *World J Gastroenterol*. 2010 Oct;21;16(39):4922-31.
84. Cuaz-Pérolin C, Billiet L, Baugé E, Scott-Algara D, Genze F, et al. Antiinflammatory and antiatherogenic effects of the NF-kappaB inhibitor acetyl-11-keto-beta-boswellic acid in LPS-challenged ApoE^{-/-} mice. *Arterioscle Throm Vasc Biol*. 2008 Feb;28(2):272-7.

85. Ali EN, Mansour SZ. Boswellic acids extract attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin and oxidative stress from gamma irradiation in rats. *Chin Med*. 2011 Sep;30:6:36.
86. Raja AF, Ali F, Khan IA, Shawl AS, Arora DS, Shah BA, et al. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of acetyl-11-keto- β -boswellic acid from *Boswellia serrata*. *BMC Microbiol*. 2011 Mar;16:11:54.
87. Sharma ML, Khajuria A, Kaul A, Singh S, Singh GB, Atal CK. Effect of salai guggal ex-*Boswellia serrata* on cellular and humoral immune responses and leucocyte migration. *Agents Actions*. 1988 Jun;24(1-2):161-4.
88. Schweizer S, von Brocke AF, Boden SE, Bayer E, Ammon HP, Safayhi H. Workup-dependent formation of 5-lipoxygenase inhibitory boswellic acids analogues. *J Nat Prod*. 2000 Aug;63(8):1058–61.
89. Rahimi R, Shams-Ardekani MR, Abdollahi M. A review of the efficacy of traditional Iranian medicine for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2010 Sep;16(36):4504–14.
90. Sharma S, Thawani V, Hingorani L, Shrivastava M, Bhate VR, Khiyani R. Pharmacokinetic study of 11-keto-b-Boswellic acid. *Phytomedicine*. 2004 Feb;11(2-3):1255–60.
91. Miller AL. The etiologies, pathophysiology, and alternative/complementary treatment of asthma. *Altern Med Rev*. 2001 Feb;6(1):20-47.
92. Borrelli F, Capasso F, Capasso R, Ascione V, Aviello G, Longo R, et al. Effect of *Boswellia serrata* on intestinal motility in rodents: inhibition of diarrhoea without constipation. *Br J Pharmacol*. 2006 Jun;148(4):553-60.
93. Latella G, Sferra R, Vetuschi A, Zanninelli G, D'Angelo A, Catitti V, et al. Prevention of colonic fibrosis by *Boswellia* and *Scutellaria* extracts in rats with colitis induced by 2,4,5-trinitrobenzene sulphonic acid. *Eur J Clin Invest*. 2008 Jun;38(6):410-20.
94. Krieglstein CF, Anthoni C, Rijcken EJ, Laukötter M, Spiegel HU, Boden SE, et al. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid, a constituent of a herbal medicine from *Boswellia serrata* resin, attenuates experimental ileitis. *Int J Colorectal Dis*. 2001 Apr;16(2):88-95.
95. Gupta I, Parihar A, Malhotra P, Singh GB, Lüdtke R, Safayhi H, et al. Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with ulcerative colitis. *Eur J Med Res*. 1997 Jan;2(1):37-43.
96. Kirste S, Treier M, Wehrle SJ, Becker G, Abdel-Tawab M, Gerbeth K, et al. *Boswellia serrata* acts on cerebral edema in patients irradiated for brain tumors: a prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind pilot trial. *Cancer*. 2011 Aug 15;117(16):3788-95.

97. Gupta PK, Samarakoon SM, Chandola HM, Ravishankar B. Clinical evaluation of *Boswellia serrata* (Shallaki) resin in the management of Sandhivata (osteoarthritis). *Ayu.* 2011 Oct;32(4):478-82.

4 ARTIGO PUBLICADO

Digestive Diseases Sciences

Effect of *Boswellia serrata* on antioxidant status in an experimental model of colitis rats induced by acetic acid

Renata Minuzzo Hartmann, Maria Isabel Morgan Martins, Juliana Tieppo, Henrique Sarubbi Fillmann, Norma Possa Marroni

Abstract

Aim of the study: To evaluate the antioxidant effect of an extract of the plant *Boswellia serrata* in an experimental model of acute ulcerative colitis induced by administration of acetic acid (AA) in rats.

Materials and Methods: The extract of *B. serrata* (34.2 mg/kg/day) was administered orally by gavage for 2 days before and after induction of colitis with AA diluted to 4% and in a volume of 4 ml.

Results: The anal sphincter pressure in the groups treated with *B. serrata* showed a significant increase compared to the colitis group ($p < 0.001$). Histological analysis of treated animals showed less edema with preservation of mucosal crypts. Lipid peroxidation showed a significant decrease in the treated groups compared to colitis group ($p < 0.001$). The superoxide dismutase (SOD) enzyme activity showed a significant reduction in the treated groups compared to the colitis group ($p < 0.001$), the glutathione peroxidase (GPx) significantly increased in the treated groups compared to colitis group ($p < 0.05$) and the same was the result of glutathione (GSH) ($p < 0.05$).

Conclusions: The extract of *B. serrata* has active antioxidant substances that exert protective effects in acute experimental colitis.

Keywords: Antioxidant, *Boswellia serrata*, Inflammation, Oxidative Stress, Radical scavenger, Ulcerative colitis

Abbreviations: ANOVA, one-way analysis of variance; GPx, glutathione peroxidase; GSH, glutathione; IBD, inflammatory bowel disease; iNOS, inducible nitric oxide; LPO, Lipid peroxidation; NO, nitric oxide; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; UC, ulcerative colitis.

1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is characterized by chronic inflammation of the gastrointestinal tract, involving an unknown specific pathogen [1,2]. Some etiological factors, including genetic, immunological and environmental, have been implicated in the pathophysiology of the disease. Thus, included in this classification is ulcerative colitis (UC), which involves only the colon and rectum and is characterized by leukocyte infiltration in the mucosa and superficial ulcers [3].

The leukocyte infiltration in UC is due to colonic barrier rupture and invasion of bacterial and antigenic stimuli, with a release of inflammatory mediators, such as cytokines, arachidonic acid metabolites and release of oxygen free radicals, which can lead to oxidative damage [4,5]. In the study of Tüzün [6] it was found that the reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species are overproduced in patients with colitis causing adverse effects, such as lipid peroxidation of membrane, attack to tissue proteins and DNA [7].

The organism has defenses against ROS which are known as antioxidants. They are divided in two main types: enzyme such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) and a non-enzymatic: glutathione (GSH), ascorbic acid (vitamin C) and flavonoids, among others. The function of these enzymes is to maintain the levels of ROS in low concentrations, thereby acting to prevent the formation of such species [8,9].

Thus, it is necessary to find substances that can inhibit, prevent or ameliorate the damage caused by reactive oxygen species produced in colitis, antioxidants with anti-inflammatory action are consistent with the decrease of damage caused by these substances [10].

Some plants have antioxidant properties for the organism, so they are indicated for the treatment and prevention of many diseases, such as the plant *Boswellia serrata* (*B. serrata*) from India. It is part of the group of angiosperms, the family *Burseraceae*, which contains phenolic compounds that are characterized by a benzene ring, a carboxyl terminus and one or more hydroxyl groups and/or methoxyl in the molecule [11,12]. It confers antioxidant properties on the organism. The extract of *B. serrata*, taken from its trunk, has been used in traditional medicine in India and other eastern countries to treat inflammatory diseases such as arthritis, osteoarthritis and IBD and is also effective in preventing lipid oxidation [13].

The active substance in the extract of *B. serrata* is known as boswellic acid (BA), which is characterized by a pentacyclic triterpenes containing antioxidant properties [12], such as anti-inflammatory, anti-atherosclerotic, anti-hepatotoxic and anti-hyperlipidemic [14]. These active ingredients act as free radicals scavengers, and sometimes as metal chelators, acting in both as the initiation step in the propagation of the oxidative process [15].

As already demonstrated in several studies, an excessive production of ROS and inflammation occurs in UC, leading to oxidative damage in tissues, so it is necessary to seek antioxidant therapies to reduce the damage generated. In this study, we evaluated the antioxidant capacity of *B. serrata* to reduce oxidative and tissue damage in experimental colitis by acetic acid in rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The study used 25 male Wistar rats weighing 300g. They were divided in five groups: control (CO), colitis (CL), control + Boswellia (CO+B), colitis + Boswellia (CL+B) and Boswellia + colitis (B+CL). The animals were kept in the vivarium of the Lutheran University of Brazil (ULBRA) during the experiment, in a cycle of 12 hours light/dark and temperature between 20 and 25 °C. Water and food were given *ad libitum*. The model chosen for the induction of colitis was adapted from those described by Yamada [16] and Tannahill et al. [17]. The animals received intracolonic administration of acetic acid 4% in a volume of 4 ml by enema. The groups received extract of *B. serrata* orally, 34.2 mg/kg/day, corresponding to the dose of *B. serrata* extract/kg applied in previous study Krieglstein et al. [18], 48 hours before and after induction of colitis once a day until the end of the experiment. The drug used in this experiment was the laboratory of the Vedica® Apsen Fitomedicine where 350 mg of dry extract of *B. serrata* Roxb. ex Colebr - Burseraceae corresponds to 3 mg AKBA acid (3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid). The active are isolated boswellic acids among them the 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA), the active principle, which is more relevant and potent in inhibiting the action of leukotrienes, through direct action on the 5-lipoxygenase. The pharmacokinetics of AKBA include a peak plasma

level is 4.5 ± 0.55 h, the half-life is determined as $\neq 5.97 \pm 0.95$ h, the mean volume of distribution is 22 ± 142.87 , 78 l, and the clearance is 296.10 ± 0.9 ml/min.

The death of the animals was performed after pressure measurements. For the anesthesia of the animal we used xylazine hydrochloride 50 mg/kg and ketamine hydrochloride 100 mg/kg body weight intraperitoneally for removal of the distal colon (8 cm). After that, euthanasia was performed by exsanguination under anesthesia.

Experiments followed a protocol observed by the Animal Ethics Committee of the Lutheran University of Brazil (ULBRA) with the recommendations of the European Union regarding animal experimentation - Directive of the European Council 86/609/EEC [19].

2.2. Anal sphincter pressure measurements

Before the euthanasia, the animals were lightly anesthetized with Isoflurane® to perform the anal sphincter pressure measurement. We performed anorectal manometry (Proctosystem-Viotti - SP) with a balloon catheter and measured in cm of H₂O. Three measurements were made subsequently made in each animal [20].

2.3. Histological analysis

For histological examination, a portion of the intestine was placed in buffered formalin. Later, they were included in paraffin blocks, after being cut on a rotary microtome at a thickness of 3 µm. We performed staining with hematoxylin-eosin (HE) for histological usual. The slides were analyzed in LABOPHOT NIKON binocular microscope at a magnification of x200.

2.4. Intestine homogenates

The intestines were weighed and homogenized for 30 seconds in an Ultra-Turrax (IKA-WERK) for 40 seconds at 4°C in the presence of 1.15% KCl (9 ml per g of tissue) and methyl phenyl sulfonyl fluoride (PMSF) at a concentration of 100 mM in isopropanol (10µL per ml of KCl added). Then the homogenates were centrifuged for 10 minutes at 3,000 rpm in a refrigerated centrifuge (SORVALL Super T21 –

Condensed Operating Kendro Laboratory Products - USA). The supernatant was pipetted into Eppendorf flasks, and the precipitate was discarded. The samples were stored again at -80°C for posterior analyses [21].

2.5 Protein

The proteins were quantified by the method described by Lowry and colleagues, using as a standard solution of bovine albumin at a concentration of 1 mg/ml. The samples were measured spectrophotometrically at 625 nm, and values expressed in mg/ml. The values were used to calculate values of TBARS (thiobarbituric acid–reactive substances) and antioxidant enzymes [22].

2.6 Lipid peroxidation

The amount of aldehydes generated by lipid peroxidation was measured by the TBARS method, which measures the amount of substances reacting with thiobarbituric acid. The samples were incubated at 100°C for 30 minutes after addition of 500 μl of 0.37% thiobarbituric acid in 15% trichloroacetic acid and centrifuged at 3,000 rpm (1,612.8g) for 10 minutes at 4°C . Absorbance was determined spectrophotometrically at 535 nm [23].

2.7. Antioxidants Enzyme Analyses

The analysis of superoxide dismutase (SOD) is based on the inhibition of the reaction of the superoxide radical with adrenaline, detected spectrophotometrically at 480 nm and values expressed in U/mg prot. [24]. The activity of glutathione peroxidase (GPx) is based on the consumption of NADPH in the reduction of oxidized glutathione, detected spectrophotometrically at 340 nm for three minutes and values expressed in mmoles/min/mg prot [25]. The measurement of glutathione (GSH) detected spectrophotometrically at 412 nm and values expressed in $\mu\text{mol/mg}$ prot., made according to method of Beutler *et al.* [26].

2.8. Statistic analysis

Statistical analysis

All data are presented as means \pm SE. Statistical significance was calculated using Graphpad Instat, version 3.0 for Windows. We used variance analysis (ANOVA) and Student's-Newman-Keuls test for multiple analysis, adopting a significant level of 5% ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Histology

The slides were stained with hematoxylin-eosin (HE) and analyzed at x200 magnification. Figure 1 A shows a photomicrograph of an animal in the control group (CO) in which we can observe the integrity of the crypts (CP) with simple glandular epithelium and normal submucosa (SM). Figure 1 B is a photomicrograph of an animal of control *Boswellia* group (CO+B) showing similar architecture to the control group. Figure 1 C is a photomicrograph of an animal of colitis group (CL) showing changes in the architecture of the colon, destruction of CP, submucosal edema (E) and inflammatory infiltrate (IF). Figure 1 D is a photomicrograph of an animal of prophylactic treatment group (B+CL) in which we can observe a preservation of CP and inflammatory infiltrate. Figure 1 E is a photomicrograph of an animal of colitis group treated with *Boswellia serrata* (CL+B) in which we can observe a preservation of CP with glandular epithelium, and less inflammatory infiltrate.

3.2. Anal sphincter pressure and Lipid peroxidation

The results of the anal sphincter pressure showed a significant increase in the treated groups (CL+B and B+CL) compared to the colitis group ($p < 0.001$) (Figure 2 A). The analysis about the values of lipid peroxidation (LPO) obtained by TBARS showed a significantly decreased of LPO in treated groups (CL+B and B+CL) compared to the colitis group ($p < 0.001$) (Figure 2 B).

3.3. Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione(GSH)

The SOD activity decreased significantly in the treated groups (CL+B and B+CL) compared to the colitis group ($p < 0.001$) (Figure A). The GPx (Figure B) and GSH activity (Figure C) increased ($p < 0.05$) in treated groups (CL+B and B+CL) compared to colitis group.

4. Discussion

The etiology of the ulcerative colitis has not yet been well determined. For this reason, several experimental models of colitis are in use, using a model with features of toxic and acute presentation. The acetic acid causes an injury in the intestines of animals, developing an inflammation that is considered one of the most prominent features found in colitis [27]. The extract of *B. serrata* has active ingredients that contain antioxidants with anti-inflammatory action and are distinguished by preventing the synthesis of proinflammatory cytokines such as leukotrienes. They inhibit the enzyme 5-lipoxygenase [15, 18, 28]. The study by Anthoni et al. [29] indicated that boswellic acid 3-acetyl-11-keto-beta-bosvéllico (AKBA) significantly attenuated leukocyte recruitment, thus protecting the intestinal mucosa against tissue injury caused by indomethacin, which was used to induced the experimental of colitis.

Histological evaluation of tissue from the intestines confirmed the development of the inflammation in the colitis group. We observed a destruction of mucosal crypts, significant edema in the submucosa with inflammatory infiltrate, similar results were found by Fillmann et al. [30]. The animals treated with *B. serrata* showed a partial preservation of the crypts and less mucosal edema. In animals previously treated with *B. serrata* we also observed an attenuation of this phenomenon. These findings are consistent with other studies using antioxidants such as glutamine, superoxide dismutase, *Abarema cochliacarpus*, *Boswellia serrata* and *Scutellaria baicalensis* [31-34]. The organism reaction to aggressive agents used in experimental models of colitis such as acetic acid (AA), 2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), indomethacin and dextran sodium sulfate (DSS) [27, 35] promote vasodilation and leukocyte chemotaxis, as well as an increase in blood flow, which generates a high production of oxygen, hence the excessive production of reactive oxygen species

(ROS) and nitrogen [36]. However, the colitis is an imbalance between oxidant and antioxidant substances characterizing oxidative stress [37]. The ROS induce redox process of LPO, which is a chain reaction that acts primarily on the lipid membrane that spread in phases of initiation, propagation and termination [8]. In this study we measured the LPO, and found a significant decrease in the treated groups when compared with the colitis group. Therefore, we suggest that the plant extract *B. serrata* was effective in reducing the production of reactive oxygen species, possibly due to its antioxidant activity.

There are some studies using treatments with antioxidants with the reduction of LPO, as in the study of Kretzmann et al. [30], where we observed a decrease of LPO in the group treated with glutamine compared to the colitis group, and the study by Lee et al. [38] who used the compound Berberine extract has antioxidant properties with anti-inflammatory action. The results of treatment with Berberine showed an inhibition of lipid peroxidation in animals of this group, suggesting the antioxidant effect of the plant *Mahonia aquifolium* containing compound studied.

The internal anal sphincter is a smooth muscle that relax under the inhibitory control of nitric oxide (NO). The release of iNOS in ulcerative colitis and the consequent increase of NO in response to a stimulation of neurons and non-adrenergic non-cholinergic (NANC) show a relaxation of the sphincter muscles [39], causing a decrease in anal sphincter pressure levels. The colitis group showed a significant decrease in anal pressure when compared the other groups. However, the groups CL+B and B+CL showed a significant increase in anal sphincter pressure when compared to the colitis group. This suggests that animals with colitis had an anal sphincter muscle relaxation; similar results were found in the study of Fillmann et al. [40,41] with experimental models of colitis and diabetes in rats [42].

The antioxidant system is a compensatory mechanism for the oxidation process consisting of enzymatic and non-enzymatic substances working against oxidative damage. The enzyme system, such as SOD and GPx, prevents the accumulation of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), and is therefore considered the primary line of defense. These enzymes are not found in the cytosol but in mitochondria, where most free radicals are produced. However, the increase in SOD may result in increased formation of H_2O_2 , which may cause an accumulation of H_2O_2 in the tissues, inducing oxidative stress [43].

In our study, we observed a significant increase in SOD activity in the colitis group, probably to compensate the damage caused by the action of acetic acid in the animals intestine. The enzyme SOD has an essential role in cellular redox balance, promoting dismutate in an attempt to free radicals, protecting tissues against oxidative damage [44]. In contrast, animals with colitis who were treated with *B. serrata* kept the values of SOD enzyme activity close to the control group. In the study by John et al. [45] the oxidative damage in erythrocytes of animals caused by dimethoate also showed an increase in SOD activity in the group exposed to the insecticide and as in our study.

The glutathione peroxidase (GPx) has a great physiological importance because it catalyzes the decomposition of inorganic peroxide and organic peroxides, using GSH as co-substrate. In our study we observed a significant increase in groups CL+B and B+CL group compared to CL. Studies suggest that GPx is responsible for the detoxification of (H₂O₂), when it is present at low concentration [46]. The reduction of GPx activity in the intestine of animals with colitis is blocked after administration of antioxidant [47]. This was also verified in this study. Glutathione (GSH) is a key component protecting against damaging of free radicals in the physiological system [48]. In our results the GSH showed a significant increase in treated groups CL+B and B+CL. A similar result was demonstrated in the study by Tahan et al. [49], which was administered doses of melatonin in the colitis group and also observed an increase in the GSH.

In conclusion, the study results suggest that *B. serrata* acts by inhibiting lipid peroxidation and its antioxidant effect is significant in the restoration of the enzymes. However, it also showed a significant improvement in the colon inflammation of animals with colitis induced by acetic acid. Thus, the results justify its use for the treatment of gastrointestinal diseases, but more detailed studies should be conducted in order to evaluate the protective effect in humans.

Acknowledgements

Supported by grants from the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/proj nº 110215) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), and Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental (HCPA/UFRGS) of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

References

- [1] Cotran R, Kumar V, Robbins S. Pathologic Basis of Disease. 6^a ed. Pennsylvania (Philadelphia): W. B. Saunders, 1999; pp. 1524.
- [2] Hibi T, Ogata H. Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2006;41,10–16.
- [3] Kelly CD. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *J Med Microbiol.* 2010;300, 25-33.
- [4] Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:311–322.
- [5] Grisham MB. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet.* 1994; 344,859-861.
- [6] Tüzün A, Erdil A, Inal V, Aydin A, Bağcı, S, Yeşilova Z. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Biochem.* 2002;35:569-572.
- [7] Pravda J. Radical induction theory of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2005;11:2371–2384.
- [8] Halliwell B, Gutteridge, JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th ed. *Oxford University Press*, 2007; pp. 851.
- [9] Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994;74:139-162.
- [10] Langmead L, Dawson C, Hawkins C, Banna N, Loo S, Rampton DS. Antioxidant effects of herbal therapies used by patients with inflammatory bowel disease: an in vitro study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16:197-205.
- [11] Rahimi R, Shams-Ardekani MR, Abdollahi M. A review of the efficacy of traditional Iranian medicine for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2010;16:4504-4514.
- [12] Sharma S, Thawani V, Hingorani L, Shrivastava M, Bhate VR, Khiyani R. Pharmacokinetic study of 11-keto- β -Boswellic acid. *Phytomedicine.* 2004;11:1255–1260.
- [13] Kimmatkar N, Thawani V, Hingorani L, Khiyani R. Efficacy and tolerability of *Boswellia serrata* extract in treatment of osteoarthritis of knee-a randomized double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine.* 2003;10:3-7.
- [14] Huang MT, Badmaev V, Ding Y, Liu Y, Xie JG, Ho CT. Anti-tumor and anti-carcinogenic activities of triterpenoid, beta-boswellic acid. *Biofactors.* 2001;3:225-230.

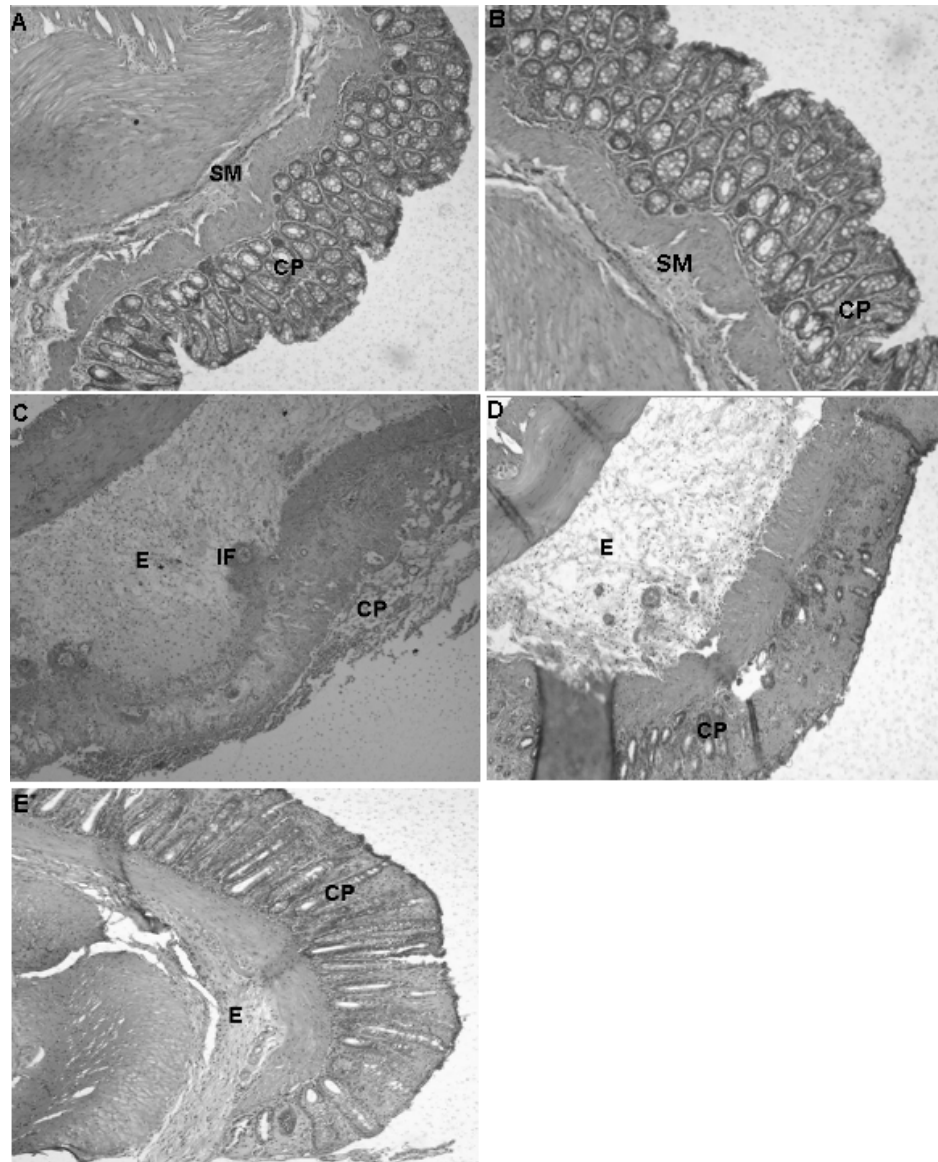
- [15] Krüger P, Daneshfar R, Eckert GP, et al. Metabolism of Boswellic Acids in Vitro and in Vivo. *Drug Metab Dispos.* 2008;36:1135–1142.
- [16] Yamada Y, Marshall S, Specian RD, Grisham MB. A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterol.* 1992;102:1524-1534.
- [17] Tannahill CL, Stevenot SA, Campbell-Thompson M, Nick HS, Valentine JF. Induction and immunolocalization of manganese superoxide dismutase in acute acetic acid-induced colitis in the rat. *Gastroenterol.* 1995;109:800-811.
- [18] Krieglstein CF, Anthoni C, Rijcken EJ, et al. Acetyl-11-keto- β -boswellic acid, a constituent of a herbal medicine from *Boswellia serrata* resin, attenuates experimental ileitis. *Int J Colorectal Dis.* 2001;16:88–95.
- [19] E.E.C., 1986. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Communities* L358, 1.29.
- [20] Read NW, Sun WM. Anorectal manometry. In: Henry MM, Swash M, eds. *Coloproctology and the Pelvic Floor*. 2nd ed. London: Butterworth-Heinemann Ltd; 1992;119-145.
- [21] Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori.* 1985;Jun 71:241-9.
- [22] Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *World J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
- [23] Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-309.
- [24] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *World J Biol. Chem.* 1972;May 247:3170-3175.
- [25] Flohé L, Beckmann R, Giertz H, Loschen G. Oxygen-centered free radicals as mediators of inflammation. In: *Oxidative stress*. London: Academic Press, 1985; pp. 403-436.
- [26] Beutler E, Duran O, Kelly BM. Improved method for determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963;61:802-88.
- [27] Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2004;50:81-92.

- [28] Sailer ER, Subramanian LR, Rall B, Hoernlein RF, Ammon HP, Safayhi, H. Acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA): structure requirements for binding and 5-lipoxygenase inhibitory activity. *Br J Pharmacol*. 1996;117:615–618.
- [29] Anthoni C, Laukoetter MG, Rijcken E, et al. Mechanisms underlying the anti-inflammatory actions of boswellic acid derivatives in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290:G1131–G1137.
- [30] Fillmann H, Kretzmann NA, San-Miguel B, et al. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicol*. 2007;236:217-226.
- [31] Kretzmann NA, Fillmann H, Mauriz JL, et al. Effects of glutamine on proinflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa B and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:1504-13.
- [32] Ishihara T, Tanaka K, Tasaka Y, et al. Therapeutic Effect of Lecithinized Superoxide Dismutase against Colitis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328:152-64.
- [33] Latella G, Sferra R, Vetuschi A, et al. Prevention of colonic fibrosis by Boswellia and Scutellaria extracts in rats with colitis induced by 2,4,5-trinitrobenzene sulphonic acid. *Eur J of Clin Invest*. 2008;38:410-420.
- [34] Silva MS, Sánchez-Fidalgo S, Talero E, et al. Anti-inflammatory intestinal activity of *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes in TNBS colitis model. *J Ethnopharmacol*. 2010;128:467–475.
- [35] Varshosaz J, Emami J, Fassihi A, et al. Effectiveness of budesonide-succinate-dextran conjugate as a novel prodrug of budesonide against acetic acid-induced colitis in rats. *Int J Colorectal Dis*. 2010;25:1159–1165.
- [36] Closa D, Folch-Puy E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life* 2004;56:185-191.
- [37] Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82:47-95.
- [38] Lee IA, Hyun YJ, Kim DH. Berberine ameliorates TNBS-induced colitis by inhibiting lipid peroxidation, enterobacterial growth and NF- κ B activation. *Eur J Pharmacol*. 2010;648:162–170.
- [39] Martinez AR, Marin J. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther* 1997;75:111-134.
- [40] Fillmann HS, Kretzmann N, Llesuy S, Fillmann LS, Marroni NP. O Papel do Óxido Nítrico na Pressão Anal Esfincteriana de Ratos Submetidos à Colite Experimental. *Rev Bras Coloproctol*. 2006;26:437-442.

- [41] Fillmann HS, Llesuy S, Marroni CA, Fillmann LS, Marroni NP. Diabetes Mellitus and Anal Sphincter Pressures: An Experimental Model in Rats. *Dis Colon Rectum*. 2007;50:517-522.
- [42] Tieppo J, Kretzmann NAF, Seleme M, Fillmann HS, Berghmans B, Marroni NP. Anal pressure in experimental diabetes. *Dis Colon Rectum*. 2009;24:1395-1399.
- [43] Sathyaikumar KV, Swapna I, Reddy PV, et al. Fulminant Hepatic Failure in Rats Induces Oxidative Stress Differentially in Cerebral Cortex, Cerebellum and Pons Medulla. *Neurochem Res*. 2007;32:517-524.
- [44] Oktyabrsky ON, Smirnova GV. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Mosc)* 2007;72:132-145.
- [45] John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nutr Biochem*. 2001;12:500-504.
- [46] Spolarics Z, Wu JX. Role of glutathione and catalase in H₂O₂ detoxification in LPS-activated hepatic endothelial and Kupffer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1997;273:G1304.
- [47] Sengül N, Isik S, Aslim B, Uçar G, Demirbag AE. The Effect of Exopolysaccharide-Producing Probiotic Strains on Gut Oxidative Damage in Experimental Colitis. *Dig Dis Sci* 2011;56:707-714.
- [48] Shan X, Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Aliment Pharmacol Ther*. 1990;47:61-71.
- [49] Tahan G, Gramignoli R, Marongiu F, Aktolga S, Cetinkaya A, Tahan V. Melatonin Expresses Powerful Anti-inflammatory and Antioxidant Activities Resulting in Complete Improvement of Acetic-Acid-Induced Colitis in Rats. *Dig Dis Sci*. 2011;56:715-720.

FIGURES

Figure 1



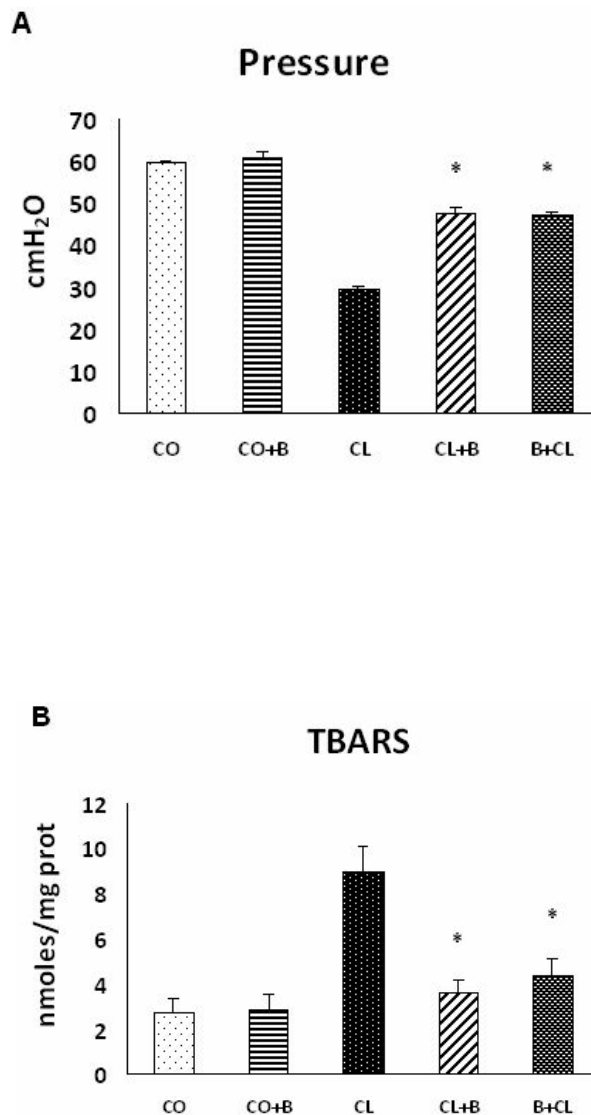
Effect of administration of *Boswellia serrata* on colon injury in colitis model in rats induced by acetic acid.

(A) control group (CO), (B) control *Boswellia* group (CO+B), (C) colitis group (CL), (D) prophylactic treatment with *Boswellia serrata* (B+CL) and (E) colitis group treated with *Boswellia serrata* (CL+B).

CO: control group; CO+B: control group + *Boswellia serrata*, CL: colitis group; CL+B: colitis + *Boswellia serrata*; B+CL: *Boswellia serrata* + colitis.

Legend: crypts (CP), submucosa (SM), edema (E), inflammatory infiltrate (IF).

Figure 2

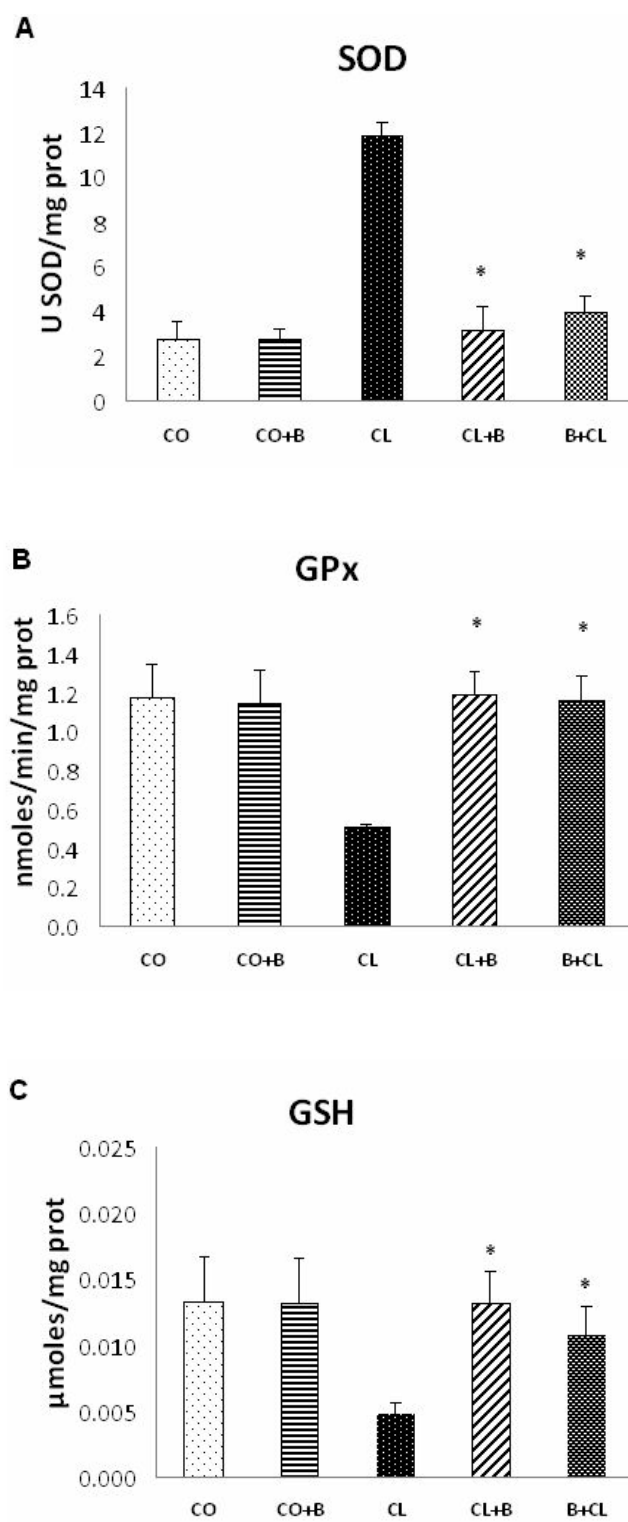


Effect of administration of *Boswellia serrata* on anal sphincter pressure and lipoperoxidation in colitis model in rats induced by acetic acid. Data are expressed as the means \pm S.E.M.

(A) Pressure (cmH₂O). **(B)** Lipoperoxidation (TBARS nmoles/mg prot).

Asterisk - Significant difference between groups CL+B and B+CL and the CL group ($p < 0.001$). CO: control group; CO+B: control group + *Boswellia serrata*, CL: colitis group; CL+B: colitis + *Boswellia serrata*; B+CL: *Boswellia serrata* + colitis.

Figure 3



Effect of administration of *Boswellia serrata* on the activity antioxidants enzyme SOD **(A)** (U sod/mg prot), GPx **(B)** (nmoles/min/mg prot) and GSH **(C)** (μ moles/mg prot) in colitis model in rats induced by acid acetic. Data are expressed as the means \pm S.E.M. Asterisk - Significant difference between groups CL+B and B+CL and the CL group. SOD ($p < 0.001$), GPx and GSH ($p < 0.05$).

CO: control group; CO+B: control group + *Boswellia serrata*, CL: colitis group; CL+B: colitis + *Boswellia serrata*; B+CL: *Boswellia serrata* + colitis.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo experimental de colite ulcerativa pela indução de ácido acético é reconhecido como modelo capaz de reproduzir as alterações fisiopatológicas da colite em humanos. O estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da colite e a busca por terapias eficazes são essências.

A partir dos dados obtidos em nosso estudo, concluiu-se que a administração do extrato de *Boswellia serrata* no modelo de colite experimental induzida por ácido acético demonstrou:

- Aumento na pressão anal esfinteriana nos animais dos grupos tratados com extrato de *Boswellia serrata*;
- Na histologia do intestino grosso dos animais tratados observou-se uma diminuição de edema e uma restauração e preservação das criptas;
- Diminuiu a expressão de iNOS no intestino grosso dos animais tratados;
- Diminuiu a lipoperoxidação (TBARS), processo de dano oxidativo, no intestino grosso dos animais tratados em comparação aos animais do grupo colite.
- Manteve os níveis da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) nos grupos tratados similares ao do grupo controle;
- Aumentou a atividade da enzima GPx e da GSH nos grupos tratados, demonstrando uma restauração da atividade antioxidante;
- Diminuiu os metabólitos do NO nos animais dos grupos tratados.

A partir desses resultados, sugerimos que *B. serrata* atua inibindo a lipoperoxidação e o seu efeito antioxidante é significativo na restauração das enzimas. Além disso, mostrou uma melhora significativa na inflamação do intestino grosso de animais com colite induzida por ácido acético. Assim, os resultados podem justificar a sua utilização para o tratamento de doenças gastrointestinais. Entretanto, outros estudos devem ser realizados, a fim de acrescentar mais conhecimentos sobre a planta *Boswellia serrata* e seu extrato.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O aumento constante da Doença Inflamatória Intestinal no nosso meio associado ao grande número de dúvidas que cercam a sua etiopatogenia tem levado a um número cada vez maior de linhas de pesquisa nesta área.

O uso de substâncias antioxidantes com comprovada ação anti-inflamatória vem sendo testada com relativo sucesso no arsenal terapêutico desta doença. Este trabalho demonstrou claramente o benefício de uma substância antioxidante agindo sobre determinadas rotas pró-inflamatórias.

A partir de agora partiremos para determinar outras rotas de estresse oxidativo e inflamação envolvidas, assim como testar a eficiência de determinadas substância em diminuir esta ação pró-oxidante e pró-inflamatória.

A identificação da linhagem do linfócito Th (T helper) envolvido na inflamação a partir da determinação das citocinas envolvidas no processo inflamatório é muito importante no estudo da DII e dos diagnósticos diferenciais desta doença. Para tanto, utilizaremos o mesmo modelo já amplamente testado e partiremos para a avaliação de um número maior de interleucinas, assim como do TNF-alfa e de fatores de transcrição nuclear envolvidos nesta rota inflamatória.

ANEXOS

ANEXO A – Análises para posteriores publicações

ANEXO A1 - Efeito da administração de *Boswellia serrata* nos níveis de metabólitos do óxido nítrico.

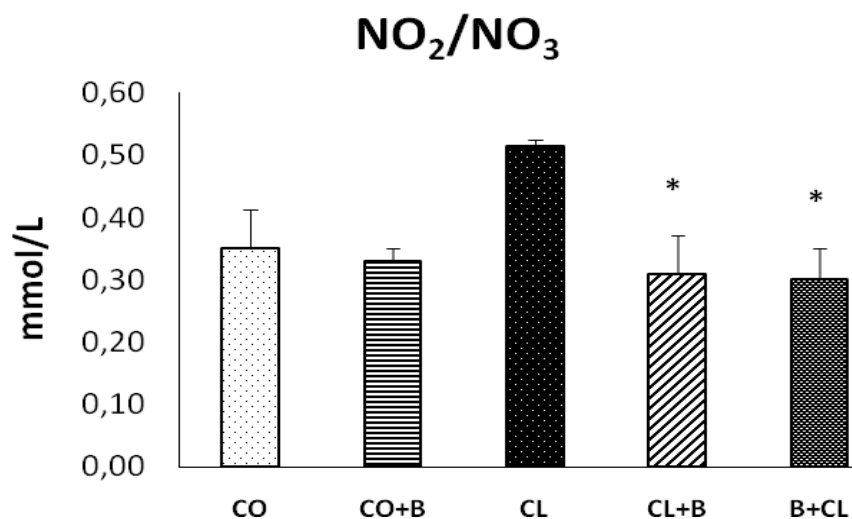


Figura 1: Os resultados dos níveis de NO nos grupos tratados (CL+B e B+CL) mostraram uma diminuição significativa em comparação com o grupo colite ($P < 0,01$). O tratamento de *B. serrata* poderia reverter a produção de NO em modelo de colite induzida por ácido acético. Portanto, o extrato de *B. serrata* possivelmente exerce um efeito protetor sobre a colite induzida por ácido acético.

ANEXO A2 - Efeito da administração de *Boswellia serrata* na expressão da óxido nítrico sintase induzível.

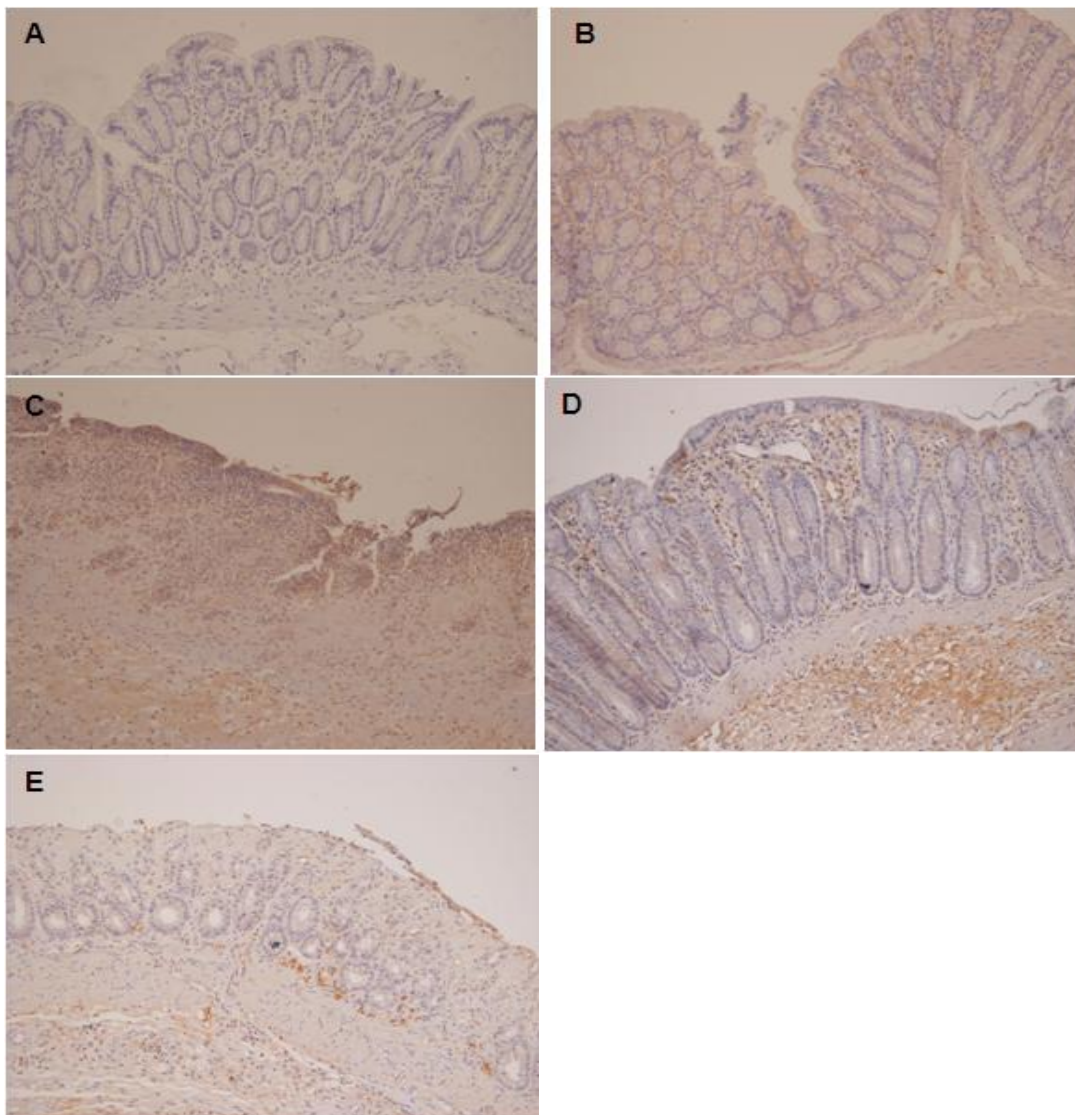


Figura 2: Imunohistoquímica da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no intestino grosso de animais com colite induzida por ácido acético e tratados com o extrato da planta *Boswellia serrata*. **Figura A** - Grupo controle sem marcação para iNOS. **Figura B**: Grupo controle + *Boswellia* não foi detectada marcação. **Figura C**: Grupo colite intensa marcação (coloração marrom) para iNOS. **Figura D**: Grupo colite + *Boswellia* demonstrou leve marcação. **Figura E**: Grupo *Boswellia* + colite apresentou leve marcação.

ANEXO B - Produção científica durante a vigência do mestrado

PARTICIPAÇÃO EM PROJETOS DE PESQUISA:

2012-2016: O efeito da glutamina no intestino e fígado de animais submetidos à isquemia e reperfusão intestinal.

Situação: Em andamento.

2011-2012: *Boswellia serrata* e sua ação anti-inflamatória e antioxidante.

Situação: Em andamento.

2010–2012: Papel do estrogênio na hipertensão portal e sua relação com o estresse oxidativo.

Situação: Em andamento.

2009-2012: Avaliação da ação antioxidante da quercetina sobre o fígado de animais com esteatohepatite não-alcóolica experimental.

Situação: Encerrado.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos:

HARTMANN, R.M., MORGAN-MARTINS, M.I, TIEPPO, J., FILLMANN, H.S., MARRONI, N.P. 1. Effect of *Boswellia serrata* on Antioxidant Status in an Experimental Model of Colitis Ratis Induced by Acetic Acid. *Digestive Diseases and Sciences*. Fator de Impacto (2011 JCR): 2,1170, v.57, p.2038-2044, 2012.

MORGAN-MARTINS, M.I., JACQUES, S.I., HARTMANN, R.M., MARQUES, C.M., MARRONI, N.P. 2. Protection of estrogen in portal hypertension gastropathy – an experimental model. *Arquivos de Gastroenterologia (Impresso)*, v.48, p.211-216, 2011.

JACQUES, S.I., SCHEMITT, E., LICKS, F., HARTMANN, R.M., MARQUES, C.M., MARRONI, N.P. O envolvimento do estrogênio no estresse oxidativo induzido pela ligadura parcial da veia porta em ratas wistar. *Revista de Iniciação da ULBRA*, v.10, p.77-89, 2011.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM CONGRESSOS:

1. **HARTMANN, R.M.**, LICKS, F., SCHEMITT, E., MORGAN-MARTINS, M. I., COLARES, J. R., MEURER, L., FILLMANN, H. S., MARRONI, N. P. A ação do extrato de *Boswellia serrata* em modelo experimental de colite In: 32ª Semana Científica do HCPA, 2012. Local: Porto Alegre.

2. LICKS, F., MARQUES, C. M., **HARTMANN, R.M.**, MORGAN-MARTINS, M. I., MARRONI, C. A., MARRONI, N. P. N-acetylcysteine protects stomach against oxidative stress in experimental model of portal hypertension In: 32ª Semana Científica do HCPA, 2012. Local: Porto Alegre.

3. MORGAN-MARTINS, M. I., SCHEMITT, E., **HARTMANN, R.M.**, COLARES, J. R., MARRONI, N. P. Participação do estrogênio na prevenção do estresse oxidativo no modelo de ligadura parcial da veia porta em ratas wistar In: 32ª Semana Científica do HCPA. Local: Porto Alegre..
4. MORGAN-MARTINS, M. I., SCHEMITT, E., COLARES, J. R., **HARTMANN, R.M.**, FILLMANN, H. S., MARRONI, N. P. A lecitina e seu uso no modelo experimental de colite ulcerativa - um efeito antioxidante In: 32ª Semana Científica do HCPA, 2012. Local: Porto Alegre.
5. SCHEMITT, E., COLARES, J. R., **HARTMANN, R.M.**, MORGAN-MARTINS, M. I., MARRONI, C. A., MARRONI, N. P. O efeito protetor da quercetina no estresse oxidativo hepático induzido pela tioacetamida (taa) In: 32ª Semana Científica do HCPA, 2012. Local: Porto Alegre.
6. FILLMANN, H. S., **HARTMANN, R.M.**, MORGAN-MARTINS, M. I., MARRONI, N. P. Anti-inflammatory and antioxidant effect of *Boswellia serrata* in experimental model of colitis In: IX Cell Stress Society International Workshop on the Molecular Biology of Stress Responses, 2012. Local: Porto Alegre.
7. LICKS, F., MARQUES, C. M., **HARTMANN, R.M.**, ZETTLER, C., MORGAN MARTINS, M. I., MARRONI, C. A., MARRONI, N. P. N-Acetylcysteine protects stomach against model of oxidative stress in experimental portal hypertesion In: IX Cell Stress Society International Workshop on the Molecular Biology of Stress Responses, 2012. Local: Porto Alegre.
8. MORGAN-MARTINS, M. I., SCHEMITT, E., **HARTMANN, R.M.**, COLARES, J. R., MARRONI, N. P. Participation of estrogen in the prevention of oxidative stress in the model of partial vein ligation in wistar rats In: IX Cell Stress Society International Workshop on the Molecular Biology of Stress Responses, 2012. Local: Porto Alegre.
9. COLARES, J. R., SCHEMITT, E., **HARTMANN, R.M.**, MORGAN-MARTINS, M. I., MARRONI, N. P. A ação antioxidante do estrogênio no modelo de gastropatia da hipertensão portal induzido pela ligadura parcial de veia porta (LPVP) In: XVII Salão de Iniciação Científica e Tecnológica - ULBRA, 2011. Local: Canoas / RS.
10. SCHEMITT, E., **HARTMANN, R.M.**, FILLMANN, H. S., MORGAN-MARTINS, M. I., MARRONI, N. P. A ação do extrato de *Boswellia serrata* em modelo experimental de colite In: IV SEMANA CIENTÍFICA DA UFCSPA E I SEMANA DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO, 2011. Local: Porto Alegre.
11. SCHEMITT, E., **HARTMANN, R.M.**, LICKS, F., MORGAN-MARTINS, M. I., FILLMANN, H. S., MARRONI, N. P. Ação antioxidante da *Boswellia serrata* na colite experimental induzida por ácido acético In: XVII Salão de Iniciação Científica e Tecnológica - ULBRA, 2011. Local: Canoas / RS.
12. SCHEMITT, E., **HARTMANN, R.M.**, FILLMANN, H. S., MORGAN-MARTINS, M. I., MARRONI, N. P. Ação antioxidante da *Boswellia serrata* na colite experimental induzida por ácido acético In: III Mostra de Pesquisa e Extensão, 2011. Local: Gravataí / RS.
13. **HARTMANN, R.M.**, LICKS, F., SCHEMITT, E., MORGAN-MARTINS, M. I., FILLMANN, H. S., MARRONI, N. P. Anti-inflammatory and antioxidant effect of *Boswellia serrata* in experimental model of colitis In: Programa XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental - FeSBE, 2011. Local: Rio de Janeiro / RJ.
14. COLARES, J. R., MORGAN-MARTINS, M. I., **HARTMANN, R.M.**, SCHEMITT, E., MARRONI, N. P. As alterações da gastropatia da hipertensão portal induzida pela ligadura parcial da veia porta em ratas wistar - avaliação do estresse oxidativo In: XII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA PUCRS, 2011, Local: Porto Alegre / RS.

15. MORGAN-MARTINS, M. I., **HARTMANN, R.M.**, SCHEMITT, E., MARRONI, N. P. Avaliação do Estresse Oxidativo nas Alterações da Gastropatia da Hipertensão Portal Induzido pela Ligadura Parcial da Veia Porta em Ratas Wistar In: XXI Congresso Brasileiro de Hepatologia, 2011. Local: Salvador / BA.
16. FILLMANN, H. S., **HARTMANN, R.M.**, MORGAN-MARTINS, M. I., TIEPPO, J., MARRONI, N. P. O efeito anti-inflamatório e antioxidante da *Boswellia serrata* em modelo experimental de colite In: 60º Congresso Brasileiro de Coloproctologia, 2011, Local: Fortaleza / CE.
17. SCHEMITT, E., MORGAN-MARTINS, M. I., FILLMANN, H. S., LICKS, F., **HARTMANN, R.M.**, MARRONI, N. P. O efeito antioxidante da *Boswellia serrata* na colite experimental In: XII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA PUCRS, 2011. Local: Porto Alegre / RS.
18. COLARES, J. R., SCHEMITT, E., **HARTMANN, R.M.**, MORGAN-MARTINS, M. I., MARRONI, N. P. O Efeito do Estrogênio na Hipertensão Portal Induzida pela Ligadura Parcial de Veia Portal em Ratas Wistar – Avaliação do Estresse Oxidativo In: III Mostra de Pesquisa e Extensão, 2011. Local: Gravataí / RS.
19. **HARTMANN, R.M.**, SCHEMITT, E., MORGAN-MARTINS, M. I., FILLMANN, H. S., WILLAND, E., MARRONI, N. P. O efeito do extrato de *Boswellia serrata* em modelo experimental de colite induzida por ácido acético In: 31ª SEMANA CIENTÍFICA DO HCPA, 2011. Local: Porto Alegre.
20. MORGAN-MARTINS, M. I., SCHEMITT, E., **HARTMANN, R.M.**, MARRONI, N. P. Proteção do Estrogênio na Gastropatia da Hipertensão Portal - Modelo Experimental In: 31ª SEMANA CIENTÍFICA DO HCPA, 2011. Local: Porto Alegre.
21. MORGAN-MARTINS, M. I., **HARTMANN, R.M.**, SCHEMITT, E., MARRONI, N. P. Protection of portal hypertensive gastropathy by estrogen in model partial portal vein ligation (PPVL) In: Programa XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental – FeSBE, 2011. Local: Rio de Janeiro / RJ.

PRÊMIOS:

Destaque Salão de Iniciação Científica PUCRS. Trabalho Intitulado: O efeito antioxidante da *Boswellia serrata* na colite experimental.

PARTICIPAÇÃO EM CURSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA:

1. MARRONI, N. P, HARTMANN, R.M
Curso de Iniciação Científica (10 a 14 de janeiro), 2011. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)
2. MARRONI, N. P., HARTMANN, R.M
Curso de Iniciação Científica (18 a 22 de janeiro), 2010. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS:

1. Curso de Iniciação Científica. 2011.
2. Curso de Iniciação Científica. 2010.