

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DO COMPOSTO *P*-CLORO-
FENIL-SELENOESTEROL EM UM MODELO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA
INTESTINAL EM CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Micheli Stéfani Zarzecki

Uruguaiana, RS, Brasil

2016

MICHELI STÉFANI ZARZECKI

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DO COMPOSTO P-CLORO-
FENIL-SELENOESTEROL EM UM MODELO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA
INTESTINAL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Orientadora: Prof. Dr^a Marina Prigol

Coorientador: Prof^o Dr. Cristiano Ricardo Jesse

Uruguaiana, RS, Brasil

2016

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

Z38a Zarzecki, Micheli Stéfani
Atividade anti-inflamatória e antioxidante do composto p-
cloro-fenil-selenoesterol em um modelo de doença inflamatória
intestinal em camundongos / Micheli Stéfani Zarzecki.
76 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2016.
"Orientação: Marina Prigol".

1. Anti-inflamatório. 2. Antioxidante. 3. p-cloro-fenil-
selenoesterol. 4. Doenças inflamatórias intestinais. I.
Título.

MICHELI STÉFANI ZARZECKI

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATORIA E ANTIOXIDANTE DO COMPOSTO *P*-CLORO-
FENIL-SELENOESTEROL EM UM MODELO DE DOENÇA INFLAMATORIA
INTESTINAL EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação *Strictu Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica**.

Orientadora: **Prof.^a Dr.^a Marina Prigol**

Coorientador: **Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse**

Área de concentração: Bioquímica
Farmacêutica e Toxicológica

Dissertação defendida e aprovada em 19 de fevereiro de 2016.

Banca examinadora:



Prof.^a Dr.^a Marina Prigol

Orientadora (UNIPAMPA)



Prof. Dr. Elton Luis Gasparotto Denardin

(UNIPAMPA)



Dr. César Augusto Bruning

(UFSM)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus amados pais, Estefano por ser meu maior incentivador e Cinara, por ser fonte inesgotável de apoio, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elcir e Cinara pela educação, amor, e pelo apoio nas minhas decisões. Aos meus irmãos Dion e Aleksandra pelo apoio e carinho.

Ao meu companheiro e amigo, Glauber Fipke, pelo incentivo aos estudos.

Ao Prof. Dr. Mauro Shneider, por me inserir no ramo da pesquisa.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Marina Prigol, e meu Co-orientador, Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse, pela oportunidade de realizar este trabalho, e pelos conhecimentos adquiridos.

Aos membros da banca, Elton Denardin e César Bruning por aceitarem avaliar este trabalho.

À Silvane Roman, Cristiano Spiazzi e Franciele Cibin pela contribuição dada a este trabalho.

Às minhas companheiras de laboratório, Stífani Araujo, Mariane de Paula, Márcia Poetini, Vandrezza Bortolotto e Luana Meichtry, pelo companheirismo e amizade.

À todos os colegas de Pós-Graduação e professores pelo convívio e pelo aprendizado.

À Universidade Federal do Pampa pela oportunidade de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo apoio financeiro.

E por fim a todos os meus familiares que sempre torceram por mim e a todos àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho e para meu crescimento pessoal e acadêmico.

MUITO OBRIGADO!

EPIGRAFE

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito.

Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas, Graças a Deus, não somos o que éramos antes.”

Martin Luther King

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Universidade Federal do Pampa

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DO COMPOSTO *p*-CLORO-FENIL-SELENOESTEROL EM UM MODELO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL EM CAMUNDONGOS

Autora: Micheli Stéfani Zarzecki

Orientadora: Marina Prigol

Co-orientador: Cristiano Ricardo Jesse

Local e Data da defesa: Uruguaiana, 19 de fevereiro de 2016.

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma doença crônica, recidiva e de etiologia desconhecida. Fatores ambientais, estresse oxidativo e fatores imunológicos podem estar relacionados as causas dessa doença, e a colite ulcerativa e a doença de Crohn são exemplos dessa patologia. O mecanismo patogênico da DII é assumido como sendo um desequilíbrio da resposta imunológica a antígenos no ambiente intestinal. Os principais tratamentos das DII não são geralmente bem tolerados já que demonstram causar efeitos colaterais e, além disso, apresentam alta taxa de reincidências. A DII induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em modelos de roedores é caracterizada por aumento dos níveis de marcadores inflamatórios como TNF- α e interleucinas (IL-1 β , IL-12, IL-17, IL-18 e IL-6). Tendo em vista a busca por alternativas eficazes nos tratamentos destas DII, os compostos orgânicos de selênio vêm se destacando como substâncias com potencial terapêutico, devido às suas atividades farmacológicas, como anti-inflamatória e antinociceptiva. Aliado a isso, o estudo de compostos de selênio combinados à oxiesteróis tem evidenciado resultados promissores. Demonstrou-se recentemente que o composto *p*-cloro-fenil-selenoesterol possui efeito antioxidante e anti-inflamatório em um modelo de dor e inflamação em camundongos. O objetivo desse trabalho foi investigar o efeito anti-inflamatório do composto *p*-cloro-fenil-

selenoesterol (PCS), no modelo de DII induzida pelo TNBS em camundongos Swiss fêmeas. Os camundongos receberam o composto PCS (10mg/kg; p.o.) durante todo o experimento (9 dias) por via oral. No quinto dia induziu-se a colite utilizando 2 mg de TNBS dissolvido em 0,1mL de uma solução de etanol a 50%, o qual foi administrado pela via intrarretal. No décimo dia, os camundongos foram eutanasiados e as amostras de sangue e cólon foram coletadas para as respectivas dosagens dos marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo, análise histopatológica e sinais clínicos da doença. Os resultados obtidos demonstram que os animais tratados com TNBS apresentaram redução do comprimento colônico e aumento nos níveis da citocina pró inflamatória interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α), e aumento dos níveis da enzima mieloperoxidase (MPO), tratamento com PCS foi capaz de reduzir os níveis das citocinas pró inflamatórias IL-6 e do TNF- α aos níveis do controle, além de evitar a redução do comprimento colônico que é um dos sinais da colite experimental induzida por TNBS. Nesse estudo também se observou uma melhora nos danos histológicos nos animais tratados com PCS em comparação com o grupo induzido por TNBS. Além disso, o tratamento com o PCS foi capaz de diminuir o estresse oxidativo e prevenir a diminuição das defesas antioxidantes no cólon de animais com DII induzida por TNBS. Portanto, nossos resultados sugerem que o tratamento com PCS apresentou uma melhora no quadro clínico da DII experimental em camundongos e que pode, futuramente e após mais estudos sobre este composto, tornar-se um potencial agente terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias, bem como as intestinais, colite ulcerativa e doença de Crohn.

Palavras-chave: Doença Inflamatória Intestinal; Inflamação; estresse oxidativo; Selênio.

ABSTRACT

Dissertation of Master
Program of Post-Graduation in Biochemistry
Federal University of Pampa

ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE COMPOUND P-CHLORO-PHENYL-SELENOESTEROL IN A MODEL DISEASE INFLAMMATORY BOWEL DISEASE IN MICE

Authoress: Micheli Stéfani Zarzecki

Advisor: Marina Prigol

Co-advisor: Cristiano Ricardo Jesse

Site and Date of Defence: Uruguaiiana, February 19th, 2016.

The Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a chronic, recurrent disease and of unknown etiology. Factors that may relate the causes of this disease are environmental factors, oxidative stress and immune factors. Example of this disease is the Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. The main treatments of IBD are not generally well tolerated, they have side effects and have a high rate of relapse. The pathogenesis of IBD is assumed to be an imbalance of the immune response to antigens in the intestinal environment. IBD induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) in rodent models is characterized by increased levels of inflammatory markers such as TNF- α and interleukins (IL-1 β , IL-12, IL-17, IL-18 and IL-6). The organic selenium compounds have been highlighted as substances with therapeutic potential because of their pharmacological activities such as anti-inflammatory and antinociceptive. Allied to this, the study combined with the selenium compounds oxioesteróis has shown promising results, it was demonstrated recently that PCS compound has antioxidant and anti-inflammatory effect in a model of pain and inflammation in mice. The aim of this study was to investigate the anti-inflammatory effect of p-chloro-phenyl-selenoesterol compound in IBD model induced by TNBS in Swiss female mice. The mice received the p-chlorophenyl-selenoesterol compound (PCS) (10mg / kg; po) throughout the experiment (9 days) orally. On the fifth day colitis was induced using 2 mg of TNBS dissolved in 0.1 mL of a 50% ethanol

solution, which was administered via intrarectal. On the tenth day, mice were euthanized and samples of blood and colon were collected for the respective levels of inflammatory markers of oxidative stress, histopathological and clinical signs of disease. The results show that animals treated with TNBS showed a reduction in colonic length, and increased levels of interleukin pro-inflammatory cytokine-6 (IL-6) and tumor necrosis factor (TNF- α) and increased levels of Myeloperoxidase enzyme (MPO), treatment with PCS was able to reduce the levels of pro inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α levels to control and avoids the reduction in colonic length which is one of signs of experimental colitis induced by TNBS. In this study there was also an improvement in the histological analysis the animals treated with PCS compared with the group induced by TNBS. Furthermore, combined with improvements in inflammatory and histological parameters, treatment with PCS was able to decrease oxidative stress and prevent the decrease of antioxidant defenses in the colon of animals with TNBS-induced IBD. This finding suggests that treatment with PCS showed an improvement of the clinical picture in IBD in experimental mice and which could be a potential therapeutic agent for the treatment of inflammatory diseases, and intestinal, Ulcerative Colitis and Crohn's Disease.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease; Inflammation; oxidative stress; Selenium.

LISTA DE ABREVIATURAS

CEI – Camada epitelial intestinal

CU – Colite Ulcerativa

DC – Doença de Crohn

DII – Doença Inflamatória Intestinal

IL-6 – Interleucina 6

MPO - Mieloperoxidase

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCS – *p*-cloro-fenil-selenoesterol

ROS – Espécies reativas do oxigênio

Se – Selênio

TBARS – Espécies reativas do ácido tiobarbiturico

TGI - Trato Gastrointestinal

TNBS - ácido trinitrobenzeno sulfônico

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sistema gastrointestinal em toda a sua extensão, da boca ao ânus.4
- Figura 2.** Modelo de patogenia da DII, aspectos de ambas DII, CU e DC.....8
- Figura 3.** Distribuição das lesões na DII. Distinção das DII conforme morfologia.....9
- Figura 4.** Mini-endoscopia de alta resolução, *in vivo*, do intestino de camundongos após indução da colite por diferentes tipos de drogas .**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5. (A)** In vivo, medição da atividade da MPO no cólon com processo inflamatório em camundongos pela detecção de luminescência; **(B)** grau de granulócitos por técnicas de imuno-histoquímica, do cólon saudável e do colón com processo inflamatório. 15
- Figura 6.** Histologia dos tecidos do cólon isolado do controle e do cólon com processo inflamatório. 16
- Figura 7.** Estrutura química do composto *p*-cloro-fenil-selenoesterol.....22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo das características das DII.....	10
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1. O trato gastrointestinal (TGI).....	4
2.2. Intestino Grosso (Cólon)	5
2.3. Resposta inflamatória.....	6
2.4. Doenças inflamatórias intestinais (DII)	7
2.5. Classificação das doenças inflamatórias intestinais.....	9
2.6. Incidência e Prevalência das doenças inflamatórias intestinais	10
2.7. A doença de Crohn (DC).....	11
2.8. A colite ulcerativa (CU).....	12
2.9. Resposta imunológica na doença inflamatória intestinal.....	12
2.10. Estresse oxidativo na doença inflamatória intestinal.....	13
2.11. Modelo de indução de DII	14
2.12. Tratamentos para Doença Inflamatória Intestinal	17
2.13. Selênio.....	18
2.13.1 Metabolismo do selênio.....	18
2.13.2 Função antioxidante do Selênio	19
2.13.3 Função do Selênio no sistema imune	19
2.13.4 Compostos derivados de selênio e suas funções	20
2.13.5 Selênio e Doença Inflamatória Intestinal	20
2.13.6 O potencial terapêutico do <i>p</i> -cloro-fenil-seleno-esterol (PCS).....	21
3. MANUSCRITO.....	24
4. INTRODUCTION	27
5. MATERIALS AND METHODS.....	28
2.1. Reagents.....	28
2.2. Animals	28
2.3. Experimental design.....	29

2.4.	TNBS-Induced Colitis and Colitis Evaluation.....	29
2.5.	Histopathological analysis	30
2.6.	Inflammatory Cytokines.....	30
2.7.	Myeloperoxidase Activity (MPO)	30
2.8.	Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and Reactive species (RS) levels	31
2.9.	Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT) activity.....	31
2.10.	Statistical Analysis	32
6.	RESULTS	32
2.13.1	Systemic treatment with PCS is able to ameliorate the clinical signs of TNBS-induced colitis.....	32
2.13.1	PCS improved histological of TNBS-induced colitis in mice	32
2.13.2	PCS reduced the production of inflammatory cytokines in the inflamed colon	33
2.13.3	PCS prevent the increased MPO activity in the TNBS-induced colitis in mice	33
2.13.4	PCS attenuated oxidative stress in TNBS-induced colitis in mice	33
2.13.5	PCS ameliorate antioxidant defenses in the model of TNBS-induced colitis in mice.	33
7.	DISCUSSION	34
8.	Conclusions	37
9.	PERSPECTIVAS	48
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
	ANEXO A- Protocolo de aprovação do projeto pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA)-UNIPAMPA).....	55
	55

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII), incluindo colite ulcerativa (CU) e doença de Crohn (DC), são doenças crônicas, desordem recidiva do intestino de etiologia desconhecida (Ochsenkühn & D'Haens, 2011) ou complexa e multifatorial, que envolve predisposição genética, causas ambientais, fatores microbianos e imunológicos (Podolsky, 2002). A DC é uma doença transmural da mucosa gastrointestinal, e tem o potencial para afetar todo o trato gastrointestinal; em contraste, a CU não é uma doença transmural, e afeta o cólon (Baumgart e Sandborn, 2007; Baumgart e Carding, 2007).

O mecanismo patogênico das DII é assumido como sendo um desequilíbrio da resposta imunitária a antígenos no ambiente intestinal (Atreya et al. 2000), produzindo citocinas pró-inflamatória, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e de outros mediadores, causando a ativação inflamatória do sistema imunológico da mucosa via distintas vias de sinalização (Cario & Podolsky, 2000). Portanto, o desequilíbrio entre as citocinas inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ), interleucinas (IL), IL-1b, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, modulado pelo fator nuclear kappa β (NF-k β) ou ativador de proteína-1 (AP-1) e citocinas anti-inflamatória, como IL-4, IL-10, IL-11, bem como a expressão de importantes parâmetros de determinação, sobretudo a ciclo oxigenase 2 (COX-2) e a síntese do óxido nítrico induzido (iNOS), a qual são expressas na primeira resposta dos mediadores pró-inflamatórias e estímulos mitogênicos e desempenham um papel importante na fisiopatologia desta doença (Talero et al., 2008; Pecchi et al., 2009).

A ativação de células inflamatórias provoca estresse oxidativo através do aumento das espécies reativas do oxigênio (ROS) levando ao começo do processo de lesão intestinal na DII (Fiocchi, 1998). O estresse oxidativo e a sinalização redox estão implicados no aumento das citocinas inflamatórias e o recrutamento de células inflamatórias através de várias vias de sinalização. O estresse oxidativo e sua consequente peroxidação lipídica poderiam exacerbar reações em cadeia dos radicais livres e ativar a liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como neutrófilos e em sequência o aumento da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) (Witaicenis et al., 2012). O aumento do estresse oxidativo no cólon, portanto,

está diretamente ligado à inicialização e perpetuação da lesão e da inflamação nas DII (Rezaie et al., 2007).

Como alternativa para se estudar as DII, em especial a DC, têm-se a indução de colite aguda (inflamação aguda) por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em modelos de roedores que é caracterizada por aumento dos níveis de TNF, IL-1 β , IL-12, IL-17, IL-18 e IL-6, orientada via resposta Th1. Durante a inflamação crônica, a resposta imune parece ser principalmente mediada vias Th1/Th17, e além da expressão de IL-17, IL-12, IL-10 e de macrófagos inflamatórios é observado a expressão da proteína-2 (Zhu et al., 2012).

O elemento selênio (Se) é um oligoelemento essencial que possui efeito antioxidante em diversas disfunções do organismo e, por isso, têm sido amplamente estudado no que diz a sua bioquímica, farmacologia e, especialmente, seu ponto de vista terapêutico (May, 2002; Ayaz et al., 2006). O Se é largamente conhecido por sua atividade biológica como parte integrante de várias enzimas peroxidases e sistemas de enzimáticos redox, que protegem as células contra o estresse oxidativo (Papp et al., 2007). Os compostos orgânicos de selênio se destacaram como interessante recurso de novas substâncias sintéticas com potencial terapêutico, devido às suas atividades farmacológicas, dentre elas, propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas (Nogueira e Rocha, 2011; Chagas et al., 2013). Aliado a isso, o estudo de compostos de selênio combinados à oxisteróis tem demonstrado resultados promissores. Sari et al. (2014) demonstraram que o composto *p*-cloro-fenil-selenoesterol possui efeito antioxidante e anti-inflamatório em um modelo de dor e inflamação em camundongos. No entanto, em doenças inflamatórias do intestino, este composto derivado do selênio ainda carece ser explorado.

A colite ulcerativa e a Doença de Crohn já foram listadas como uma das dez doenças mais difíceis de serem tratados segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Estudos relatam que os principais tratamentos de CU não são geralmente bem tolerados, têm efeitos colaterais e mostram uma alta taxa de recidiva (Maul & Zeitz, 2012). Tendo em vista que a colite é uma doença ainda não definida etiologicamente e que seus tratamentos muitas vezes trazem efeitos adversos e até a reincidência dessa doença, é de fundamental importância investigar compostos com potencial farmacológico que possam minimizar ou até mesmo prevenir os

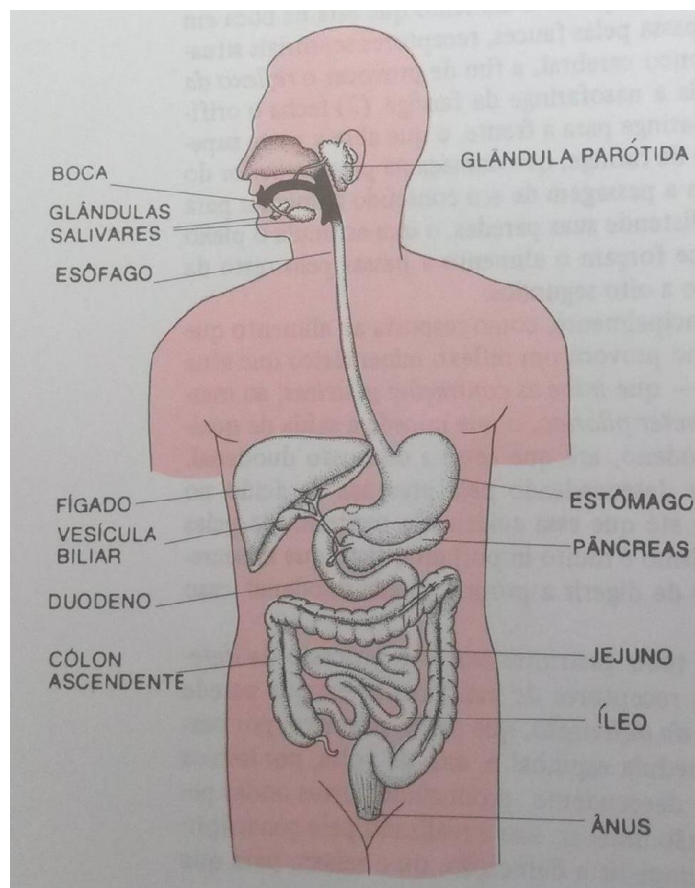
agravos dessa doença. Esse trabalho objetiva investigar o efeito anti-inflamatório e antioxidante do composto *p*-cloro-fenil-selenoesterol, no modelo de colite induzida por TNBS em camundongos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. O trato gastrointestinal (TGI)

O trato gastrointestinal compreende o trajeto entre a boca e o ânus (Figura 1). Cada órgão que o compõe o TGI possui funções específicas, o esôfago está adaptado para a passagem do alimento, o estômago para o armazenamento do alimento, e o intestino delgado é responsável pela digestão do alimento e da absorção de nutrientes. A função do sistema digestivo é a de prover nutrientes para o organismo. Dentre as funções gerais que o tubo gastrointestinal desempenha estão: propulsão da mistura do conteúdo gastrointestinal, secreção de sucos digestivos, digestão dos alimentos e absorção dos nutrientes (Guyton, 2011).

Figura 1. Sistema gastrointestinal em toda a sua extensão, da boca ao ânus.



Fonte: Guyton, (2011)

2.2. Intestino Grosso (Cólon)

Intestino Grosso (IG) inicia-se no esfíncter ileocecal e termina no ânus. Ocupa um espaço considerável no abdômem, medindo uma extensão aproximada de 1,5 metros, e é dividido em três porções: cólon ascendente, transverso e descendente (Costa, 2009).

Muitas doenças infecciosas se desenvolvem no intestino e por conta disso, é grande o investimento do organismo na sua autoproteção como, por exemplo, o grande número de estruturas linfóides e de células do sistema imune que estão presentes no TGI (Macdonald e Monteleone, 2005). O epitélio intestinal é formado por uma única camada de células que atuam como barreira primária e têm como principal função prevenir que os antígenos e bactérias do lúmen intestinal encontrem as células do sistema imune na lâmina própria (Costa, 2009). Em contrapartida, o epitélio que envolve o tecido linfóide contém um tipo de células epiteliais chamadas de células M especializadas em transportar bactérias e antígenos do lúmen para o tecido linfóide.

As células dendríticas da lâmina própria também podem alcançar o lúmen através das células epiteliais e também experimentam o ambiente luminal constantemente. O epitélio é repleto de células T CD8+ e a lâmina própria contém células T CD4, macrófagos e células plasmáticas produtoras de anticorpos. Uma possível ativação da resposta imune local pode ter proporções enormes, no entanto, uma ativação indesejada dessa resposta imune é inibida por citocinas imunossupressoras e células T regulatórias que têm a função de manter a homeostase do sistema imune local (Neutra et al., 2001; Rescigno et al., 2001; Macdonald e Monteleone, 2005).

2.3. Resposta inflamatória

O processo inflamatório é caracterizado por três eventos principais que incluem o aumento substancial do suprimento de sangue para o local afetado, o aumento da permeabilidade vascular e a migração celular para o sítio inflamatório (Sharma e Buchanan, 1994; Levy, 1996). O processo inflamatório também pode ser caracterizado por quatro sinais cardinais: rubor, calor, tumor e dor, em até cinco, com a perda da função do local afetado. Inflamações com as mesmas características ocorrem em todos os tecidos e órgãos agredidos (Franco et. al., 2010). A resposta inflamatória tem como principal objetivo proteger o organismo contra infecções e reparar os eventuais danos teciduais que possam ter ocorrido, o processo inflamatório também pode ser definido como uma resposta do sistema imune a danos celulares e teciduais causados por infecções microbianas ou estímulos nocivos de origem química ou física (Haanen e Vermes, 1995; Weiss, 2002).

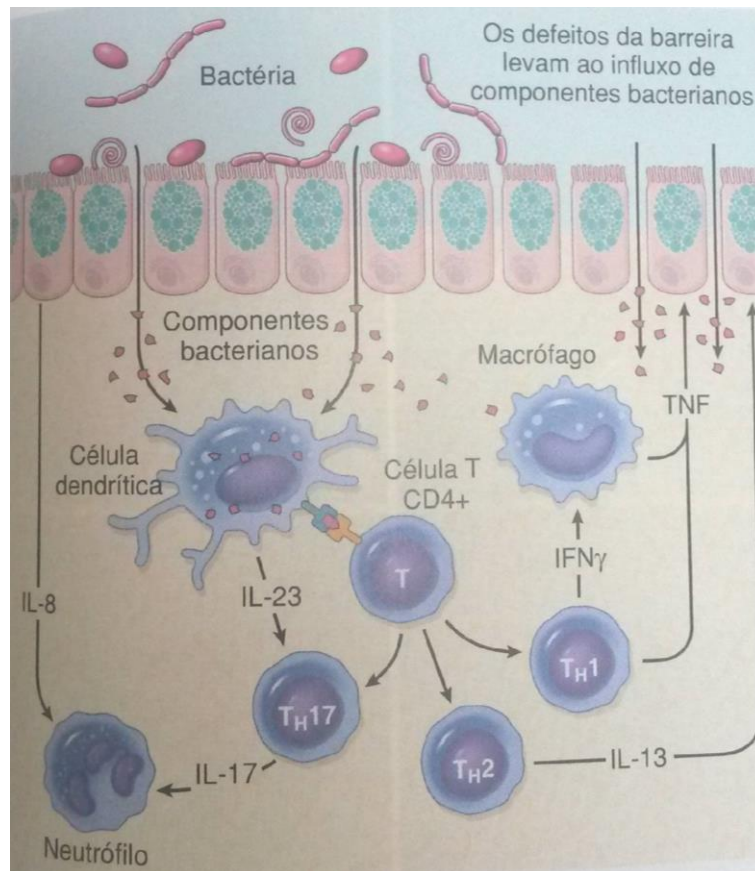
As citocinas são uma família de peptídeos sintetizados por monócitos e linfócitos, entre as várias citocinas existentes, o Fator de Necrose Tumoral (TNF, do inglês tumor necrosis factor) se destaca pelo seu papel na resposta inflamatória. Atualmente se sabe que o TNF é um mediador que apresenta múltiplas atividades, promovendo efeitos locais e a distância. O TNF é um proteína que ocorre nas duas formas moleculares distintas, a forma TNF- α e TNF- β . Durante o processo inflamatório, o TNF pode apresentar algumas atividades biológicas sobre alguns tipos de células, entre as quais, os macrófagos que exercem a função de ativação metabólica com aumento na síntese de prostaglandinas, a IL-8 conhecida como fator quimiotático para neutrófilos, a IL-6 anteriormente chamada de interferon-beta, apresenta amplo espectro de atividade, dentre elas o aumento da síntese de proteínas de fase aguda e está implicado na potencializando da inflamação (Franco et al., 2010).

2.4. Doenças inflamatórias intestinais (DII)

A doença inflamatória intestinal (DII) (IBD – do inglês *inflammatory bowel disease*), é uma doença idiopática, crônica e recidiva (Ochsenkühn e D'haens, 2011). No entanto, sabe-se que é uma doença complexa e multifatorial, podendo estar envolvido a predisposição genética, causas ambientais, estresse oxidativo, fatores microbianos e imunológicos, e até mesmo fatores psicológicos (Podolsky, 2002; Abreu, 2002; Hanauer, 2006). Há ainda relatos que a etiopatogênese dessa doença seria resultante de uma resposta imunológica exagerada da mucosa do cólon a antígenos luminais, possivelmente microbianos, em indivíduos geneticamente predispostos (Renato et al, 2011). Outras pesquisas ainda descrevem que a doença pode se manifestar em indivíduos geneticamente suscetíveis, acionados por fatores ambientais, como o uso de certos medicamentos, o tabagismo ou qualquer outra doença intestinal capaz de induzir a quebra da homeostase (Blumberg et al. 1999).

Os fatores genéticos que tornam o hospedeiro predisposto à manifestação destas patologias podem interferir na permeabilidade das camadas epiteliais intestinais (CEI) e alterar a regulação das bactérias comensais. Em conjunto, estes aspectos resultam na resposta imune exacerbada na mucosa intestinal, caracterizada pela ativação crônica de células T, junto com a produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios (Figura 2).

Figura 2 . Modelo de patogenia da DII, aspectos de ambas DII, CU e DC.



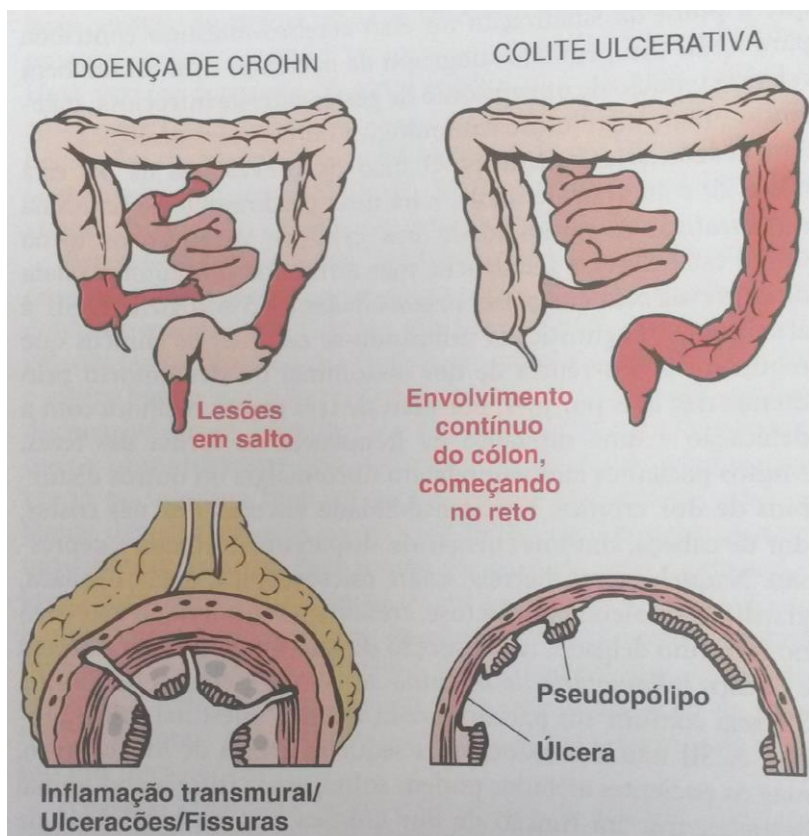
Fonte: Robbins e Cotran, (2010).

Dos fatores imunológicos, ainda há autores que detalham mais os fatores que estariam envolvidos, e podem ser compreendidos pela: resposta imune inapropriada da mucosa intestinal envolvendo antígenos provenientes da flora bacteriana comensal; alterações relevantes na composição da flora bacteriana; deficiência no sistema imune inato; defeitos na CEI, apresentação anormal de antígenos intraluminais por células apresentadoras de antígenos; desregulação das respostas das células mononucleares da lâmina própria, exposição exacerbada a mediadores pró-inflamatórios (Podolsky, 2002; Bouma e Strober, 2003).

2.5. Classificação das doenças inflamatórias intestinais

A colite ulcerativa (CU) (UC – do inglês ulcerative colitis) e doença de Crohn (DC) (CD – do inglês Crohn's disease) datam da antiguidade e pelo menos do século XVI, respectivamente, mas foi necessária a chegada das técnicas bacteriológicas modernas para excluir as etiologias infecciosas convencionais dessas doenças. (Sands BE, 2007). A CU e a DC representam as duas principais formas de DII (Odze, 2003), a distinção dessas duas doenças se dá dependendo do local do trato gastrointestinal que é afetado pelo processo inflamatório e essas doenças também diferem precisamente nas características clínicas, patogênicos e biomoleculares (Figura 3 e Tabela 1).

Figura 3 Distribuição das lesões na DII. Distinção das DII conforme morfologia.



Fonte: Robbins e Cotran, (2010).

Tabela 1 Resumo das características das DII

	Localização	Sintomas	Citocina Inflamatórias	TH1 / TH2	Tratamentos
Doença de Crohn (DC)	Camadas profundas da parede intestinal, o íleo, a primeira parte do cólon, esôfago, estômago e duodeno	Dor no abdômen, diarreia, perda de peso, sangramento retal e febre	Interferon gama (IFN- γ), interleucina 12 (IL-12), Fator de Necrose Tumoral (TNF)	Doença TH1	Medicamentos anti-inflamatórios, corticosteróides, imunomoduladores e tratamentos biológicos
Colite ulcerosa (CU)	Revestimento interior do cólon e reto	Diarreia, cólicas abdominais, sangramento retal, febre e náuseas frequentes	Interleucina 5 (IL-5), interleucina 33 /interleucina 1, receptor de ST2 (IL-33 / ST2)	Doença TH2	Aminossalicilatos, corticosteróides, imunomoduladores e tratamentos biológicos

Fonte: Adaptado Brumatti et al., (2014)

2.6. Incidência e Prevalência das doenças inflamatórias intestinais

A doença inflamatória intestinal consiste em uma condição inflamatória que ocorre tipicamente na segunda e terceira década de vida e afeta ambos os sexos (Blumberg et al. 1999, Bouma & Strober 2003, Xavier & Podolsky 2007). Há autores que relatam que ambas as doenças, CU e DC são mais frequentes em mulheres, e em geral surgem durante o período da adolescência e logo após aos 20 anos de idade (Robbins e Cotran, 2010).

2.7. A doença de Crohn (DC)

A doença de Crohn (DC), um epônimo baseado na descrição por Crohn, Ginzburg e Oppenheimer, existiu por séculos, Luis XIII da França (1601-1643) desenvolveu um quadro de diarreia sanguinolenta recorrente, febre, abscesso retal, úlceras no intestino delgado e no cólon e fistulas que começaram aos 20 anos de idade, mais provavelmente em função da doença de Crohn (Robbins e Cotran, 2010). A DC, também chamada de ileíte regional (pelo comprometimento ileal), é tipicamente transmural, sobre a morfologia da DC pode ocorrer em qualquer parte\área do TGI, mas os locais mais comumente encontrados os focos de inflamação, são o íleo terminal, válvula ileocecal e o ceco. A presença de áreas múltiplas, separadas e nitidamente delimitadas da doença, resultando em lesões em salto, é característica dessa doença e difere da colite ulcerativa (Robbins e Cotran, 2010).

A lesão inicial do cólon nessa doença é caracterizada por úlceras aftosas, que podem progredir a lesões múltiplas, frequentemente se unem formando úlceras alongadas e serpentiformes orientadas ao longo do eixo do intestino. Além de ser comum nessa doença, edema e perda da textura normal da mucosa. A mucosa apresenta aparência de pedras de calçamento, com textura grosseira, na qual o tecido doente é depositado acima do tecido saudável (Robbins e Cotran, 2010). As manifestações clínicas dessa doença são variáveis, na maioria dos pacientes a doença começa com ataques intermitentes de diarreia, febre e dor abdominal. Períodos de doença ativa são intercalados com longos períodos assintomáticos, que duram de semanas a meses (Robbins e Cotran, 2010). As manifestações extraintestinais da DC incluem uveíte, poliartrite migratória, sacroileíte e espondilite anquilosante, eritema nodoso e agrupamento das pontas dos dedos, qualquer uma dessas doenças pode se desenvolver antes da descoberta e manifestação da DC. (Robbins e Cotran, 2010).

2.8. A colite ulcerativa (CU)

A colite ulcerativa (CU) é uma doença inflamatória grave, limitada ao cólon e ao reto e que se estende apenas a mucosa e a submucosa. Macroscopicamente, a CU sempre envolve o reto e se estende proximalmente e de modo contínuo para envolver parte ou todo o cólon, inflamações focais do apêndice e do ceco podem estar presentes ocasionalmente nessa doença. A mucosa do cólon envolvida pode estar avermelhada e granular ou ter úlceras de bases largas, extensas e pode haver uma transição abrupta entre o cólon saudável e o doente (Robbins e Cotran, 2010).

Além disso, as características clínicas da CU, se dá por ataques de diarreia sanguinolenta com material mucoide enfileirado, dor abdominal inferior e cólicas que são temporariamente aliviadas pela defecação, além do que, esses sintomas podem durar dias, semanas ou meses e em casos graves da doença o paciente pode ser submetido a processo cirúrgico (Robbins e Cotran, 2010).

Manifestações extraintestinais da CU, incluem poliartrite migratória, sacroileite, espondilite esclerosante, uveíte, lesões de pele, pericolangite, e colangite esclerosante primária (Robbins e Cotran, 2010).

2.9. Resposta imunológica na doença inflamatória intestinal

Embora ainda estejam sendo investigados os mecanismos pelos quais a imunidade da mucosa pode contribuir para a patogenia das DII já se sabe que a polarização das células T helper para o tipo TH1 é bem reconhecida na DC, e dados recentes sugerem que as células TH17 também contribuem para a patogenia da doença (Robbins e Cotran, 2010). Alguns dados sugerem que a CU seja mediada por TH2, e isso é consistente com as observações dos níveis aumentados de IL-13 da mucosa intestinal em pacientes com CU. A proteção conferida pelos polimorfismos são do receptor de IL-23 e a efetividade da terapia anti-TNF em alguns pacientes com CU parece dar suporte ao papéis das células TH1 e TH17 (Robbins e Cotran, 2010).

O TNF- α exerce os seus efeitos pró-inflamatórios através do aumento da produção de IL-1 β e IL-6 e tem sido considerado um mediador chave da inflamação profunda exibindo atividade pró-inflamatória (Begue et al., 2006; Ali et al., 2014).

Segundo Ali (2014) uma regulação negativa de TNF- α , IL-6, IL-1 β e a expressão de IFN- γ na mucosa do cólon de animais induzidos por um modelo de DII podem ser verificados significativamente. A IL-4 tem um efeito imuno-reguladora e anti-inflamatória e desempenha um papel importante no processo imunológico da mucosa intestinal (Niessner e Volk, 1995). Por conseguinte, os níveis de IL-4 e IL-4 mRNA foram reduzidas em um modelo de DII (Karttunen et al., 1994)

Um dos fatores para o desenvolvimento DII, é ser resposta a um desequilíbrio da resposta imune a antígenos no ambiente intestinal (Atreya et al., 2000). A produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e de outros mediadores, que conduz à ativação inflamatória do sistema imunitário na mucosa intestinal (Cario e Podolsky, 2000).

2.10. Estresse oxidativo na doença inflamatória intestinal

A ativação do processo inflamatório provoca estresse oxidativo através da geração de espécies reativas de oxigénio (ROS), tais como peróxido de hidrogénio e radicais hidroxila (Fiocchi, 1998). Espécies Reativas do Oxigênio induzem oxidação dos lipídeos da membrana, num processo conhecido como peroxidação lipídica (Rangan e Bulkley, 1993). Assim, o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica podem exacerbar reações em cadeia por radicais livres e ativar a liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como neutrófilos, seguida pelo aumento da atividade da mieloperoxidases e de outras citocinas pró-inflamatórias que já foram implicadas no desenvolvimento de DII (Huang et al, 2011; Witaicenis et al, 2012).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima endógena dos granulócitos de mamíferos e desempenha um papel importante na iniciação e progressão da inflamação aguda e crônica. Na maioria dos estudos ela é utilizada como um índice de infiltração de granulócitos e é detectado como um parâmetro para o tecido

intestinal inflamada in vivo em camundongos, como uma alternativa aos métodos de análise existentes versátil como relatado por Krawisz et al (1984) e Xia et al. (1997).

2.11. Modelo de indução de DII

É crescente a busca de novas técnicas investigativas com o intuito de esclarecer os principais processos fisiopatológicos que medeiam essas doenças, permitindo assim o desenvolvimento e a descoberta de novas terapias menos agressivas e mais eficazes (Strober et al., 2007).

O objetivo do uso de modelos de doença em animais representam uma valiosa ferramenta de estudo dos aspectos em que se desenvolvem essa doença (objetivo é o de identificar os mecanismos de patogênese) que pode ser traduzido para a doença humana, como também servir para a pesquisa de novas alternativas terapêuticas (fármacos anti-inflamatórios e antioxidantes) para o uso na DII e ainda, os mecanismos de ação pelos quais exercem seus efeitos. Por exemplo, compostos com função definida em outras patologias podem ser ferramentas poderosas para o tratamento de DII (Kajiura et al, 2009).

A multifatorialidade desta patologia impede que ela seja reproduzida em modelos experimentais mais simples, como por exemplo, cultura de células, e a utilização de modelos animais revelou-se extremamente útil no estudo da colite ulcerativa, já que permite analisar os eventos iniciais da doença, o desenvolvimento identificando quais fatores imunológicos e genéticos estão envolvidos (Gaudio et al. 1998).

Como alternativa importante na investigação da viabilidade e eficácia do estudo sobre o tratamento da inflamação após a sua indução está a análise de alterações na histologia do tecido intestinal sendo esta, a maneira mais eficaz em modelos animais (Figuras 4, 5 e 6) (Ali et al., 2014).

Figura 4. Mini-endoscopia de alta resolução, *in vivo*, do intestino de camundongos após indução da colite por diferentes tipos de drogas (Adaptado Ali et al., 2014).



Figura 4. (A) *In vivo*, medição da atividade da MPO no cólon com processo inflamatório em camundongos pela detecção de luminescência; **(B)** grau de granulócitos por técnicas de imuno-histoquímica, do cólon saudável e do cólon com processo inflamatório (Adaptado Ali et al., 2014).

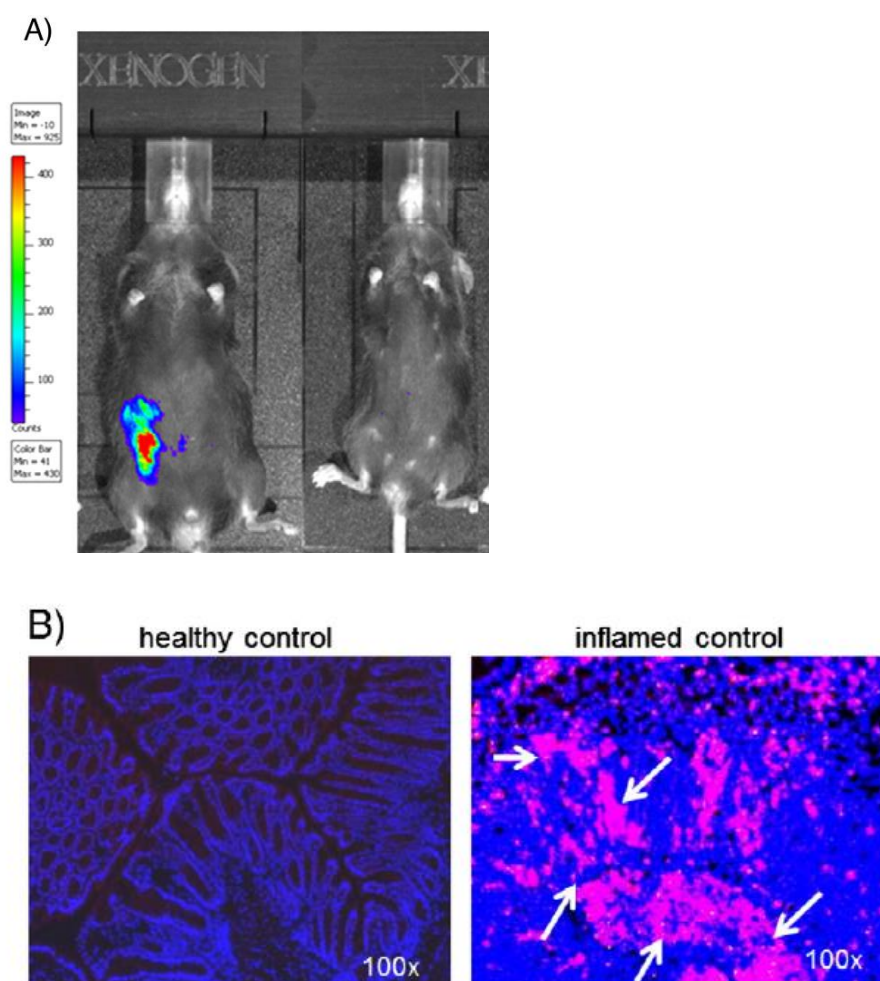
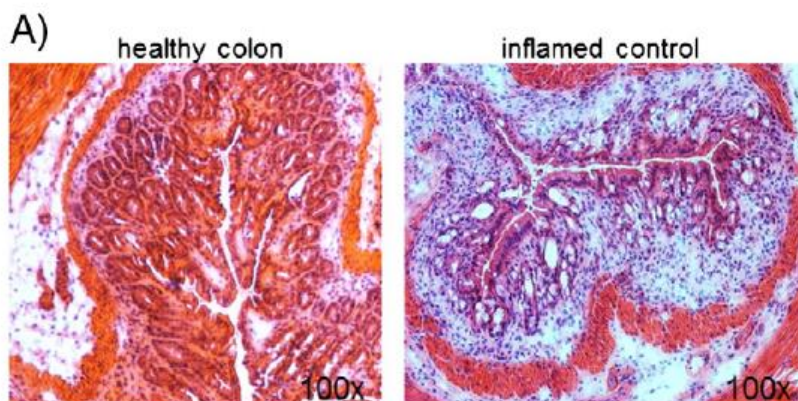


Figura 5. Histologia dos tecidos do cólon isolado do controle e do cólon com processo inflamatório (Adaptado Ali et al., 2014).



Atualmente há vários modelos animais que mimetizam as DII. Afim de investigar vários parâmetros envolvidos nessa patologia, uma das induções muito utilizadas é através do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico, mas conhecido como TNBS. Estudos relatam que o tratamento com TNBS é eficiente por ser capaz de induzir alterações na mucosa e na camada muscular do cólon, modificando a estrutura normal da sua parede, submucosa e mucosa, edema, infiltração de células inflamatórias, e segmentação da camada muscular (Depoortere et al., 1999).

Além disso, o TNBS reage com as proteínas autólogas, estimulando sua hipersensibilidade e levando à iniciação de células T específicas de antígenos (Elson et al., 1996). A resposta imune induzida por hapteno provoca graves ulcerações da mucosa e da barreira epitelial caracterizada pela infiltração de células mononucleares transmural. Ademais, o TNBS em modelos de roedores é caracterizado pelo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6 via resposta Th1, provocando distúrbios da motilidade intestinal (por exemplo, obstrução/diarreia), hipoatividade e perda de peso/perda de massa magra (Zhu et al., 2012; Dothel et al., 2013). Portanto, evidências sugerem que a colite induzida por TNBS se assemelha um modelo de doença de Crohn, devido as semelhanças com suas características histológicas e o processo inflamatório ser mediado via células Th1 (Alex et al., 2009; Hibi et al., 2002, Dou et al., 2013).

Portanto, o TNBS induz inflamação aguda que progride ao longo de várias semanas para uma fase crônica causando uma lesão típica da mucosa e infiltração de células inflamatórias são observados dentro de 2 horas, e as características de

inflamação crônica e infiltração celular linfocítica ocorre entre 48 horas após a exposição ao TNBS e persiste ao longo de várias semanas (Yamada et. a., 1992; Morris et al., 1989; Elson et al., 1995; Jurjus et al., 2004).

2.12. Tratamentos para Doença Inflamatória Intestinal

O tratamento das DII consistem na indução e manutenção da remissão para alcançar a cicatrização da mucosa (Chambrun, et al., 2010). Os medicamentos disponíveis atualmente, como aminossalicilatos, esteróides e imunossupressores são limitados e, além disso, os sistemas veiculares disponíveis até à data são menos eficientes para a terapia seletiva de DII (Lamprecht, 2003; Lichtenstein, et al., 2006)

O tratamento é sintomático, os fármacos utilizados para DII incluem glicocorticoides, aminossalicilatos, sulfassalazina e imunossupressores. Os glicocorticoides são potentes antioxidantes, entre eles a prednisolona ou budenosina são fármacos de escolha, dados por via oral ou localmente no intestino por supositório ou enema. Essa classe de medicamento não é ideal para tratamento a longo prazo, em razão dos seus efeitos colaterais, portanto só é utilizado para crises agudas na DII (Rang & Dale, 2007).

A manutenção da remissão tanto na CU como na DC, em geral, é obtida usando-se os aminossalicilatos, embora sejam menos úteis nesta última condição. A sulfassalazina é uma combinação do sulfonamídico sulfapritidina com o ácido aminossalicílico, a segunda forma, é ativa quando é liberado no cólon. Seu mecanismos ainda não está esclarecido; pode reduzir a inflamação por remoção dos radicais livres, inibindo a produção de prostaglandinas e leucotrienos ou por diminuição da quimiotaxia dos neutrófilos e da geração de superóxido. Seus efeitos indesejáveis são: diarreia, hipersensibilidade aos salicilatos e nefrite intersticial. (Rang & Dale, 2007).

A natureza crônica e intermitente de DII impõe, em determinados casos, os tratamentos a longo prazo, realizando a combinação de diferentes tipos de drogas. Porém, em casos mais graves, e onde não houve boa resposta aos tratamentos com drogas, um processo cirúrgico é a única solução (Renato & Passos, 2011).

Atualmente, os tratamentos farmacológicos das DII são geralmente não curativas e, muitas vezes apresenta efeitos colaterais graves; por esta razão, sendo conhecida a relação entre processos inflamatórios e DII, é digno de interessante o estudo e o desenvolvimento de nova estratégia com papel anti-inflamatório.

2.13. Selênio

O Selênio (Se) é um micronutriente essencial ao ser humano e é encontrado naturalmente nos alimentos, água, ar e também na forma de suplemento (Thomson, 2006). Foi descoberto em 1817, pelo químico sueco Jons Jakob Berzelius, porém, somente em 1957, foi diagnosticado como sendo um elemento essencial para os mamíferos, por Shwartz e Foltz (Ortuno et al., 1997; Alarcon-navarro & Martinez, 2000).

O Se apresenta diversas funções sendo, dentre elas: função antioxidante, pela redução dos peróxidos orgânicos e inorgânicos, formados nas reações dos radicais livres, nos meios intra e extracelular; ação anticancerígena; potencialização do sistema imunológico, aumentando a resistência do sistema imune; participação na conversão de T4 em T3; proteção contra a ação nociva de metais e xenobióticos, atuando na desintoxicação do organismo contra metais pesados e xenobióticos; estabilização do metabolismo do ácido araquidônico; além de favorecer a síntese da metionina a partir da homocisteína, diminuindo o risco de doenças cardiovasculares, e atua na fertilidade masculina (Mertz, 1995; Alarcon-navarro & Martinez, 2000; Davis & Uthus, 2002).

2.13.1 Metabolismo do selênio

A metabolização da maioria do Se ingerido se dá no fígado e, após metabolizado, os compostos orgânicos de Se seguem pela veia portal para o sangue ou são removidos no próprio fígado pela transulfuração do mesmo (Burk & Hill, 2005). Metade do Se do organismo é armazenado nos músculos, esqueleto, rins, fígado e testículos. As células que mais utilizam o Se são as células do sistema

imune (monócitos, macrófagos, linfócitos T e B), eritrócitos e plaquetas (Thomson, 2006; Castro, 2007). Certos grupos são mais vulneráveis a deficiência desse mineral, alguns autores destacam a presença de doenças crônicas não transmissíveis e enfermos do trato gastrointestinal (Ortuno, et al., 1997; Holben & Smith, 1999).

2.13.2 Função antioxidante do Selênio

A função antioxidante do Se está relacionada às selenoproteínas (uma das três formas de armazenamento de Se no organismo humano), principalmente a selenoproteína P e as glutations peroxidases (Gpx) dependentes de Se (Flohe, 1999; Hatfield et al., 2014).

Dentre as Gpx estão: a glutations peroxidase citosólica, a glutations peroxidase fosfolípido hidroperóxido, a glutations peroxidase do plasma e a glutations peroxidase gastrintestinal. Essa última é encontrada no trato gastrointestinal e no fígado parece ser a principal Gpx que protege contra os hidroperóxidos em passagem pelo trato gastrointestinal. Também reage com peróxidos resultantes dos subprodutos do metabolismo digestivo de alimentos e xenobióticos no fígado. Em ambas funções essa glutations tem um potencial antimutagênico dos hidroperóxidos e pode, por isso, proteger o trato gastrointestinal e evitar o desenvolvimento de processos malignos (Flohe, 1999; Holben & Smith, 1999).

2.13.3 Função do Selênio no sistema imune

Uma das funções do Se é aumentar a resistência no sistema imunológico, que apresentam-se em grandes concentrações dentro dos fagócitos, fazendo com que algumas propriedades das células fagocitárias, tais como quimiotaxia, migração, ingestão e atividade fungicida, sejam dependentes dessa concentração de Se (Ortuno, et al., 1997).

Outros efeitos desse micronutriente como regulador do sistema imunológico é explicado pela manutenção da integridade das membranas das células imunocompetentes. O Se também já foi descrito estando presente no papel de otimizar a resposta imune celular e humoral, mediante a melhoria dos fenômenos de fagocitose, das células natural killer, proliferação dos linfócitos T e síntese de imunoglobulinas. O Se também modula os produtos oxidativos na respiração das células fagocitárias, e também é capaz de inibir a ativação da transcrição do NF- κ B limitando a resposta inflamatória (Castro, 2007).

2.13.4 Compostos derivados de selênio e suas funções

Numerosos estudos tem demonstraram que o Se é um elemento essencial e fundamental para a saúde humana. Compostos que estejam conjugados com esse elemento, teriam o mesmo efeito benéfico no nosso organismo como, por exemplo, o selenito de sódio (uma forma de selênio inorgânico), já foi estudado por ser capaz de induzir a morte de células de cancro através de vários mecanismos (Králová et. al., 2012). Estudo de Yang, 2016 demonstrou o papel de autofagia induzida por selenito, e o poder de antagonizar a apoptose em células de cancro colorretal, estudo realizado *in vitro* e *in vivo*. Outros compostos derivado do selênio, um organoselênio denominado disseleneto de difenila, demonstrou-se capaz de reduzir a inflamação em animais em modelo de inflamação, com significativa redução de marcadores pró-inflamatórios e níveis de espécies reativas (Luchese et al., 2012).

2.13.5 Selênio e Doença Inflamatória Intestinal

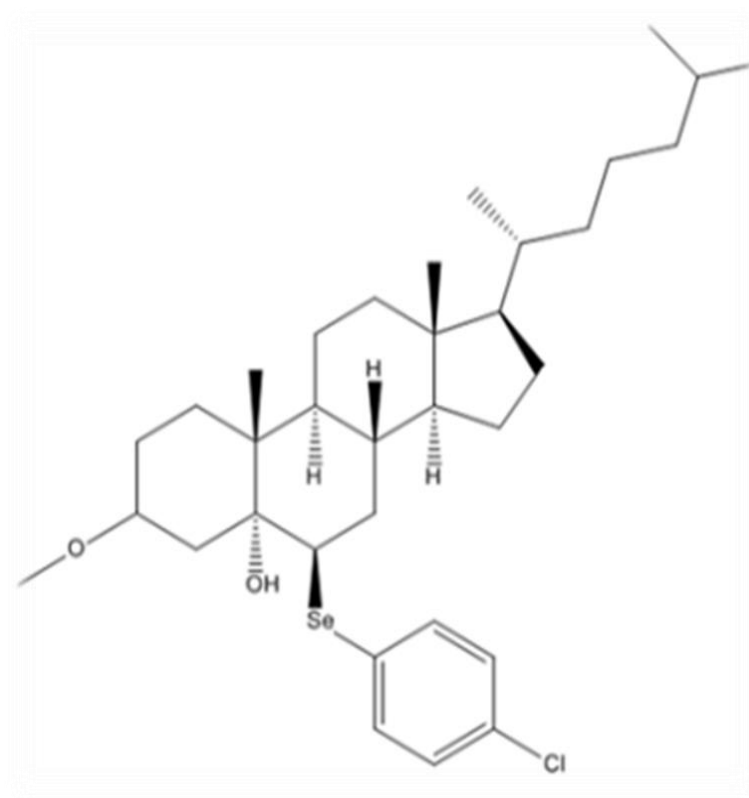
Tirosh et al. (2007) estudou uma dieta rica em selênio em um modelo de DII, no modelo induzido por TNBS, e obtiveram os seguintes resultados: no modelo de colite induzida por TNBS, o mesmo causou danos nos tecidos, acompanhado pelo bloqueio da respiração mitocondrial, perda do DNA mitocondrial, e a expressão de proteínas codificadas nucleares das mitocôndrias. Neste estudo o Se foi capaz de proteger eficazmente as mitocôndrias do cólon por supra-regulação da expressão de

fator-1 (fatores de transcrição nuclear respiratória mitocondrial) e fator-A (transcrição mitocondrial). O Se também foi capaz de bloquear as alterações inflamatórias e necróticas induzidas no modelo de colite. Tirosh et al. (2007) concluiu que o Se, em doses elevadas (2 µg/g de Se por peso corporal), é, portanto, um potencial agente terapêutico na doença inflamatória do intestino.

2.13.6 O potencial terapêutico do *p*-cloro-fenil-seleno-esterol (PCS)

A combinação de oxiesteróis e selênio é raro, e as sínteses destes compostos têm um grande potencial para a criação de um novo conjunto de moléculas com atividades farmacológicas (Rodrigues et al., 2010). (PCS) *p*-cloro-fenil-seleno-esterol (Figura 7) é descrito por apresentar propriedades anti-inflamatórias e anti-nociceptivas em modelos térmicas e químicas de nocicepção e por mostrar que o tratamento com PCS não apresentou efeitos na coordenação motora. Além disso, o tratamento agudo não causou alteração nos parâmetros bioquímicos assim como no consumo de água, comida e ganho de peso; esses dados destacam que o PCS não causou efeitos tóxicos agudos em camundongos. A contribuição dos sistemas adenosinérgicos e dopaminérgicos foi demonstrado na sua ação antinociceptivo no estudo de Sari et al. (2014). Outro dado importante deste estudo, e de fundamental relevância visando o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, foi a ação antinoceptiva prolongada (duração de até 48 horas) do PCS, em um modelo de nocicepção e edema de pata induzida por formalina (Sari et al, 2014). No entanto, novos estudos são necessários, pois permitirá a compreensão dos mecanismos exatos envolvidos nas ações do PCS, além de apoiar o seu papel benéfico no tratamento da dor, do efeito anti-inflamatório e antioxidante em diferentes patologias estudadas.

Figura 6. Estrutura química do composto *p*-cloro-fenil-selenoesterol



OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito do *p*-cloro-fenil-selenoesterol (PCS) administrado oralmente em camundongos swiss fêmeas submetidos a um modelo de DII pelo TNBS.

Objetivos Específicos

- Avaliar a intensidade da DII em animais swiss fêmeas tratadas ou não com PCS através de sinais clínico-histológicos: peso corporal; peso, comprimento e morfologia do cólon;
- Avaliar parâmetros inflamatórios (TNF- α e IL-6) no sangue e mieloperoxidase no cólon;
- Avaliar o efeito da indução da colite e do tratamento com PCS no estresse oxidativo colônico.
- Analisar o efeito do PCS sobre as defesas antioxidantes no cólon de animais que foram induzidos por TNBS;

3. MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito. Os itens Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

***P*-chloro-phenyl-selenoesterol ameliorates signals of experimental model of Inflammatory bowel disease in mice: The involvement of the anti-inflammatory and antioxidant effect.**

Micheli Stéfani Zarzecki¹, Vandrezza Cardoso Bortolotto¹, Márcia Rósula Poetini¹, Stéfani Machado Araujo¹, Mariane Trindade de Paula¹, Luana Meichrty¹, Silvane Souza Roman², Cristiano Spiazzi³, Franciele Weber Santos Cibir³, Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues⁴, Cristiano Ricardo Jesse¹, Marina Prigol^{1, 5}

¹ Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, CEP 97650-000, RS, Brazil

² Universidade Regional Integrada, Campus Erechim CEP 99700-000, RS, Brazil

³ Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguai, CEP 97508-000, RS, Brazil

⁴ Universidade Federal de Santa Maria, Campus Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil

*Corresponding author:

Marina Prigol

Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui

Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, s/n - Bairro: Promorar, Itaqui, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 97650-000

Email: marinaprigol@gmail.com

ABSTRACT

Objective: This study aims to investigate the protective effect of *p*-chlorophenylselenoesterol (PCS) in an experimental model of IBD.

Methods: Intracolonic administration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS; 2mg/100 μ L 50% ethanol) was given to female Swiss mice. To compare the effects of PCS, 0,2 mg/kg; 10 ml/kg(i.g.) in IBD induced by TNBS, including the review of several parameters: weight, length, histological analyses determination, TBARS, ROS levels, SOD, catalase and MPO activity of colon. The serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were assessed.

Key findings: Pre-administration with PCS reduced the clinical and histopathologic severity of TNBS-induced colitis. The therapeutic effects of PCS in this model were associated with a significant decrease in pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 and a decrease in MPO activity. Furthermore, combined with improvements in inflammatory parameters, the treatment with PCS was able to decrease oxidative stress and to prevent the decrease in antioxidant defenses in animals with TNBS-induced colitis.

Conclusions: This finding suggests that PCS can improve experimental colitis in mice and it could be a potential therapeutic agent for the treatment of patients with IBD.

Keywords: Selenium; IBD; Inflammation; oxidative stress.

4. INTRODUCTION

Inflammatory bowel diseases (IBD), including ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are chronic diseases, characterized by an etiology that was not fully elucidated [1]. However, it is known to be a complex and multifactorial disease, which involves genetic predisposition, environmental causes, oxidative stress, microbial and immunological factors [2]. One of the factors related to the development of IBD is assumed as being an imbalance of the immune response to antigens in the intestinal environment [3], which produces pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α [4]. The activation of the inflammatory process provokes oxidative stress through the generation of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide and hydroxyl radicals [5]. These species induce the oxidative destruction of membrane lipids in a process known as lipid peroxidation [6]. Therefore, oxidative stress and its consequent lipid peroxidation could exacerbate free radical chain reactions and activate the release of pro-inflammatory mediators such as neutrophils, followed by the increase in MPO activity [7] and other pro-inflammatory cytokines that have already been implicated in the development of IBD.

Acute inflammation was induced by TNBS (2,4,6- trinitrobenzene sulfonic acid-induced), which was administered by an enema to rats or mice in combination with ethanol (40–50%), to break the mucosal barrier and allow TNBS penetration into the bowel wall. It reacts with autologous proteins and stimulates a delayed type of hypersensitivity, leading to the priming of antigen-specific T cells. The hapten-induced immune response provokes severe ulcerations of the mucosal and epithelial barrier, characterized by transmural infiltration of mononuclear cells. TNBS in rodent models is characterized by increased levels of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 driven response Th1 [8]. Moreover, TNBS also causes motility disorders (e.g. intestinal obstruction/diarrhea), hypoactivity and weight loss/wasting [9]. Considering that the colitis is a disease not yet defined etiologically and its treatments often cause adverse effects as well as the fact that there are high rates of recurrence of the disease, it is of fundamental importance to investigate compounds with pharmacological potential to minimize or prevent the disorders of this disease.

The organic selenium compounds are known for its therapeutic potential in various experimental models, including inflammation and oxidative stress [10].

Besides its antioxidant properties, compounds that derivate from selenium showed anti-inflammatory behaviors in several models of inflammation; such as carrageenan-induced paw edema [11] and pleurisy [12], Freund's Complete Adjuvant-induced inflammatory pain [13] and atherosclerotic lesions [14].

The combination of oxysterols and selenium is rare, and the designed syntheses of these compounds have a great potential to create a new array of molecules with pharmacological activities [15]. *P*-chloro-phenylselenoesterol (PCS) is already acknowledged in the literature for its anti-inflammatory and antinociceptive properties in thermal and chemical models of nociception [16]. Thus, this study aims to investigate the anti-inflammatory and antioxidant effects of *p*-chloro-phenyl-selenoesterol compound in the model of colitis induced by TNBS in mice.

5. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents

TNBS was purchased from Sigma (St. Louis, MO, United States). *p*-chloro-phenyl-selenoesterol (PCS) was prepared according to the method described by Rodrigues [15]. Analysis of the ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) and ¹³C NMR spectra showed that the obtained *p*-chloro- phenyl-selenoesterol (PCS) presented analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of the compound (99.9 %) was determined by GC/MS and it was stable under storage conditions at room temperature, humidity and light. PCS solution was packaged, stored under refrigeration and protected from light; the whole compound that was administered to the animals was prepared on the day of the treatment. All other chemicals were obtained from analytical grade or from standard commercial suppliers. Canola oil was obtained from a local supermarket. The cytokines TNF- α and IL-6 were measured by ELISA, according to the manufacturer's instructions (Sigma, Catalog T7539 [for TNF α] and Catalog I9646 [for IL-6], respectively).

2.2. Animals

Healthy adult female Swiss mice, at 8–10 weeks of age, were obtained from the Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS, Brazil).

Animals were kept in chambers under a 12-h light/dark cycle with controlled humidity (60–80%) and temperature (22 ± 2 °C). Food and water were freely available. Experiments were performed during the light phase of the cycle. The Ethics Committee on the use of animals of the Universidade Federal do Pampa (Urugaiana, RS, Brazil) approved all experimental protocols used in this study (Protocol number 022/2014). We chose to use female mice in our study, since the work of Victoria [17], showed that inflammatory bowel disease is more prevalent in young women.

2.3. Experimental design

Animals received 2 mg (in 100 ml of 50% ethanol) of TNBS [18] and it was given intracolonic (i.c.) at day 5. p-chloro-phenyl-selenoesterol (PCS) 0,2 mg/kg was dissolved in canola oil and a dose of 10 ml/kg was administered intragastrically (i.g) once a day for nine consecutive days. The dose of PCS was chosen based on previous studies [16]. Control animals received canola oil (10 ml/kg) given intragastrically and 100µl sterile 0.9% NaCl solution was administered intracolonicly (i.c.).

The animals were divided into four groups (n= 10-15 per group), as follows: (1) Control group (CTL): mice received canola oil intragastrically (i.g) and the NaCl solution was administered intracolonicly (i.c.); (2) TNBS group: mice received canola oil (i.g) and TNBS (i.c.); (3) PCS group: mice received p-chloro-phenyl-selenoesterol (i.g) and NaCl solution (i.c.); (4) PCS + TNBS: mice were treated with PCS (i.g) and further intestinal inflammation was induced by TNBS (i.c.). Experimental design is pictured in figure 1.

2.4. TNBS-Induced Colitis and Colitis Evaluation

On the 4th day, mice were fasted for 24 hours and they had free access to a 5% glucose solution, on the 5th day mice were anesthetized (xylazine, 10 mg/kg; ketamine 80 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) and TNBS was administered intracolonicly (i.c.) using a polyethylene catheter slowly inserted into the colon, 4 cm proximal to the anus [19]. The animals were kept in a head down, vertical position for 4 min [20].

In order to evaluate whether the PCS would be able to improve clinical signs of colitis, throughout the experiment (1-10 days), mice were monitored for body-weight loss. On day 10 the animals were euthanized, blood samples were collected

directly from the ventricle of the heart in anaesthetized animals, using heparin as the anticoagulant. Subsequently, the mice's colon was removed, dissected and the therapeutic effect of PCS treatment on experimented colitis was evaluated: Body weight, colonic weigh and length, colon weight/length ratio [19]. The histological scoring and biochemical analysis were analyzed. Blood samples and plasma were separated by centrifugation (2400g) for 15 min. The colon was quickly removed and homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 (1/10, w/v). The homogenate was centrifuged at $2400 \times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min and a low-speed supernatant fraction (S1) was used for biochemical assays.

2.5. Histopathological analysis

Four mice per group were subjected to a detailed histopathological analysis. Small pieces of colon tissue were fixed in 10% buffered formalin solution for 24h after they were dehydrated in ethanol, cleared in xylene and embedded in paraffin. Serial sections with a thickness of $4\text{ }\mu\text{m}$ were cut and stained with haematoxylin and eosin, and evaluated under light microscopy. The histological score of inflammation found was in accordance to the study of Schmidt [21]. Inflammation scores were as follows: 0, no infiltration; 1, increased number of inflammatory cells in the lamina propria; 2, inflammatory cells extending into the submucosa; 3, transmural inflammatory infiltrates. The histo-pathological was performed in a blind fashion by two pathologists.

2.6. Inflammatory Cytokines

The cytokines TNF- α and IL-6 were quantified using ELISA mouse kits for serum and plasma (St. Louis, MO, United States). The results are expressed in $\mu\text{g/mL}$.

2.7. Myeloperoxidase Activity (MPO)

The colon tissues were homogenized in potassium phosphate buffer (20 mM, pH 7.4) containing EDTA (0.1 mM). After the homogenization, the samples were centrifuged at $2,000 \times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min to yield a low speed supernatant fraction (S1'). Then, the (S1') fraction was centrifuged again at $20,000 \times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min to yield a final pellet that was resuspended in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6.0) containing hexadecyltrimethyl ammonium bromide (0.5%) (P2). The samples were finally frozen, thawed three times for the posterior enzymatic MPO assay.

Besides, aliquots of colon tissue preparations were frozen (-20 °C) for one week for posterior analysis [22]. For the MPO activity measurement an aliquot of P2 (20 µl) was added to a medium containing potassium phosphate buffer (50 mM; pH 6.0), hexadecyltrimethyl ammonium bromide (0.5%), and N,N,N',N'- tetramethylbenzidine (1.5 mM). The kinetic analysis of MPO was started after H₂O₂ (0.01%) addition, and the color reaction was measured at 655 nm at 37°C by spectroscopy. Results are expressed as OD/mg of protein/min.

2.8. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and Reactive species (RS) levels

TBARS, which is a measure of lipid peroxidation, was determined using an aliquot (200 µl) of S1, 500 µl thiobarbituric acid (0.8%), 200 µl sodium dodecil sulfate (SDS, 8.1%) and 500 µl acetic acid buffer pH 3.4; the mixture was incubated at 95 °C for 2 h. TBARS levels were expressed as nmol MDA/mg protein [23].

To estimate the production of RS tissue homogenate, an aliquot of S1 (10µl) was incubated with 10µl of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA). The RS levels were determined by a spectrofluorimetric method. The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichloro fluorescein (DCF) is measured to detect intracellular RS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520nm (with 480-nm excitation) 30min after the addition of DCHFDA to the medium. RS levels were expressed as units of fluorescence (UF) [24].

2.9. Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT) activity

The assay consists in the inhibition of superoxide-driven oxidation of quercetin by SOD at 406 nm, according to the procedure of Kostyuk and Potapovich [25]. The complete reaction system consisted of 25 mM phosphate buffer, pH 10, 0.25 mM EDTA, 0.8 mM TEMED and 0.05µM quercetin. SOD was expressed mU/mg protein.

Catalase activity was assayed following the procedure of Aebi [26], the activity was assayed following the clearance of H₂O₂ at 240 nm in a reaction media containing 50 mM phosphate buffer pH 7.0, 0.5 mM EDTA, 10 mM H₂O₂, 0.012% TRITON X100. CAT levels were expressed in mU/mg protein. Protein concentration was measured by the method of Bradford [27].

2.10. Statistical Analysis

Statistical analysis of data was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by post-hoc comparisons using the Newman Keuls test when appropriate. Experiments were expressed as means S.E.M. Differences between groups were considered statistically significant when $P < 0.05$.

6. RESULTS

2.13.1 Systemic treatment with PCS is able to ameliorate the clinical signs of TNBS-induced colitis

Mice treated with TNBS showed prostration, piloerection and hypomotility. The results showed that mice treated with PCS had an improvement in colitis when compared to those treated only with TNBS. Animals that had induced colitis with TNBS showed decreased body weight compared to the control group. The treatment with PCS was able to ameliorate this parameter after 6 days of treatment (Figure 2A). The colonic weight in the TNBS group increased significantly compared to the control group and PCS partially prevented this increase in colon weight (Figure 2B). The colonic length of the TNBS group was significantly decreased compared to other groups. PCS treatment was able to prevent significantly the shortening in colon length induced by TNBS-in mice.

This indicates that the oral administration of PCS significantly ameliorated the signs of colon shortening (Figure 2C). As shown in Figure 2D, colon weight/length ratio has increased significantly in mice with TNBS-induced colitis compared to the control group. On the other hand, the animals treated with PCS significantly decreased colon weight/length ratio compared to the TNBS-induced colitis group.

2.13.1 PCS improved histological of TNBS-induced colitis in mice

The CTL group showed single cylindrical epithelium with many goblet cells and tubular glands of Lieberkuhn. Below the mucosa, it was observed a muscular mucosa with smooth muscle and in the submucosa there was connective tissue surrounding the body and the presence of muscle. We observed in Figure 3A (A, B), note the tubular glands coated by simple cylindrical epithelium arranged in the mucosal (arrow) with many goblet cells and Lieberkuhn's glands (gl) of normal aspect. Observe the submucosal layer (s) with connective tissue of normal

appearance. The muscular layer thickness was typical (m). (C,D) an PCS treated-group showed submucosa and mucosa layer of normal aspect similar to the control group. (E,F) an TNBS treated-group. Note the intense inflammatory process (*) between the Lieberkuhn's glands in the submucosa. (G,H) an PCS + TNBS treated-group. The TNBS group showed inflammation of glands over the mucosa and PCS was able to prevent this inflammation. (Figure 3A). PCS was able to decrease histological scores followed by restored pathological characters (Figure 3B).

2.13.2 PCS reduced the production of inflammatory cytokines in the inflamed colon

A significant increase in the content of TNF- α and IL-6 was observed in mice exposed to TNBS, compared to the control mice. PCS was able to prevent the increase on TNF- α and IL-6 induced by TNBS at the control levels (Figure 4A and 4B). The data indicates that the protective effect of PCS in the Inflamed Colon was correlated with the repression of pro-inflammatory cytokines.

2.13.3 PCS prevent the increased MPO activity in the TNBS-induced colitis in mice

There was a significant increase in the activity of MPO in the TNBS induced colitis compared to the control mice. The increase of MPO was significantly prevented by the treatment with PCS (Figure 5).

2.13.4 PCS attenuated oxidative stress in TNBS-induced colitis in mice

The TNBS group showed significant increase on TBARS and RS levels compared to the CTL group. Treatment with PCS resulted in a significant decrease level of TBARS and RS compared to the group of mice with TNBS-induced colitis (Table 1).

2.13.5 PCS ameliorate antioxidant defenses in the model of TNBS-induced colitis in mice.

SOD and CAT levels were significantly reduced by TNBS exposure. Levels of SOD and CAT were significantly increased in PCS + TNBS treated mice compared to TNBS alone, but not significantly different from the control group (Table 1).

7. DISCUSSION

The present work was particularly focused on studying the effects of PCS on a TNBS-induced experimental acute colitis, which is considered a model validated to find drugs potentially active in this disease. TNBS induced colitis has similar histologic features to Crohn's disease [18]. Here we report, for the first time, the therapeutic effects of PCS on the outcome of experimental intestinal inflammation. The improvement of mice colitis is represented by the preservation of body weight, weight and length of colon, reestablishment of mucosa architecture, reduction of local inflammatory infiltrate and modulation of the immune and oxidative response. This is associated and due to the reduction of pro-inflammatory cytokines, oxidative stress and the improvement of antioxidant defense activities during colitis. The mechanism by which PCS prevents experimental models of inflammatory bowel diseases in mice is shown in Figure 6.

Many studies associate the evolution of colitis in mice to changes in body weight, length and weight of the colon of animals with inflammatory bowel diseases which are mimicked by drugs [18, 20, 28, 29]. Body weight changes are studied in almost all researches found in the literature regarding IBD [20; 28] (Figure 2A). There are also studies referring to measurements of colon weight and length of healthy animals in comparison to those with IBD [18, 28; 29;] (Figure 2B and 2C). Colon weight/length ratio was used as an indicator of the disease, which is also associated to intestinal wall thickening and to the intensity of inflammation [18; 19; 29] (Figure 2C). Data presented in this study demonstrate that PCS ameliorated the clinical signs of this chronic disease induced with TNBS in female Swiss mice treated for nine days.

The major IBD symptoms involve the inflammation and damage of the intestinal mucosa (with periods of remissions) and abdominal pain. Diarrhea, fecal bleeding, weight loss and fatigue are also present. The currently available anti-IBD therapies help to alleviate the symptoms, but do not lead to a complete cure, therefore innovative studies are necessary in order to find potential drug candidates [30]. The search for a strong analgesic agent without side effects has been a longstanding interest in drug development. The aim of the study was to characterize the anti-inflammatory action of PCS in the mouse model of colitis. Future studies are needed to evaluate the antinociceptive potential of PCS in inflammation in colitis-

model. These results are in agreement with Sari [16], which demonstrated that the PCS has longstanding antinociceptive and anti-inflammatory effect.

Regarding colonic tissue damage, the histological analysis showed the presence of inflammation cells between tubular glands of Lieberkuhn and PCS was able to prevent inflammation induced with TNBS in the colon of mice. These observations are in agreement with previous studies, where TNBS induced colitis caused several histological alterations including mucosal invasion of polymorphonuclear cells with excessive generation of inflammatory mediators that causes injuries to colon tissues similar to most signs and symptoms of human IBD [31; 19] (Figure 3A and 3B). Our findings from the histological analysis are consistent with our results that showed a decrease of pro-inflammatory cytokines, among other parameters analyzed in this study.

Currently, IBD subjects are treated with conventional drugs that include corticosteroids, aminosalicylates, thiopurines, antibiotics and folic acid antagonists [32]. However, these therapies are not totally effective and a number of patients require repeated surgeries to control disease complications. Moreover, some of them are refractory to the pharmacological interventions, which also may induce severe adverse effects [33]. Thus, the therapeutic failures associated to classical IBD treatments emphasize the necessity of exploring other compounds with therapeutic potential to treat IBD.

Corticosteroids are the most potent and effective anti-inflammatory agents currently available for chronic inflammatory diseases including asthma and IBD [34]. In literature, corticosteroid (anti-inflammatory), and steroids are the treatments chosen for moderate to severe flare-ups [35]. In this way, previous studies have demonstrated that PCS has potent and prolonged effects in models of inflammation and pain [16]. Accordingly, we observed in our study the result of PCS in improving the signs of colitis, as well as the involvement of inflammatory cytokines on this effect (Figure 4A and 4B). We believe that the pharmacological effect in improving the signs of colitis is due to the union of the steroid ring to molecule selenium (Se). PCS (10 mg/kg, i.g.) administration also has anti-inflammatory and antinociceptive properties in thermal and chemical models of nociception [16].

TNF- α is a pleiotropic cytokine which is involved in many aspects of inflammation that is relevant to the pathogenesis of IBD, such as the expression of adhesion molecules, leukocyte recruitment, enhanced intestinal permeability along with the initiation of cytotoxic, apoptotic and acute phase responses. Our data revealed increased colonic levels of TNF- α in mouse with induced colitis by TNBS, the same results presented by other studies [20, 29] (Figure 4A). IL-6 is an example of pro-inflammatory cytokines and its activation is related to immune cells induced by TNF- α . IL-6 is produced by various cell types and exerts pleiotropic effects on different organ systems. Altered IL-6 production has been found in inflammatory states such as mesangial glomerulonephritis, fever, sepsis and IBD [2]. Increased levels of IL-6 in colitis induced by TNBS in murine have been seen in many current studies [18; 36]. Our data showed that the administration of PCS could inhibit mice colitis by reducing IL-6 production (Figure 4B), demonstrating that PCS influences cytokines production; we also showed that PCS was able to reduce serum levels of TNF- α and IL-6 caused by TNBS and fasten immune inflammation. PCS was able to behave as an immunosuppressant due to the reduced levels of pro-inflammatory cytokines in TNBS-induced colitis in mice. Therefore PCS treatment in our study is considered a potent longstanding anti-inflammatory and immunomodulatory.

Myeloperoxidase (MPO) enzyme, a well characterized marker for neutrophil infiltration is stored in azurophilic granules and it is subsequently released upon neutrophil activation and degranulation [37]. Chronic inflammation of the large intestine predominantly comprises lymphocytes and plasma cells exacerbation; neutrophils migrate and degranulate substances such as MPO. Therefore, tissue MPO activity was assayed to monitor the condition of inflammation [18]. TNBS-induced colitis causes neutrophil infiltration of the MPO enzyme which is stored in granules. This enzyme is present in high levels in inflammatory bowel diseases [37; 38]. In the present study, oral administration of PCS effectively canceled neutrophil infiltration of the colon of animals from the TNBS group, which is proven by the reduction of the MPO activity in the analyzed tissue (Figure 5). The decrease of MPO activity in the TNBS-induced colitis group treated with PCS may also reflect the minor production of neutrophils at the site of injury and this finding corroborates the

histological analysis. This observation was further corroborated by the decreased levels of cytokines pro-inflammatory by PCS in mice with TNBS induced colitis.

Activation of inflammatory cells causes oxidative stress through the increase of ROS which inflict intestinal injuries in IBD [5]. Conversely, oxidative stress and redox signaling are implicated in the increase of inflammatory cytokines and the recruitment of inflammatory cells through many signaling pathways. Oxidative stress and its consequent lipid peroxidation could exacerbate free radical chain reactions and activate the release of proinflammatory mediators such as neutrophils, which consequently increases the MPO activity [7].

Thus, oxidative stress and inflammation are conditions considered responsible for leading to the activation of molecular pathways that contribute to IBD pathogenesis [8]. In this study, increased oxidative stress was verified by the increased markers such as lipid peroxides, RS and MPO activity, besides the decreases of SOD and CAT activity in TNBS-induced colitis. These observations are in accordance with previous studies [39; 40; 7]. On the other hand, PCS treatment significantly protected the increase of TBARS, RS and protected the decrease of SOD and CAT activity in colon tissues of mice (Table 1). Data from literature confirm that the element selenium (Se) is well known for developing its biological activity as an integral part of several peroxidases and redox enzyme systems, which protect cells from oxidative stress [41]. These results demonstrate another effect of PCS that may contribute to reduce the oxidative stress and the infiltration of neutrophil, with leads to decreased damage to cells.

8. Conclusions

The treatment with PCS significantly reduced body weight loss, ameliorated histologic damage, improved colon morphology, improved levels of inflammatory markers and decreased oxidative stress caused by colitis in mice. These clinical findings by TNBS-induced colitis in mice reinforce the idea that the development of agents less aggressive and more effective is desirable as therapeutic options for uncontrolled intestinal inflammation. Results from this study suggest that PCS has an antioxidant and anti-inflammatory effect on TNBS-induced colitis, in addition, the compound studied could be a potential therapeutic treatment for IBD and other inflammatory diseases.

Acknowledgements:

The financial support by FAPERGS, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Ochsenkühn, T., D'haens, G., 2011. Current misunderstandings in the management of ulcerative colitis. *Gut*. 60, 1294-1299.
2. Podolsky, D.K., 2002. Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine*. 347, 417–429.
3. Atreya, R., Multer, J., Fintoo, S., Müllberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., et al., 2000. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med*. 6, 583–8.
4. Cario, E., Podolsky, Dk., 2000. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*. 68, 7010–7.
5. Fiocchi, C., 1998. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. 115, 182–205.
6. Rangan, U., Bulkley, G.B., 1993. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br. Med. Bull*. 49, 700–718.
7. Witaicenis, A., Luchini, A.C., Hiruma-Lima, C.A., Felisbino, S.L., Garrido-Mesa, N., Utrilla, P., Galvez, J., Di Stasi, L.C., 2012. Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylscutletin, a natural coumarin: comparison with prednisolone and sulphasalazine. *Chem. Biol. Interact*. 195, 76–85.
8. Zhu, H., Li, Y.R., 2012. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. *Exp. Biol. Med*. 37, 474 - 480.
9. Dothel, G., Vasina, V., Barbara, G., Ponti De Fabrizio., 2013. Animal models of chemically induced intestinal inflammation: Predictivity and ethical issues. *Pharmacology & Therapeutics*. 139, 71–86.
10. Nogueira, C.W., Rocha, J.B., 2011. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch. Toxicol*. 85, 1313–1359.
11. Nogueira CW, Quinhones EB, Jung EAC, Zeni G, Rocha JBT (2003) Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm Res* 52:56–63
12. Luchese C, Prigol M, Duarte MMMF, Nogueira CW (2012) Diphenyl diselenide reduces inflammation in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan: reduction of pro-inflammatory markers and reactive species levels. *Inflamm Res*.
13. Savegnago L, Jesse CR, Pinto LG, Rocha JBT, Nogueira CW (2007) Diphenyl diselenide attenuates acute thermal hyperalgesia and persistent inflammatory and neuropathic pain behavior in mice. *Brain Res* 1175:54–59

14. Hort MA, Stralioetto MR, Netto PM, da Rocha JBT, de Bem AF, Ribeiro-do-Valle RM (2011) Diphenyl diselenide effectively reduces atherosclerotic lesions in LDLr^{-/-} mice by attenuation of oxidative stress and inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol* 58:91–101
15. Rodrigues, O.E.D., Souza, D., Soares, L.C., Dornelles, L., Burrow, R. A., Appelt, H, R., Alves, C.F., Alves, D., Braga, A.L., 2010. Stereoselective synthesis of selenosteroids. *Tetrahedron Letters*. 51, 2237–2240.
16. Sari, M.H.M., Souza, A.C.G., Rosa, S.G., Souza, D., Rodrigues, O.E.D., Nogueira, C.W., 2014. Contribution of dopaminergic and adenosinergic systems in the antinociceptive effect of p-chloro-selenosteroid. *European Journal of Pharmacology*. 725, 79-86.
17. Victoria, C.R., Sassak, L.Y., Nunes, H.R.C., 2009. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. *Arq. Gastroenterol*. 46, 20-25.
18. Dou, W., Zhang J., Zhang, E., Sun, A., Ding, L., Chou, G., Wang Z., Mani, S., 2013. Chrysin Ameliorates Chemically Induced Colitis in the Mouse through Modulation of a PXR/NF-κB Signaling Pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 345, 473–482.
19. Zhao, W. et al. 2013. The possible mechanisms of Picrasma quassiodes (D. Don) Benn in the treatment of colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 145, 424–430.
20. Hyam, S.R., Jang, Se-Eun., Jeong, Jin-Ju., Joh, Eun-Ha., Han, M.J., Kim, Dong-Hyun., 2013. Echinocystic acid, a metabolite of lancemaside A, inhibits TNBS-induced colitis in mice. *International Immunopharmacology*. 15, 433–441.
21. Schmidt, N., Gonzalez, E., Visekruna, A., Kühl, A.A., Loddenkemper, C., Mollenkopf, H., Kaufmann, S.H., Steinhoff, U., Joeris, T., 2010. Targeting the proteasome: partial inhibition of the proteasome by bortezomib or deletion of the immunosubunit LMP7 attenuates experimental colitis. *Gut*. 59, 896-906.
22. Grisham, M.B., Hernandez, L.A., Granger, D.N., 1986. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol*. 251, 567-574.
23. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*. 95, 351–358.
24. Loetchutinat, C., Kothan, S., Dechsupa, S., Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J., Mankhetkorn, S., 2005. Spectro fluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 20,70-dichloro fluorescein diacetate assay. *Radiat Phys Chem*. 72, 323 –331.
25. Kostyuk, V.A., Potapovich, A.I., 1989. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochem Int*. 19, 1117–1124.
26. Aebi, H. 1984. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol*. 105, 121–126.
27. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein–dye binding. *Anal. Biochem*. 72, 248–254.

28. Chen, Qian-Qian., Yan, L., Wang, Chang-Zheng., Wang, Wei-Hua., Shi, H., Su, Bin-Bin., Zeng, Qing-Huan., Du, Hai-Tao., Wan, Jun., 2013. Mesenchymal stem cells alleviate TNBS-induced colitis by modulating inflammatory and autoimmune responses. *World J Gastroenterol.* 29, 4702-4717.
29. Zhao, H-M., Huang, X-Y., Zuo, Z-Q., Pan, Q-H., Ao, M-Y., Zhou, F., Liu, H-N., Liu, Z-Y., Liu, D-Y., 2013. Probiotics increase T regulatory cells and reduce severity of experimental colitis in mice. *World J Gastroenterol.* 19, 742-749.
30. Marchioni, B.R., Kane, S., 2014. Current approaches to the management of new-onset ulcerative colitis. *Clin Exp Gastroenterol.* 7, 111–32.
31. Neurath, M., Fuss, I., Strober, W., 2000. TNBS-colitis. *Int. Rev. Immunol.* 19, 51–62.
32. Sobczak, M., Fabisiak, A., Murawska, N., Wesolowska, E., Wierzbicka, P., Wlazlowski, M., et al. 2014. Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases. *Pharmacol Rep.* 66, 766.
33. Ko, .JK., Auyeung, K.K., 2014. Inflammatory bowel disease: etiology, pathogenesis and current therapy. *Curr Pharm Des.* 20, 1082.
34. Adcock, I.M., 2004. Corticosteroids: limitations and future prospects for treatment of severe inflammatory disease. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies | Inflammatory and musculoskeletal diseases.* 1, 321-328.
35. Pithadia, A.B., Jain, S., 2011. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacological reports.* 63, 629-642.
36. He, J., Lianga, J., Zhua, S., Li, J., Zhang, Y., Sun, W., 2011. Anti-inflammatory effects of Pulvis Fellis Suis extract in mice with ulcerative Colitis. *Journal of Ethnopharmacology.* 138, 53– 59.
37. Eiserich, J.P., Hristova, M., Cross, C.E., Jones, A.D., Freeman, B.A., Halliwell, B., Van Der Vliet, A., 1998. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature.* 391, 393–397.
38. Arab, H.H., Salama, A.S., Eid, A.H., Omar, H.A., Arafa, El-S.A., Maghrabi, I.A., 2014. Camel's milk ameliorates TNBS-induced colitis in rats via downregulation of inflammatory cytokines and oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology.* 69, 294–302.
39. Southey, A., Tanaka, S., Murakami, T., Miyoshi, H., Ishizuka, T., Sugiura, M., Kawashima, K., Sugita, T., 1997. Pathophysiological role of nitric oxide in rat experimental colitis. *Int. J. Immunopharmacol.* 19, 669–676.
40. Zhou, Y.H., Yu, J.P., Liu, Y.F., Teng, X.J., Ming, M., Lv, P., An, P., Liu, S.Q., Yu, H.G., 2006. Effects of Ginkgo biloba extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF α , NF-kappaBp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. *Mediators Inflamm.* 2006, 92642.
41. Papp, L.V., et al. 2007. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal.* 9, 775–806.

Figures and captions:

Figure 1

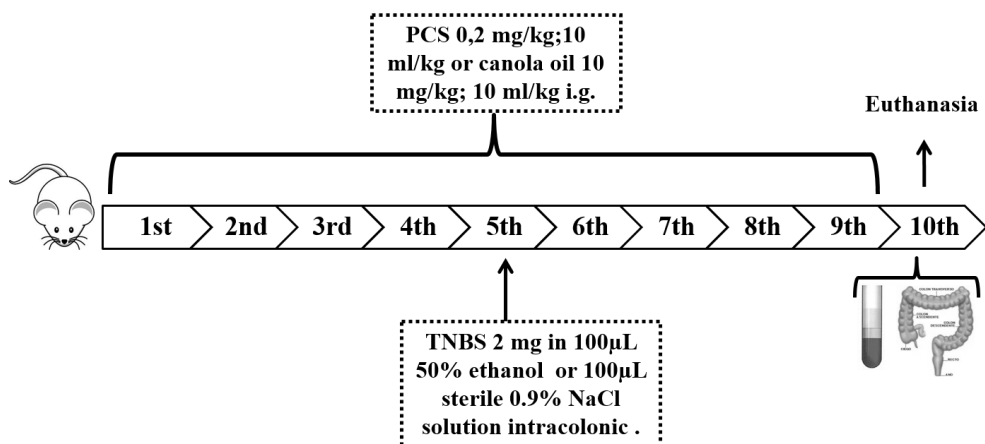


Figure 1. Representation of the Experimental Design.

Figure 2A

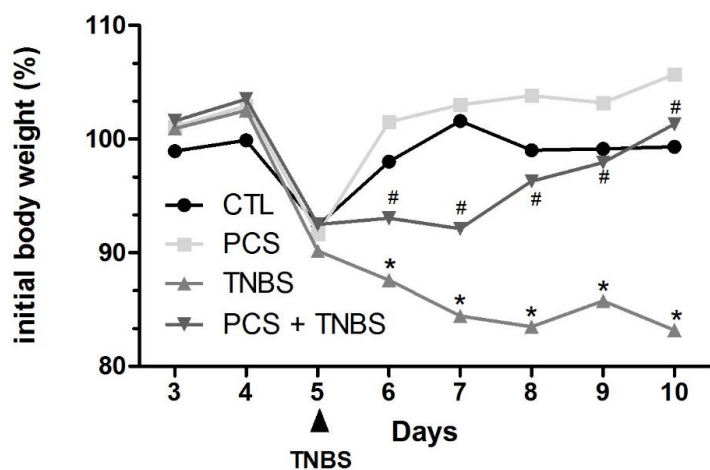


Figure 2B

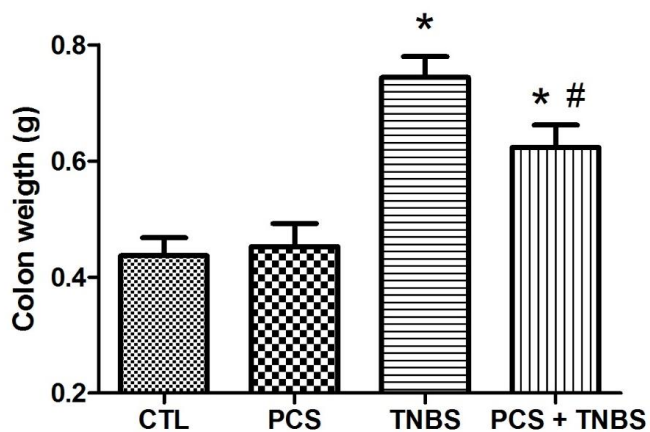


Figure 2C

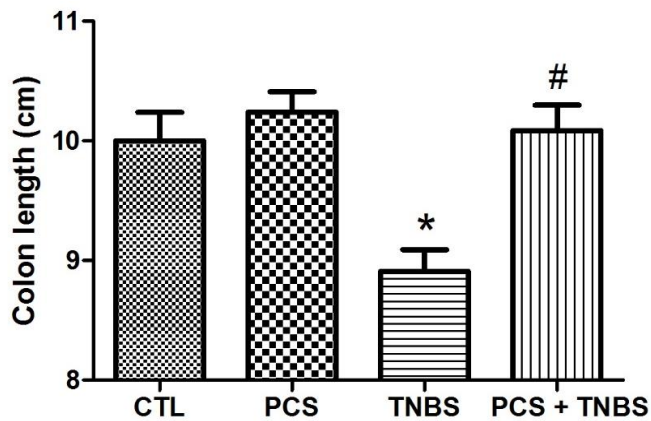


Figure 2D

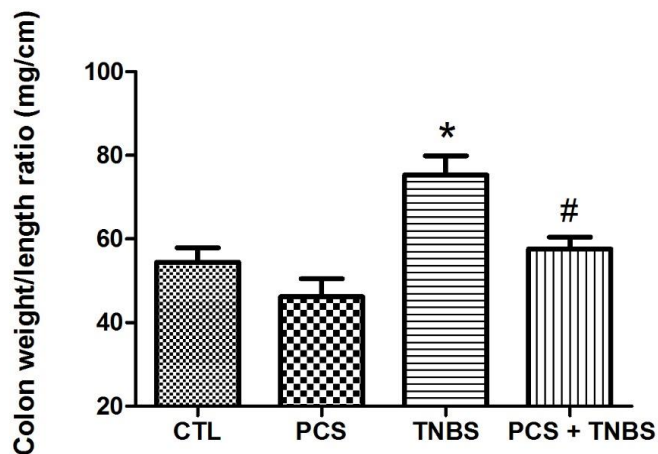


Figure 2. Systemic treatment with PCS is able to ameliorate the clinical signs of TNBS-induced colitis. The Initial Body Weight (**A**), Colonic weight (**B**), colonic lengths (**C**), and colon weight/length ratio (**D**) in TNBS-induced in mice. Data are reported as mean \pm Error Initial Body Weight and for others mean \pm S.D. * Compared to the control group (CTL); # compared to the TNBS group (group 3) ($P < 0.05$ -one-way analysis of variance/Newman Keuls).

Figure 3A

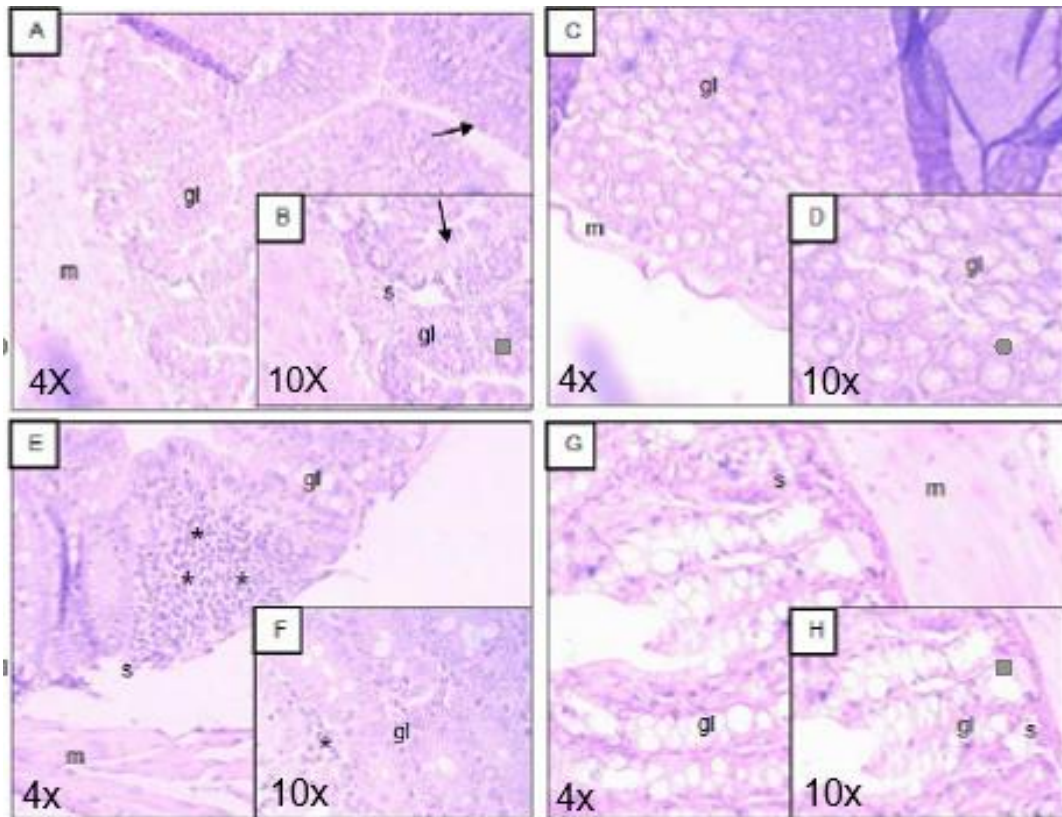


Figure 3B

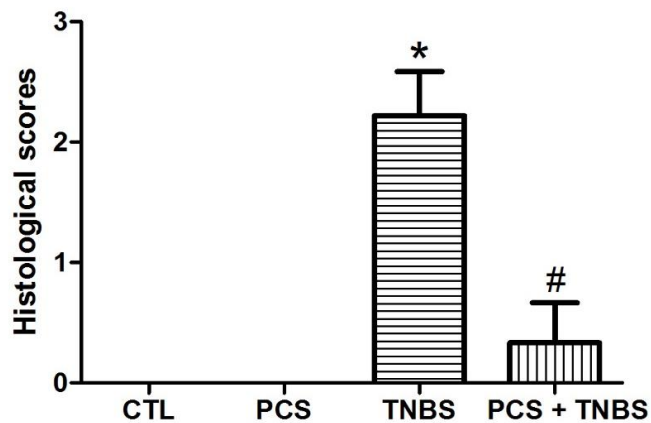


Figure 3. PCS improved histological of TNBS-induced colitis in mice **(A)**. Photomicrography of transverse section of a segment of large colon of mice. (A, B) an animal control, tissue in normal aspect; (C,D) an PCS treated-group showed aspect similar to the control group. (E,F) an TNBS treated-group. Note the intense inflammatory process (*), (G,H) an PCS + TNBS treated-group. Observe the absence

of the inflammatory process. Haematoxylin and Eosin. 4x and 10x, respectively. Histological score (**B**). Significant difference when $p < 0.05$.

Figura 4A

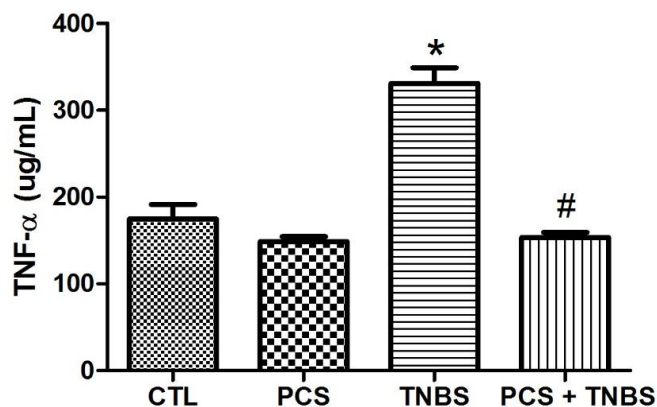


Figura 4B

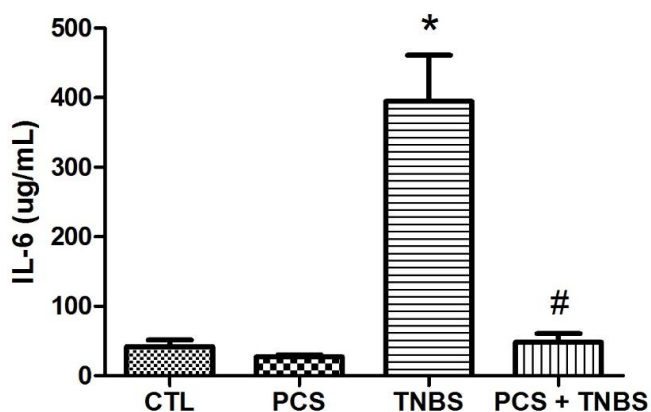


Figure 4. PCS reduced the production of TNF- α and IL-6 in the Inflamed Colon. TNF- α (**A**) and IL-6 (**B**) levels in TNBS-induced in mice. Data are reported as mean \pm S.D.

* Compared to the control group (CTL); # compared to the TNBS group (group 3) (P

Figure 5

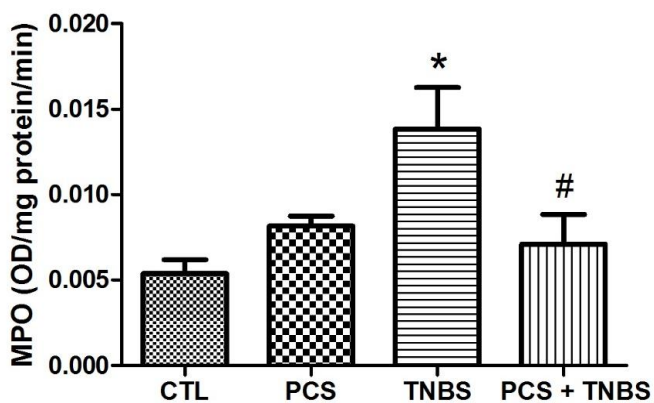


Figure 5. PCS decreased the activity of MPO in the TNBS-induced colitis in mice. Data are reported as mean \pm S.D. * Compared to the control group (CTL); # compared to the TNBS group (group 3) ($P < 0.05$ -one-way analysis of variance/Newman Keuls).

Figura 6

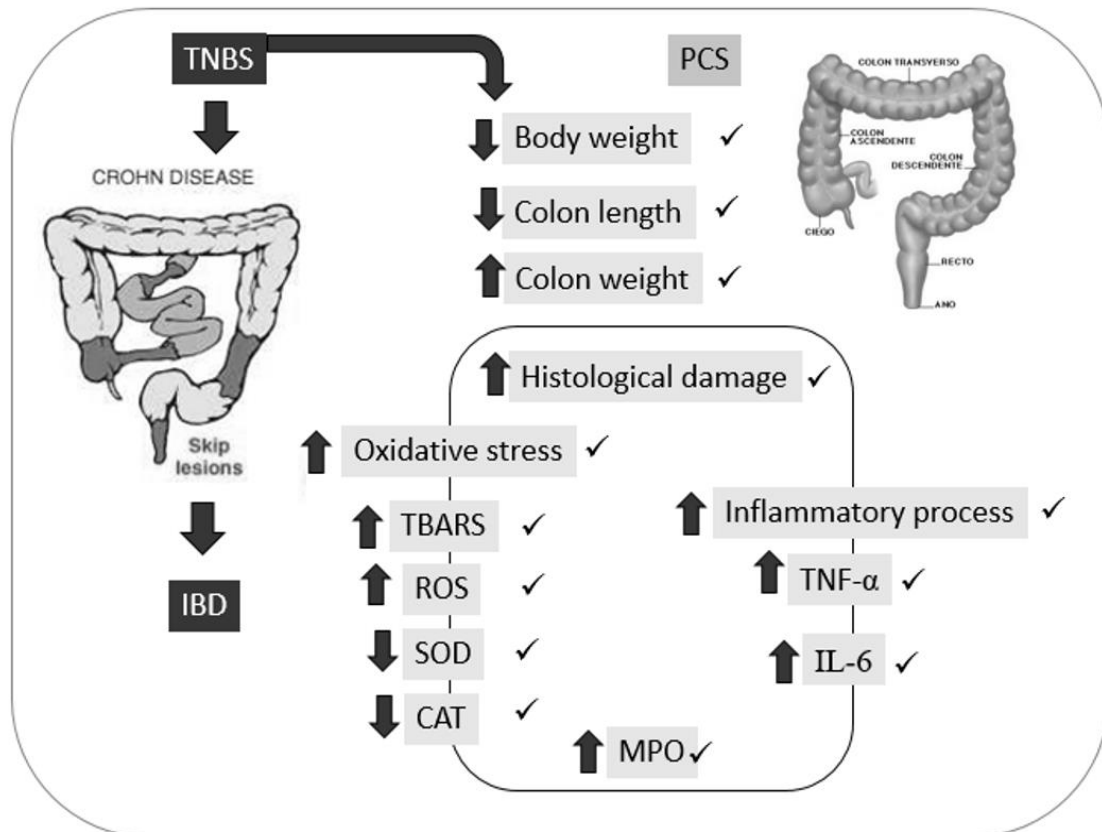


Figure 6. The mechanism by which PCS prevents experimental model of inflammatory bowel diseases in mice.

Tables

Table 1. Effect of the treatment with PCS on oxidative stress and antioxidant defense in TNBS-induced colitis in mice.

Groups	CAT	SOD	TBARS	ROS
Control	11,3 ± 3,01	28,4 ± 2,07	37,7 ± 7,52	8,34 ± 5,32
PCS	10,9 ± 2,52	23,8 ± 5,67	42,8 ± 10,39	9,28 ± 4,85
TNBS	10,8 ± 3,45 *	17,7 ± 7,09 *	52,8 ± 10,84 *	16,7 ± 5,81 *
TNBS + PCS	12,7 ± 4,39 #	26,9 ± 4,68 #	39,1 ± 7,93 #	6,42 ± 4,16 #

CAT activity (results are expressed as U. mg⁻¹ of protein); SOD activity (results are expressed as U. mg⁻¹ of protein); RS levels (results are expressed as UF). TBARS levels (results are expressed as nmol MDA/ mg protein). Data are reported as mean ± S.D. * Compared to the control group (CTL); # compared to the TNBS group (group 3) (P < 0.05-one-way analysis of variance/Newman Keuls).

CONCLUSÃO

O tratamento com PCS reduziu significativamente a perda de peso corporal, obteve uma melhora no dano histológico, melhorou os parâmetros morfológicos de dano no cólon, restaurou os níveis de marcadores inflamatórios e diminuiu o estresse oxidativo causado pela colite em camundongos. Os resultados deste estudo sugerem que o PCS obteve um efeito anti-inflamatório e anti-oxidante em um modelo de DII induzida por TNBS, em adição, o composto estudado poderá ter potencial terapêutico para o tratamento de DII e outras doenças inflamatórias.

9. PERSPECTIVAS

- Estender a abrangência deste estudo de modo a avaliar as possíveis alterações em outras possíveis causas das DII, como fatores microbianos

- Avaliar o efeito do *p*-cloro-fenil-seleno-esterol em outros modelos de inflamação como, bem como a indução de colite por outras diferentes drogas, outros modelos que mimetizam as DII.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, C.; CHO, J.H. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 19:2066–2078, 2009.
- ABREU M.T., The pathogenesis of inflammatory bowel disease: translational implications for clinicians, *Curr. Gastroenterol. Rep.* 4 (6):481–489, 2002.
- ALARCON-NAVARRO, M., MARTINEZ, M.C.L. Essentiality of selenium in the human body: relationship with diferente diseases. *Sci. Total Environ. Shannon.* 249:347-71, 2000.
- ALEX, P., ZACHOS, N.C., NGUYEN, T., GONZALES, L., CHEN, T.E., CONKLIN, L.S., CENTOLA, M., LI, X.H. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis, *Inflamm. Bowel Dis.* 15 (3):341–352, 2009.
- ALI,H., WEIGMANN, B., NEURATH, M.F., COLLNOT, E.M., WINDBERGS, M., LEHR, C.-M. Budesonide loaded nanoparticleswith pH-sensitive coating for improved mucosal targeting in mouse models of inflammatory bowel diseases. *Journal of Controlled Release* 183: 167–177, 2014.
- ATREYA, R., MULTER, J., FINTOO, S., MÜLLBERG, J., JOSTOCK, T., WIRTZ, S., et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med.* 6:583–8, 2000.
- AYAZ, M., CELIK, H.A., AYDIN, H.H., TURAN, B. Sodium selenite protects against diabetes-induced alterations in the antioxidant defense system of the liver. *Diabetes Metab Res Rev* 22: 295-299, 2006.
- BAUMGART, D.C., CARDING, S.R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet.* 369: 1627-1640, 2007.
- BAUMGART, D.C., SANDBORN, W.J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet.* 369: 1641-1657, 2007.
- BEGUE, B., H.WAJANT, J.C., BAMBOU, L., DUBUQUOY, D., SIEGMUND, J.F., BAEULIEU, D. CANIONI, D. BERREBI, et al., Implication of TNF-related apoptosis-inducing ligand in inflammatory intestinal epithelial lesions, *Gastroenterology* 130 (7)1962–1974, 2006.
- BLUMBERG, R. S., L. J. SAUBERMANN, W. STROBER Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Immunology* 11(6): 648-656, 1999.
- BOUMA, G., W. STROBER. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 3(7): 521-533, 2003.

BRUMATTI, L. V., MARCUZZI, A., TRICARICO, P. M., ZANIN, V., GIRARDELLI, M., BIANCO A. M. Curcumin and Inflammatory Bowel Disease: Potential and Limits of Innovative Treatments. *Molecules*. 19:21127-21153, 2014.

BURK, R. F., HILL, K. E. Selenoprotein P. An extra cellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu. Ver. Nutr.* 25:215-35, 2005.

CARIO, E., PODOLSKY, DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun.* 68:7010–7, 2000.

CASTRO, M.W. Selenio en los pacientes críticos con respuesta inflamatoria sistémica: Revisión. *Nutrición Hospitalaria*. 22(3): 295-306, 2007.

CHAMBRUN, G.P. DE, L. PEYRIN-BIROULET, M., LEMANN, J.F., COLOMBEL. Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7 (1): 15–29, 2010.

COSNES J, GOWER-ROUSSEAU C, SEKSIK P, et al. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 140:1785–1794, 2011.

COSTA, E. DE A. Manual de fisiopatologia e nutrição. 4 edição. Petrópolis, RJ: Vozes, 2009.

DAVIS, C.D., UTHUS, E. O. Dietary selenite and azadeoxy-cytidine treatments affect dimethylhydrazine-induced aberrant crypt formation in rat colon and DNA methylation in HT-29 cells. *J. Nutr.* 132:292-7, 2002.

DEPOORTERE, I., VAN, ASSCHE, G., THIJIS, T., GEBOES, K., PEETERS, T.L. Differential changes in ACh-, motilin-, substance P-, and K+-induced contractility in rabbit colitis. *Am J Physiol.* 1999.

DOTHEL, G., VASINA, V., BARBARA, G., PONTI DE FABRIZIO. Animal models of chemically induced intestinal inflammation: Predictivity and ethical issues. *Pharmacology & Therapeutics*. 139:71–86, 2013.

DOU, W., ZHANG J., ZHANG, E., SUN, A., DING, L., CHOU, G., WANG Z., MANI, S. Chrysin Ameliorates Chemically Induced Colitis in the Mouse through Modulation of a PXR/NF- κ B Signaling Pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 345:473–482, 2013.

ELSON, C.O., BEAGLEY, K.W., SHARMANOV, A.T., et al. Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance. *J Immunol.* 157: 2174–85, 1996.

ELSON, C.O., SARTOR, R.B., TENNYSON, G.S., RIDDELL, R.H. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1995; 109:1344-1367.

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. 115: 182–205, 1998.

- FLOHE, R. B. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Rad. Biol. Med.* 27:951-65, 1999.
- FRANCO, M. et. al. *Patologia: processos gerais*. São Paulo: Atheneu Editora, 2010.
- GAUDIO, E., G. TADDEI, A. VETUSCHI, R. SFERA, S. VISCONTI, G. RICCIARDI, R. CAPRILLI Dextran sulphate sodium (DSS) colitis in rats: A clinical, structural and ultrastructural aspects. *Gastroenterology* 114: A983, 1998.
- GUYTON, A. C. Cap. 30, pg 397-412. (in) *Fisiologia humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- GUYTON, A. C., HALL, J. E. *Gastrintestinal physiology*. In: (Ed.). *Textbook of medical physiology*. Philadelphia: Elsevier Saunders, *Gastrintestinal physiology*, p.665-676, 2005.
- HAANEN, C., VERMES, I. Apoptosis and inflammation. *Mediators of inflammation*. 4(1):5-15, 1995.
- HANAUER S.B., *Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities*, *Inflamm. Bowel Dis.* 12 (1): S3–S9, 2006.
- HATFIELD, D.L., TSUJI, P.A., CARLSON, B.A., GLADYSHEV, V.N. Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. *Trends Biochem Sci.* 39(3):112–20, 2014.
- HIBI T, OGATA H, SAKURABA A. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.*37:409-417, 2002.
- HOLBEN, D. H., SMITH, A. M. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J. Am. Diet. Assoc.* 99: 836-43, 1999.
- HUANG, Z., ZUO, L., ZHANG, Z., LIU, J., CHEN, J., DONG, L., ZHANG, J. 3,30-Diindolylmethane decreases VCAM-1 expression and alleviates experimental colitis via a BRCA1-dependent antioxidant pathway. *Free Radic. Biol. Med.* 50:228–236, 2011.
- JURJUS, A.R., KHOURY, N.N., REIMUND, J.M. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 50:81-92, 2004.
- KAJIURA T, TAKEDA T, SAKATA S, et al. Change of intestinal microbiota with elemental diet and its impact on therapeutic effects in a murine model of chronic colitis. *Dig Dis Sci.* 54:1892–1900, 2009.
- KARTTUNNEN, R., BREESE, E.J., WALKER-SMITH, J.A., MACDONALD, T.T. Decreased mucosal interleukin-4 (IL-4) production in gut inflammation, *J. Clin. Pathol.* 47 (11):1015–1018, 1994.
- KRÁLOVÁ, V., BENEŠOVÁ, S., CERVINKA, M., RUDOLF, E. Selenite induced apoptosis and autophagy in colon cancer cells. *Toxicol In Vitro* 26: 258-268, 2012.

KRAWISZ, J.E., SHARON, P., STENSON, W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity — assessment of inflammation in rat and hamster models, *Gastroenterology* 87 (6) 1344–1350, 1984.

LAMPRECHT, A., Multiparticulate systems in the treatment of inflammatory bowel disease, *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 2 (2):137–144, 2003.

LEVY, J. H. The human inflammatory response. *J Cardiovasc Pharmacol*, 27:S31-7, 1996.

LICHTENSTEIN, G.R., SBREU, M.T., COHEN, R., TREMAINE, W. American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease], *Rev. Gastroenterol. Mex.* 71 (3):351–401, 2006

LUCHESE, C., PRIGOL, M. DUARTE, M. M. M. F. NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide reduces inflammation in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan: reduction of pro-inflammatory markers and reactive species levels. *Inflamm. Res.* 61:1117–1124, 2012.

MACDONALD, T. T. E MONTELEONE, G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, v.307, n.5717, 25: 1920-5,2005.

MAUL, J., ZEITZ, M. Ulcerative colitis: immune function, tissue fibrosis and current therapeutic considerations. *Langenbecks Arch Surg.* 397: 1-10, 2012.

MAY, S.W. Selenium-based pharmacological agents: an up date. *Exp Opin Invest Drugs* 11: 1261–1269, 2002.

MERTZ, W. Risk assessment of essential trace elements: new approaches to setting recommended dietary allowances and safety limits. *Nutr. Rev.* 53(7):179-85, 1995.

MOLODECKY NA, SOON IS, RABI DM, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology.* 142:46–54, 2012.

MORRIS, G.P., BECK, P.L., HERRIDGE, M.S., DEPEW, W.T., SZEWCZUK, M.R., WALLACE, J.L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology.* 96(3):795–803, 1989.

NEUTRA, M. R.; N. J. MANTIS E J. P. KRAEHENBUHL. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol*, v.2, n.11, Nov, p.1004-9. 2001. Macdonald, T. T. e G. Monteleone. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, v.307, n.5717, 25:1920-5, 2005.

NIESSNER, M., VOLK, B.A., Phenotypic and immunoregulatory analysis of intestinal T-cells in patients with inflammatory bowel-disease — evaluation of an in-vitro model, *Eur. J. Clin. Invest.* 25 (3) 155–164, 1995.

NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch. Toxicol.* 85:1313–1359, 2011.

NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B., Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch. Toxicol.* 85:1313–1359, 2011.

OCHSENKÜHN, T., D'HAENS, G. Current misunderstandings in the management of ulcerative colitis. *Gut.* 60:1294-1299, 2011.

ODZE R., Diagnostic problems and advances in inflammatory bowel disease, *Mod. Pathol.* 16 (4):347–358, 2003.

ORTUNO, J. et al. Importancia nutricional del selênio. *Arch. Latinoam. Nutr. Caracas.* 47(1)6-13, 1997.

PAPP, L.V. et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal.* 9: 775–806, 2007.

PECCHI, E., DALLAPORTA, M., JEAN, A., THIRION, S., TROADEC, J.D. Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. *Physiology and Behavior.* 97:279–292, 2009.

PODOLSKY, D.K. Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine.* 347:417–429, 2002.

RANG & DALE. *Farmacologia. Sessão 3, Fármacos que afetam os grandes sistemas orgânicos.* pg. 395-396. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RANGAN, U., BULKLEY, G.B. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br. Med. Bull.* 49:700–718, 1993.

RENATO, D., PASSOS, M. DO C. F. *Gastroenterologia essencial.* 4 Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

REZAIE, A., PARKER, R.D. & ABDOLLAHI, M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Dig Dis Sci* 52:2015-2021, 2007.

ROBBINS E COTRAN, *bases patológicas das doenças.* Rio de Janeiro: Elsevier, Cap 17: O trato Gastrointestinal, pg 815-821, 2010.

RODRIGUES, O.E.D., DE SOUZA, D., SOARES, L.C., DORNELLES, L., BURROW, R.A., APPELT, H.R., ALVES, C.F., ALVES, D., BRAGA, A.L. Stereoselective synthesis of selenosteroids. *Tetrahedron Lett.* 51:2237–2240, 2010.

SANDS, B.E. Inflammatory bowel disease: past, present and future. *J. gastroenterol.*42:16, 2007.

SARI, M.H.M., et al. Contribution of dopaminergic and adenosinergic systems in the antinociceptive effect of p-chloro-selenosteroid. *European Journal of Pharmacology.* 725:79-86, 2014.

SARI, M.H.M., SOUZA, A.C.G., ROSA, S.G., SOUZA, D., RODRIGUES, O.E.D., NOGUEIRA, C.W. Contribution of dopaminergic and adenosinergic systems in the

antinociceptive effect of p-chloro-selenosteroid. *European Journal of Pharmacology*. 725:79-86, 2014.

SHARMA, J. N., BUCHANAN. W. W. Pathogenic responses of bradykinin system in chronic inflammatory rheumatoid disease. *Exp Toxicol Pathol*, v.46, n.6, Dec, p.421-33. 1994.

STROBER, W., FUSS, I., MANNON, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*, 117:514-21, 2007.

TALERO, E., SANCHEZ-FIDALGO, S., ALARCONDELA LASTRA, C., ILANES, M., CALVO, J.R., MOTILVA, V. Acute and chronic responses associated with adrenomedullin administration in experimental colitis. *Peptides* 29:2001–2012, 2008.

THOMSON, C.D. Selenium: Its role in health and disease. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 15(3):25-30, 2006.

TIROSH, O., LEVY, E., REIFEN, R. High selenium diet protects against TNBS-induced acute inflammation, mitochondrial dysfunction, and secondary necrosis in rat colon. *Nutrition* 23: 878–886, 2007.

WEISS, U. Inflammation. *Nature*. 420(6917):845-845, 2002.

WILSON J, HAIR C, KNIGHT R, et al. High incidence of inflammatory bowel disease in Australia: a prospective population-based Australian incidence study. *Inflamm Bowel Dis*. 16:1550–1556, 2010.

WITAICENIS, A., LUCHINI, A.C., HIRUMA-LIMA, C.A., FELISBINO, S.L., GARRIDOMESA, N., UTRILLA, P., GALVEZ, J., DI STASI, L.C. Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylscutletin, a natural coumarin: comparison with prednisolone and sulphasalazine. *Chem. Biol. Interact*. 195:76–85, 2012.

XAVIER, R. J., D. K. PODOLSKY. Unravelling the pathogenesis of inflammatory tbowel disease. *Nature* 448(7152): 427-434, 2007.

XIA, Y., ZWEIER, J.L. Measurement of myeloperoxidase in leukocyte-containing tissues, *Anal. Biochem*. 245 (1) 93–96, 1997.

YAMADA, Y., MARSHALL, S., SPECIAN, R.D., GRISHAM, M.B. A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology*. 102:1524-1534, 1992.

YANG, Y., LUO, H., HUI, K., CI, Y., SHI, K, CHEN, G., SHI, L., XU, C. Selenite-induced autophagy antagonizes apoptosis in colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Oncology Reports* 35: 1255-1264, 2016

ZHU, H., LI, Y.R. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. *Exp. Biol. Med*. 37:474 - 480, 2012.

ANEXO A- Protocolo de aprovação do projeto pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA)-UNIPAMPA)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: **022/2014**

Título: **Investigação da atividade anti-inflamatória e anti-oxidante do composto do p-cloro-fenilselenoesterol no modelo de colite aguda induzida por TNBS em camundongos C57BL/6**

Data da aprovação: **01/07/2014**

Período de vigência do projeto: De: **07/2014** Até: **07/2017**

Pesquisador: **MARINA PRIGOL**

Campus: **ITAQUI**

Telefone: **(55) 3433-1669**

E-mail: **marinaprigol@yahoo.com.br**

Digitally signed by ALESSANDRA SAYURI KIKUCHI TAMAJUSUKU
NEIS:98256009004
DN: cn=ALESSANDRA SAYURI KIKUCHI TAMAJUSUKU
NEIS:98256009004, c=BR, o=ICP-Brasil, ou=RFB e-CPF A3, email=alessandratamajusuku@unipampa.edu.br

Professor Adjunto
Coordenadora da CEUA/UNIPAMPA