



# UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICO-CIRÚRGICAS

ADRYANO GONÇALVES MARQUES

EFEITO DE UM BIOPOLÍMERO, GOMA DO CAJUEIRO, NA COLITE INDUZIDA  
POR ÁCIDO TRINITROBENZENOSSULFÔNICO EM RATOS

FORTALEZA

2019

ADRYANO GONÇALVES MARQUES

EFEITO DE UM BIOPOLÍMERO, GOMA DO CAJUEIRO, NA COLITE INDUZIDA  
POR ÁCIDO TRINITROBENZENOSSULFÔNICO EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia. Área de Concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia Celular no Estresse.

Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique  
Loiola Ponte de Souza.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M315e Marques, Adryano Gonçalves.

EFEITO DE UM BIOPOLÍMERO, GOMA DO CAJUEIRO, NA COLITE INDUZIDA POR  
ÁCIDO TRINITROBENZENOSSULFÔNICO EM RATOS / Adryano Gonçalves Marques. –  
2019.

82 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, 1, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza.

1. Goma do cajueiro. 2. Colite experimental. 3. Inflamação. 4. Biopolímero. 5. Anacardium  
occidentale. I. Título.

CDD

---

ADRYANO GONÇALVES MARQUES

EFEITO DE UM BIOPOLÍMERO, GOMA DO CAJUEIRO, NA COLITE INDUZIDA  
POR ÁCIDO TRINITROBENZENOSSULFÔNICO EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia. Área de Concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia Celular no Estresse.

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza  
Universidade Federal do Ceará – UFC (Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Sthela Maria Murad Regadas  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Dr. Lucas Duarte Nicolau  
Membro externo ao programa

A **Deus**, por me possibilitar estar aqui realizando esse sonho.

Aos meus pais, **Itamar** e **Elízia**, pelo amor incondicional, por sempre me apoiarem e por terem feito todos os sacrifícios possíveis para eu alcançar minha felicidade.

Ao meu irmão **Vinícius**, cuja amizade e palavras de fé sempre me iluminam.

A minha esposa **Aline** e meus filhos **Isabelle** e **Gael**, pelo suporte nos momentos difíceis e por todo amor que norteia minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza, pelo incentivo e apoio em todas as fases desse trabalho. Seu entusiasmo pela pesquisa científica foi uma inspiração para que eu pudesse concretizar essa etapa da minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues (*in memoriam*), por ter me instigado a começar o mestrado, pelo exemplo de profissional e ser humano que deixou para todos e pela honra de gozar de sua amizade. Sua ausência física com certeza é muito sentida, mas seu legado e seus ensinamentos jamais serão esquecidos.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, coordenador do programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aos amigos Lucas e Humberto. Tenho absoluta convicção que sem vocês meu caminho para chegar até aqui seria muito mais longo e árduo. Dificilmente conseguirei retribuir toda a ajuda que me deram nesse trabalho, mas tentarei sempre que for possível.

Aos Profs. Drs. Pedro Marcos Soares e André Luiz dos Reis Barbosa, pela disponibilidade em transmitir suas experiências acadêmicas e por sua contribuição fundamental em várias etapas do experimento.

Aos acadêmicos Gerlano e Eugênio, por sua ajuda no manejo dos animais e durante boa parte do trabalho. Vocês literalmente deram o sangue pra me ajudar.

Ao Seu Bento, que com seu sorriso largo e sincero foi sempre muito solícito às minhas solicitações de animais no biotério.

Ao técnico Junyor, pela ajuda na confecção das lâminas.

A todos os membros do LEFFAG, pelo carinho com que me receberam em seu laboratório e pelo compartilhamento do conhecimento.

Às secretárias, Magda e Luciene, pela sua disponibilidade no apoio aos alunos da Pós-graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da UFC.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” (Madre Teresa de Calcutá)

“Um passo à frente e você não está mais no mesmo lugar.” (Chico Science)

## RESUMO

**Efeito de um biopolímero, goma do cajueiro, na colite induzida por ácido trinitrobenzenossulfônico em ratos.** Adryano Gonçalves Marques. Pós-Graduação Stricto Sensu de Ciências Médico-Cirúrgicas, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (Tese de mestrado). Abril, 2019. Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza.

As doenças inflamatórias intestinais (DII) englobam um grupo de enfermidades caracterizadas pela desregulação da resposta imune do trato digestivo à microbiota intestinal em indivíduos suscetíveis, levando a um processo inflamatório crônico e recorrente. Tem como principais representantes a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU). Atualmente o tratamento das DIIs é definido de forma individualizada, entretanto os medicamentos usados atualmente ainda estão associados a efeitos colaterais relevantes e a um alto custo econômico. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da goma do cajueiro (GC), um biopolímero natural obtido da casca da árvore do Nordeste brasileiro (*Anacardium occidentale L.*), na colite induzida por ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) em ratos. O estudo experimental foi realizada em duas etapas. Inicialmente foi avaliado o impacto da GC a 10% na barreira mucosa colônica de ratos 7 dias após a indução de colite pelo TNBS ou após aplicação de solução salina a 0,9%. Para tal, amostras colônicas de ratos foram montadas em câmaras Üssing para avaliar a permeabilidade à fluoresceína. Na segunda etapa foi testado o efeito anti-inflamatório da GC a 10%, aplicando-a na forma de enema retal nas doses de 10 mg/Kg e 30 mg/Kg, durante 7 dias em animais com colite induzida pelo TNBS. Foi observado um efeito de barreira após aplicação da GC a 10%, constatado pela diminuição significativa ( $p: 0,04$ ) da permeabilidade no minuto 90 em animais no 7º dia após a indução colite ( $33,84 \pm 9,576$  IF), quando comparada à permeabilidade basal ( $92,87 \pm 29,60$  IF). Todos os parâmetros inflamatórios avaliados (escore de aderências intra-abdominais, avaliação do peso úmido, escores inflamatórios macroscópicos e microscópicos, e dosagem da mieloperoxidase) se mantiveram alterados após 7 dias de tratamento com enema de GC a 10%, indicando ausência de ação anti-inflamatória significativa em ambas as doses testadas. A partir desse resultado podemos concluir que a goma do cajueiro, apresenta um efeito de barreira *in vitro* em animais com colite induzida pelo TNBS semelhante ao exercido

pela barreira mucosa intestinal. No entanto, não houve ação anti-inflamatória *in vivo* no mesmo modelo de colite experimental.

**Palavras-chave:** *Anacardium occidentale*, biopolímero, inflamação, colite, goma do cajueiro.

## ABSTRACT

**Effect of a biopolymer, cashew gum, on trinitrobenzenesulfonic acid induced colitis in rats.** Adryano Gonçalves Marques. A Stricto Sensu Master of Medical-Surgical Sciences, Faculty of Medicine of the Federal University of Ceará (Master's thesis). April, 2019. Advisor: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza.

Inflammatory bowel diseases (IBDs) encompass a group of diseases characterized by dysregulation of the immune response of the digestive tract to normal intestinal flora in susceptible individuals, leading to a chronic and recurrent inflammatory process. Its main representatives are Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Currently the treatment of IBDs is defined in an individualized way, however the drugs currently used are still associated with relevant side effects and a high economic cost. The objective of this study was to evaluate the effect of cashew gum (CG), a natural biopolymer obtained from the bark of the Brazilian Northeast (*Anacardium occidentale* L.) on trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) induced colitis in rats. The experimental study was performed in two stages. Initially, the impact of CG at 10% on colonic mucosal barrier of rats was evaluated 7 days after induction of colitis by TNBS or after application of saline solution (0.9%). For this purpose, colonic samples from rats were mounted in Üssing chambers to evaluate the permeability to fluorescein. In the second stage, the anti-inflammatory effect of the CG 10% was tested, applying it as a rectal enema at doses of 10 mg/Kg and 30 mg/Kg for 7 days in animals with TNBS-induced colitis. A barrier effect was observed after application of CG 10%, evidenced by a significant decrease ( $p: 0.04$ ) in permeability at minute 90 in animals on the 7th day after induction of colitis ( $33.84 \pm 9,576$  RFI), when compared to baseline permeability ( $92.87 \pm 29.60$  RFI). All the inflammatory parameters evaluated (intra-abdominal adhesion score, wet weight evaluation, macroscopic and microscopic inflammatory scores, and myeloperoxidase dosage) remained altered after 7 days of treatment with a CG 10% enema, indicating no significant anti-inflammatory action in both doses. From this result we can conclude that cashew gum has an *in vitro* barrier effect in animals with TNBS induced colitis similar to that exerted by the intestinal mucosal barrier. However, there was no *in vivo* anti-inflammatory action in the same model of experimental colitis.

**Key words:** *Anacardium occidentale*, biopolymer, inflammation, colitis, cashew gum.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Incidência e prevalência combinadas para DC .....	18
Figura 2 - Incidência e prevalência combinadas para RCU .....	19
Figura 3 – Componentes da barreira mucosa no intestino saudável e na DII .....	22
Figura 4 – Composição química da goma do cajueiro .....	28
Figura 5 – Resina extraída do troco do cajueiro (A e B), Goma do Cajueiro após purificação (C) e representação da estrutura química da goma do cajueiro (D) .....	32
Figura 6 – (A) Extração e preparo de segmento colônico para aposição na minicâmara montada com um adaptador cujo orifício mede 0,017 cm <sup>2</sup> . (B) Câmara de Üssing e suas ferramentas de funcionamento .....	35
Figura 7 – Esquematização do experimento para avaliação da permeabilidade transepitelial à fluoresceína, antes e após a adição da goma do cajueiro .....	37
Figura 8 – Indução da colite pelo TNBS em ratos e esquema do roteiro experimental .....	40
Figura 9 – Permeabilidade transepitelial de fluoresceína em cólon de animais sem colite com e sem aplicação da goma do cajueiro .....	48
Figura 10 – Permeabilidade transepitelial de fluoresceína em cólon de animais com colite com e sem aplicação da goma do cajueiro .....	49
Figura 11 – Gráfico de dispersão mostrando os escores de aderências nos grupos estudados .....	51
Figura 12 – Fotografias representando as aderências intra-abdominais registradas logo após a laparotomia .....	52
Figura 13 – Avaliação do peso úmido colônico .....	54
Figura 14 – Avaliação macroscópica de atividade inflamatória pelo escore de Morris .....	56
Figura 15 – Fotografias mostrando o aspecto macroscópico colônico após abertura longitudinal dos mesmos .....	57

Figura 16 – Avaliação microscópica de atividade inflamatória (escore total) .....	59
Figura 17 – Fotomicrografias colônicas em ratos (magnificação de 100x) .....	61
Figura 18 – Atividade da MPO .....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escores das alterações microscópicas colônicas em ratos com e sem colite induzida pelo TNBS .....	61
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-ASA	5-aminosalicilato
AZA	Azatioprina
BIOTEC	Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia
CACO	<i>Human caucasian colon adenocarcinoma</i>
cm	Centímetro
Da	Dáton
DAPI	4 6-Diamidino-2-fenilindol
DC	Doença de Crohn
DII	Doenças inflamatórias intestinais
FITC	Fluoresceína de Isotiocianato
Fr	French
GC	Goma do cajueiro
GSH	L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetil-amônio
IC	Índice de confiança
IF	Intensidade de fluoresceína
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon gama
JO	Junções oclusivas

Kg	Quilograma
M	Mol
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
mM	Milimol
MP	Mercaptopurina
MPO	Mieloperoxidase
MTX	Metotrexato
μl	Microlitro
NaCl	Cloreto de sódio (Solução Salina)
NaEDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico
NaPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio
nm	Nanômetro
RCU	Retocolite ulcerativa
ROR-γt	<i>Retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma</i>
rpm	Rotações por minuto
SII	Síndrome do intestino irritável
STAT-5	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 5
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TMB	Tetrametil-benzidina
TNBS	Ácido trinitrobenzenossulfônico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1. Objetivo geral .....	30
2.2. Objetivos específicos .....	30
<b>3. MÉTODO</b> .....	<b>31</b>
3.1. Animais .....	31
3.2. Extração e purificação da goma do cajueiro .....	32
3.3. Indução de colite com TNBS .....	33
3.4. Avaliação da permeabilidade .....	34
3.5. Avaliação de atividade anti-inflamatória .....	38
3.5.1. Grupos experimentais .....	38
3.5.2. Classificação do escore de aderências .....	41
3.5.3. Avaliação do peso úmido dos colóns .....	42
3.5.4. Avaliação macroscópica de atividade inflamatória .....	43
3.5.5. Avaliação microscópica de atividade inflamatória .....	44
3.5.6. Avaliação de atividade da mieloperoxidase .....	45
3.6. Análise estatística .....	46
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
4.1. Avaliação da permeabilidade .....	47
4.2. Avaliação de atividade anti-inflamatória .....	50
4.2.1. Avaliação de aderências intra-abdominais .....	50
4.2.2. Avaliação do peso úmido dos colóns .....	53

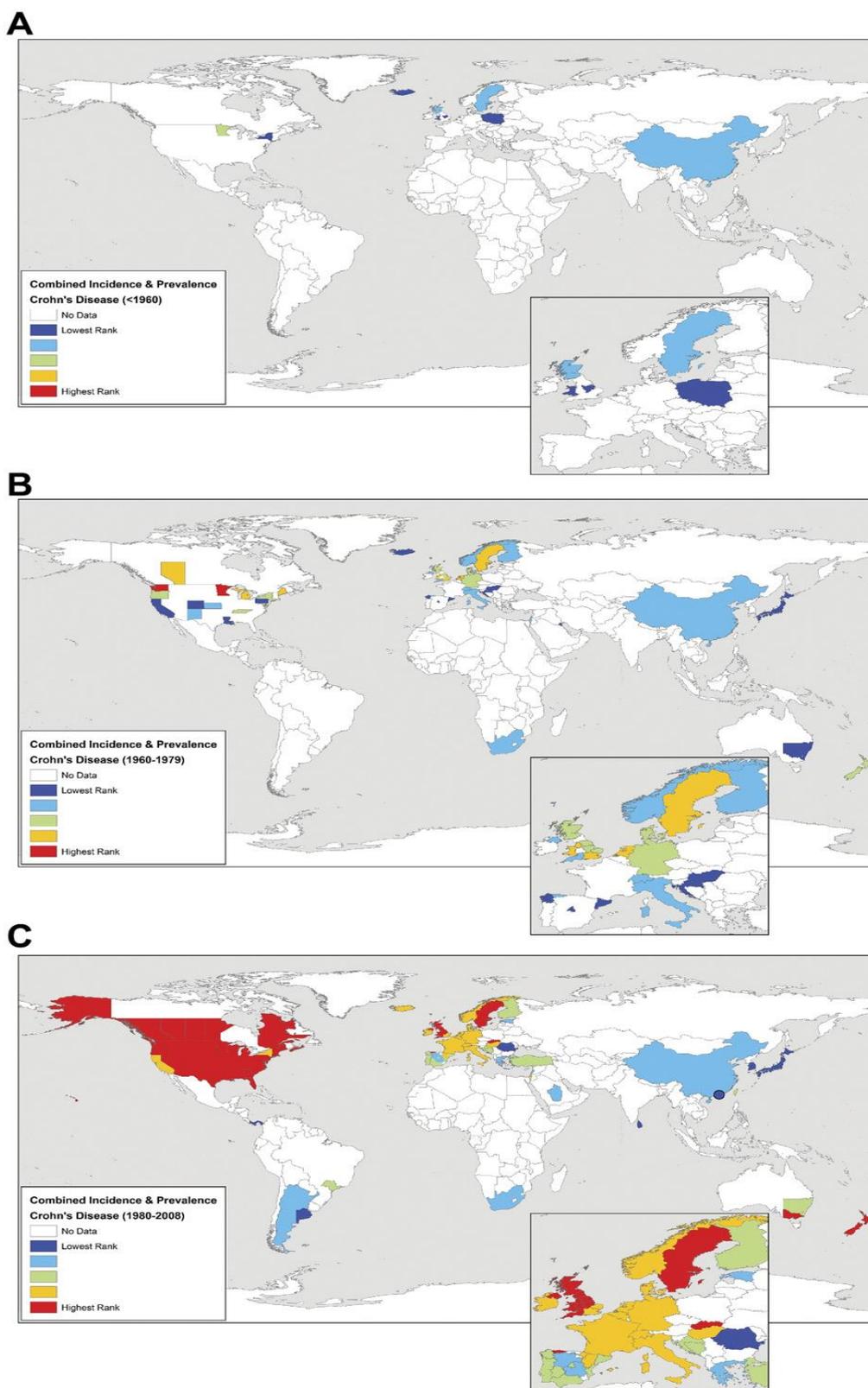
4.2.3. Avaliação macroscópica de atividade inflamatória .....	55
4.2.4. Avaliação microscópica de atividade inflamatória .....	58
4.2.5. Avaliação de atividade da mieloperoxidase .....	62
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ..</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO 2 – TABELAS DE DADOS .....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) englobam um grupo de enfermidades caracterizadas pela desregulação da resposta imune do trato digestivo à microbiota intestinal em indivíduos suscetíveis, levando a um processo inflamatório crônico e recorrente no mesmo. Tem como principais representantes a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU) (HALFELD, 2015).

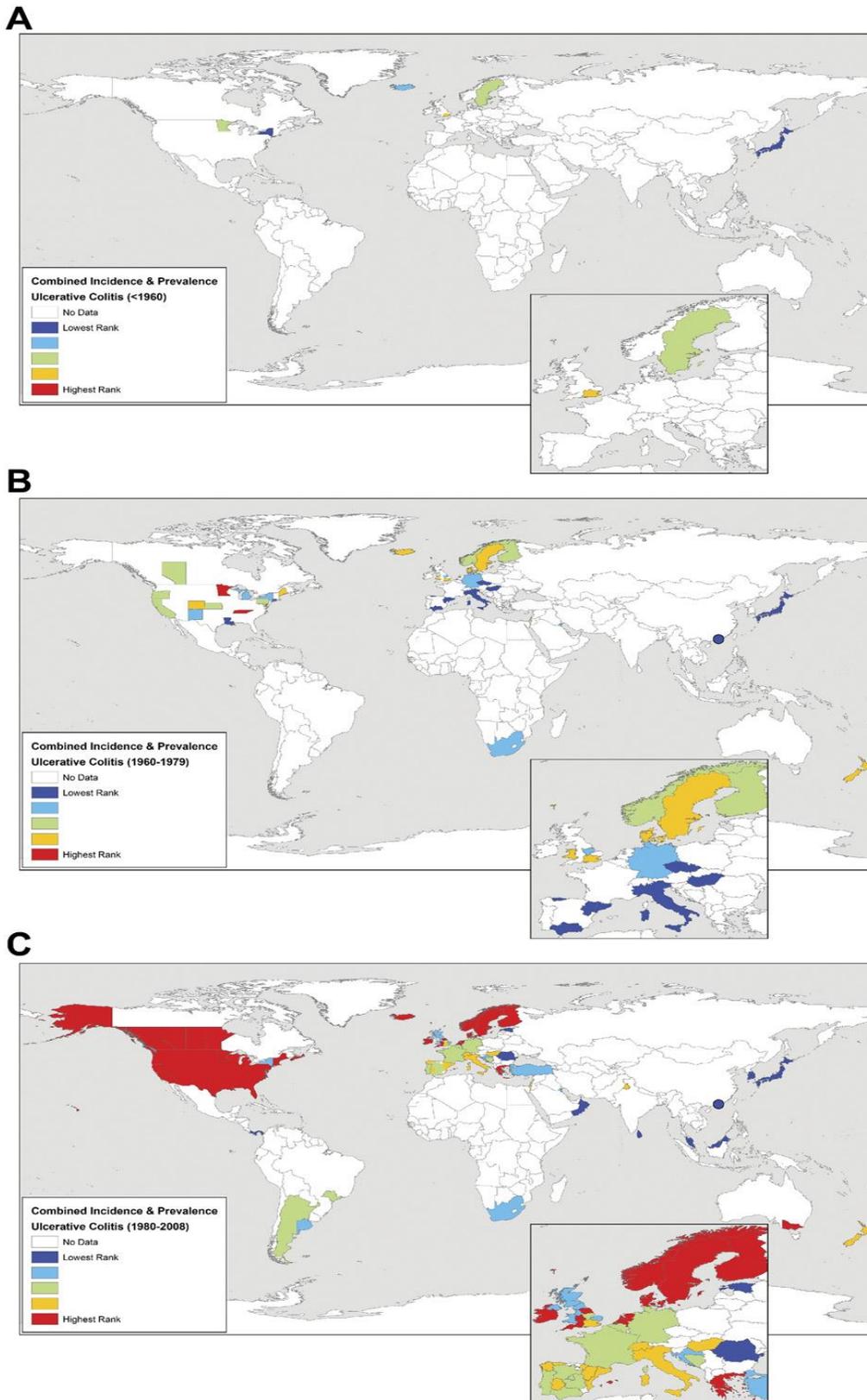
Apresentam pico de incidência na segunda para quarta década de vida, especialmente entre 20 e 29 anos de idade, afetando indivíduos na sua fase de vida mais produtiva, gerando um elevado custo econômico para os pacientes e sistemas de saúde. São conhecidas por serem doenças típicas de países desenvolvidos e industrializados, onde desde a década de 50 se tornaram problemas de saúde pública. Assim observa-se um gradiente Norte-Sul, com países europeus e da América do Norte apresentando altas incidências e prevalências das DII enquanto que em países asiáticos e sul-americanos observam-se taxas bem mais baixas (MOLODECKY et al., 2012). Mais de 1,5 e 2 milhões de pessoas na América do Norte e Europa, respectivamente, sofrem da doença. Apesar de manter uma alta prevalência, desde a década de 90 a maioria dos estudos vem mostrando uma incidência estável ou em declínio nessas regiões tanto pra DC quanto para RCU. Em contraste, houve um aumento da incidência em países em desenvolvimento da Ásia e América do Sul (Figuras 1 e 2). No Brasil a alteração do percentual anual foi de + 11,1% (95% IC 4,8 a 17,8) para DC e + 14,9% para RCU (95% IC 10,4 a 19,6) (NG et al., 2017).

Figura 1 - Incidência e prevalência combinadas para DC (A) antes de 1960, (B) de 1960 a 1979, e (C) após 1980. Valores representando baixa (azul claro e escuro) a intermediária (verde) a alto (amarelo e vermelho) ocorrência da doença.



Fonte: (MOLODECKY et al., 2012).

Figura 2 - Incidência e prevalência combinadas para RCU (A) antes de 1960, (B) de 1960 a 1979, e (C) após 1980. Valores representando baixa (azul claro e escuro) a intermediária (verde) a alto (amarelo e vermelho) ocorrência da doença.



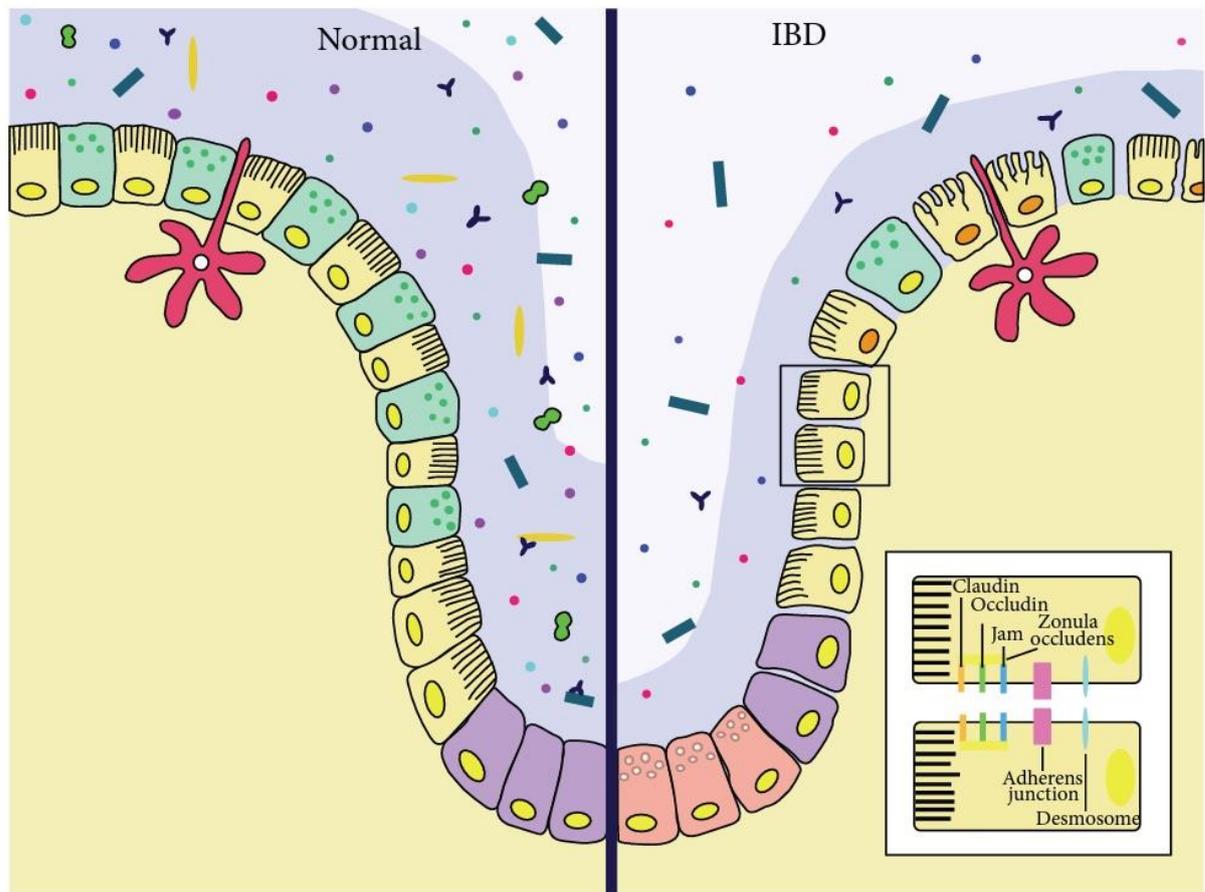
Fonte: (MOLODECKY et al., 2012).

Apesar de ainda não existir uma causa exata definida, acredita-se que a patogênese das DII seja multifatorial, com a contribuição de predisposição genética, fatores da microbiota intestinal, ambientais, bem como a resposta imunitária. Dentre as alterações genéticas destacam-se o polimorfismo no gene NOD2 (também conhecido como CARD2 e IBD1), interferindo na imunidade inata e reconhecimento bacteriano; variações nos genes ATG16L1 e IRGM, relacionados com a autofagia; TNFSF15 e TNFRSF6B, ligados à apoptose; IL23R e IL12B, importantes na resposta inflamatória imunológica; dentre outros (SOUZA, 2015). A relação entre a flora bacteriana comensal e a resposta de defesa da mucosa intestinal tem sido apontado como um fator importante na patogênese das DII e alterações qualitativas na flora de indivíduos com DII, como a presença aumentada de cepas de *Escherichia coli* aderente-invasiva na mucosa de pacientes com DC com comprometimento ileal já foram descritas (LIBERTUCCI et al., 2018; XAVIER; PODOLSKY, 2007). Fatores ambientais como a dieta ocidental e o tabagismo parecem desempenhar um papel no desenvolvimento dessas doenças. Na RCU, entretanto, o tabagismo apresenta um efeito protetor. A associação desses fatores leva a uma alteração tanto da resposta imunológica inata quanto da adaptativa fazendo com que haja uma perda da tolerância contra componentes da microbiota intestinal ou da microbiota como um todo. Desta forma, alterações genéticas levam a uma falha nos mecanismos de reconhecimento e sinalização de patógenos da mucosa intestinal, bem como no processo de autofagia. Como consequência há uma ineficiência na eliminação dos patógenos, resultando numa ativação imune prolongada e cronificação do processo inflamatório (XAVIER; PODOLSKY, 2007).

Recentemente, alteração na barreira mucosa levando ao aumento da permeabilidade intestinal tem sido apontada como fator importante na patogênese das doenças inflamatórias intestinais. O principal componente da barreira mucosa é o epitélio intestinal, o qual é composto por uma camada simples de subtipos de células especializadas como enterócitos, células caliciformes, de Paneth, enteroendócrinas, dendríticas e linfócitos intraepiteliais (Figura 3). A coesão mecânica dessas células e a regulação da permeabilidade paracelular de íons e pequenas moléculas são garantidas por três tipos de complexos juncionais, as junções oclusivas (JO) e aderentes, além dos desmossomos (MICHIELAN; INCÀ, 2015). As junções oclusivas são formadas tanto por proteínas transmembranas como ocludina, tricelulina,

claudinas, diferentes moléculas juncionais aderentes, além de proteínas periféricas da membrana como zona de oclusão-1, -2 e -3, e a cingulina. Enquanto muitas JOs exercem a função de aumento na formação de barreira, outras formam canais ou poros seletivos para carga e tamanho. As junções aderentes e os desmossomos estão envolvidas principalmente na comunicação entre células epiteliais vizinhas (LANDY et al., 2016). Nas doenças inflamatórias intestinais ocorrem um comprometimento da barreira mucosa, levando ao aumento da permeabilidade e infiltração de patógenos. Essas alterações são provavelmente causadas pelo dano epitelial devido a apoptose, ulceração e erosão características do processo de inflamação intestinal, bem como pela ação de citocinas inflamatórias nas JOs levando à diminuição da sua expressão e redistribuição de seus componentes. A diminuição das células calciformes, responsáveis pela secreção de muco que cobre a superfície epitelial, bem como a alteração da distribuição das células de Paneth, produtoras de defensinas antimicrobianas, levam à redução na espessura e composição da camada de muco, também são relacionadas a alteração da barreira mucosa na DII (MICHIELAN; INCÀ, 2015). Achados como o aumento da permeabilidade mesmo na DII em remissão, bem como em parentes de primeiro grau de pacientes com DC (HOLLANDER et al., 1986) e naqueles com persistência de sintomas intestinais mesmo com cicatrização da mucosa (VIVINUS-NÉBOT et al., 2014) sugerem que a alteração da barreira mucosa possa ser um fator etiológico inicial das DII.

Figura 3 – Componentes da barreira mucosa no intestino saudável (esquerda) e na DII (direita). A estrutura básica da JO está no quadro à direita.



- |   |  |
|---|--|
|  Mucus       |  Dendritic cell       |
|  Stem cell   |  Bacteria             |
|  Paneth cell |  Defensins            |
|  Enterocyte  |  Secretory IgA        |
|  Goblet cell |  Apoptotic enterocyte |

Fonte: (MICHIELAN; INCÀ, 2015).

O quadro clínico varia principalmente de acordo com o tipo de doença inflamatória, com o segmento do trato digestivo acometido e com a gravidade da doença.

A doença de Crohn pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, mas acomete preferencialmente a transição ileocecal, exclusivamente o cólon, ou somente o intestino delgado (40%, 25% e 20% dos casos, respectivamente). Seu processo inflamatório envolve todas as camadas da parede intestinal, de forma salteada, intercalando áreas doentes com outras sãs (MIZPUTEN; CURY, 2015a). Desta forma a diarreia crônica é o sintoma mais comum, observada em 90% dos casos, seguidos de dor abdominal, especialmente no seu quadrante inferior direito, e perda ponderal, presentes em 80% e 60% dos casos, respectivamente. Pacientes com doença estenosante podem evoluir para quadros de oclusão intestinal e aqueles com doença penetrante podem apresentar perfurações intestinais, abscessos intracavitários e fístulas. Manifestações perianais como fissuras, plicomas, abscessos e fístulas ocorrem em 4 a 10% dos pacientes (GOMOLLÓN et al., 2017).

A retocolite ulcerativa causa uma inflamação crônica restrita à mucosa colônica. Ela inicia-se no reto e se estende proximalmente de forma contínua, confluyente e concêntrica, afetando uma extensão variável do cólon ou toda sua superfície. Seu quadro clínico depende da extensão e gravidade da doença. Sangramento retal ocorre em 90% dos casos. Diarreia com sangue, muco e mais de 6 semanas de duração, tenesmo, urgência e incontinência fecal também são sintomas característicos. Aumento na frequência das evacuações, dor abdominal, anorexia, taquicardia, náuseas, vômitos e febre sugerem colite fulminante e podem ser a apresentação inicial em 15% dos pacientes (MAGRO et al., 2017).

Manifestações extraintestinais ocorrem em aproximadamente 30% dos pacientes tanto na DC como na RCU (MIZPUTEN; CURY, 2015b). Algumas acompanham a inflamação intestinal ativa e outras independem dela, podendo inclusive preceder os sintomas intestinais em 10% dos casos (MAGRO et al., 2017). Destacam-se as espondiloartropatias, as alterações oculares (uveítes, episclerites), dermatológicas (eritema nodoso, pioderma gangrenoso) e orais (estomatite aftosa). Apesar de menos prevalentes, pancreatite autoimune, colangite esclerosante e cirrose biliar primária merecem destaque devido à gravidade e difícil manejo clínico.

O diagnóstico das DII é baseado na combinação do quadro clínico com achados endoscópicos, radiológicos, bioquímicos e histopatológicos. Desta forma, ileocolonosopia com biópsias deve ser realizada na suspeita de DII (CURY, 2015).

O achado endoscópico característico da DC é o envolvimento do íleo terminal por úlceras aftóides. Acometimento saltado da mucosa intestinal, poupando áreas adjacentes a áreas lesadas, estenose de válvula ileocecal e aspecto de paralelepípedo no íleo terminal também são sugestivos de DC. Na RCU o achado endoscópico clássico é o envolvimento contínuo, iniciando no reto e com extensão proximal. Há perda da arquitetura vascular, eritema, exsudato petequeal, friabilidade, úlceras e sangramento (CURY, 2015).

Granulomas e alterações da arquitetura das criptas intestinais em conjunto com inflamação focal ou irregular e preservação da mucina são achados histopatológicos sugestivos de DC. Acentuada distorção arquitetural de criptas em um infiltrado inflamatório transmural difuso e com plasmocitose basal e associação com componente ativo (cripitite e abscessos de criptas), além de depleção de mucina são características microscópicas da RCU (MAASER et al., 2018).

Pacientes com DC com comprometimento de intestino delgado poderão ser avaliados através de cápsula endoscópica, enteroscopia com balão, ultrassonografia intestinal, enterotomografia computadorizada ou enterorressonância magnética.

A calprotectina fecal, uma proteína derivada dos neutrófilos, é o marcador mais sensível de inflamação intestinal e valores acima de 150 µg/g podem sugerir DII, mas sua maior importância parece ser na avaliação de resposta ao tratamento e monitorização de recaídas (MAASER et al., 2018). Parasitoses intestinais e colites infecciosas, incluindo por *Clostridium difficile*, devem ser excluídas.

Atualmente o tratamento das DII é definido de forma individualizada e deve ser discutido previamente com os pacientes. A presença de inflamação ativa precisa ser definida através de dados objetivos, como marcadores inflamatórios ou achados endoscópicos, antes de se iniciar ou modificar o plano terapêutico. Devem ser levados em consideração o tipo de DII, o grau de atividade, a localização e o comportamento da doença.

De uma maneira geral, pacientes com DC em atividade devem receber corticoterapia sistêmica, que levam a remissão do quadro em 60 a 83% dos casos. Doenças em atividade acentuada, com comprometimento entérico extenso (>100 cm), corticorefratárias ou corticodependentes, se beneficiam da introdução precoce de imunomoduladores, como a azatioprina (AZA), isoladamente ou em associação a agentes biológicos anti-TNF (infliximab, adalimumab) ou anti-integrina (vedolizumab). Essa estratégia terapêutica, conhecida com *Top Down*, promove remissão sem corticoterapia ou necessidade de cirurgia em 60% dos casos, após 26 semanas de tratamento, ao passo que nos pacientes com terapia convencional (*Step Up*) a mesma taxa foi de 35,9% (D'HAENS et al., 2008). Os pacientes com doença em remissão devem ter um seguimento clínico e atividade da doença deve ser mensurada objetivamente através de marcadores (proteína C reativa ou calprotectina fecal) e avaliação endoscópica. Tabagismo está relacionado a pior evolução e maior necessidade de esteroides, devendo ser cessado. Pacientes com doença localizada podem ser mantidos em uso de imunomoduladores como AZA, mercaptopurina (MP) ou metotrexato (MTX). Aqueles com doença extensa, corticodependente, de curso agressivo ou com maus fatores prognósticos (diagnóstico com menos de 40 anos, tabagismo, doença recidivante, acometimento perianal) devem ser considerados para terapia de manutenção com agentes biológicos (GOMOLLÓN et al., 2017). Cirurgia deve ser considerada em pacientes com doença localizada, nos casos de intratabilidade clínica, de retardo de crescimento em crianças ou em complicações agudas como perfuração, obstrução, colite fulminante e hemorragia digestiva, presentes em 6-16% dos casos. As cirurgias devem ser realizadas preferencialmente por videolaparoscopia, utilizando a técnica mais conservadora possível (BEMELMAN et al., 2018).

Pacientes com RCU em atividade leve a moderada podem ser tratados com aminosalicilatos (5-ASA) tópicos, nos casos de proctite e sigmoidite, ou orais, naqueles com colite esquerda ou pancolite. RCU em atividade acentuada ou refratária ao tratamento com 5-ASA é indicação para corticoterapia sistêmica e aqueles com colite fulminante (mais de 6 episódios por dia de diarreia com sangue e sinais de toxicidade sistêmica) devem receber tratamento intensivo em regime hospitalar. Ciclosporina, infliximab, tacrolimo e colectomia são opções quando não há resposta a corticoterapia endovenosa. Pacientes corticodependentes podem ser tratados com

imunomoduladores (AZA, MP, MTX) ou agentes biológicos anti-TNF ou anti-integrina. Remissão definida clínica e endoscopicamente deve ser mantida preferencialmente sem uso de corticoides. Para tal deve ser empregada a estratégia de escalonamento de medicações e doses, iniciando com o 5-ASA com adição, de acordo com a resposta, de imunomoduladores e biológicos (HARBORD et al., 2017). Diferentemente da DC, a RCU pode ser curada cirurgicamente devido à sua localização exclusiva no cólon. Desta forma doença intratável clinicamente, incluindo aquelas com colite fulminante, presença de displasia de alto grau ou câncer colorretal e complicações agudas (megacólon tóxico, perfuração colônica ou hemorragia digestiva não controlada) devem ser tratados através de cirurgia agressiva. Pacientes de alto risco cirúrgico, com doença extensa e/ou em atividade acentuada, utilizando doses altas de esteroides, desnutridos ou com anemia, devem ser submetidos à colectomia total com ileostomia, enquanto que os de menor risco podem realizar o tratamento definitivo com proctocolectomia total e confecção de bolsa ileal. Colectomia total com ileorretoanastomose pode ser considerada em casos selecionados. A cirurgia deve ser realizada preferencialmente por videolaparoscopia (ØRESLAND et al., 2014).

Recentemente a alteração da barreira mucosa e da permeabilidade intestinal tem sido aventada como alvo terapêutico nas DII. A suplementação com alguns ácidos graxos (propionato, butirato, acetato, ácido linoleico conjugado, ômega-3), aminoácidos (glutamina, arginina, triptofano e citrulina), oligoelementos (zinco, vitamina D) e probióticos (*Escherichia coli Nissle 1917*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus rhamnosus GG*) reduz a inflamação e restaura a permeabilidade da mucosa em modelos experimentais, mas sua utilização na prática clínica ainda é limitada (BENJAMIN et al., 2012; MICHIELAN; D'INCÀ, 2015). Medicamentos rotineiramente utilizados no tratamento das DII induzem e mantêm remissão do processo inflamatório não só por sua ação anti-inflamatória, mas também por seu efeito restaurativo na barreira mucosa e permeabilidade intestinal. Terapia com agentes anti-TNF promovem melhora da tanto da permeabilidade transcelular quanto da paracelular (YAKYMENKO et al., 2018).

Diversos modelos experimentais têm sido testados para o desenvolvimento de novos tratamentos e diminuição da morbidade cirúrgica nas DII. O modelo de colite induzida pelo ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) consiste na instilação desse hapteno em associação ao etanol a 50%. Este último tem a função de quebra de

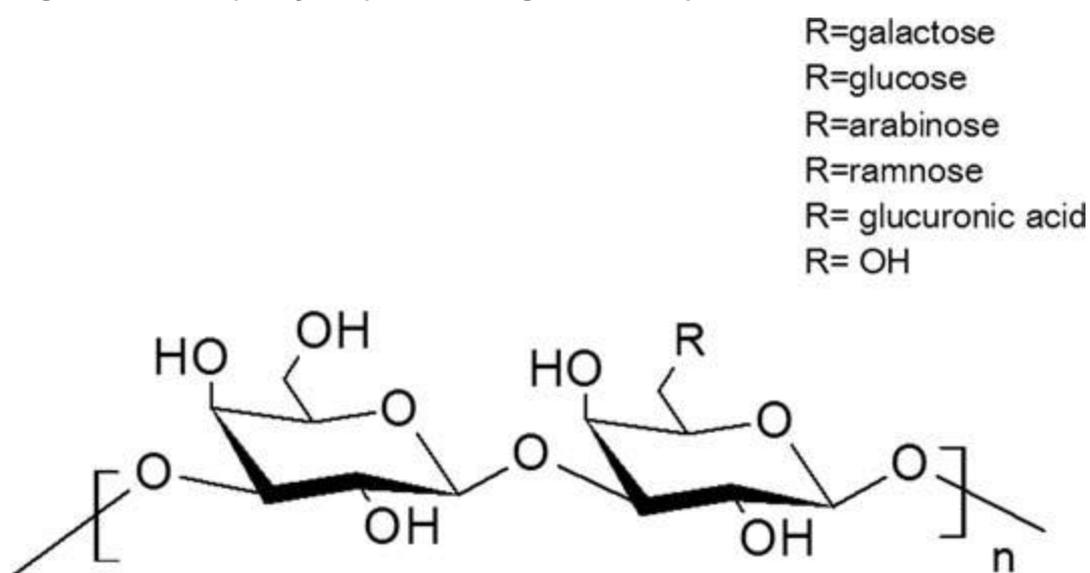
barreira devido ao dano difuso que causa na mucosa intestinal. Já o TNBS se acopla a substâncias de alto peso molecular, como as proteínas teciduais, gerando uma resposta imunológica. A combinação dessas substâncias produz uma inflamação intensa, transmural e granulomatosa, pelo aumento da infiltração celular e da resposta mediada pelos linfócitos Th1 e Th17, que persiste por pelo menos 8 semanas e simula as características clínicas e patológicas encontradas na DC em humanos (MORRIS et al., 1989). Esse modelo tem sido utilizado em diversos estudos clínicos de novas terapêuticas para colites, como a utilização de células tronco (CHEN et al., 2013), fibra solúvel e frutoligossacarídeos (MURAD-REGADAS et al., 2006), atorvastatina (RASHIDIAN et al., 2016) e eritropoetina (MATEUS et al., 2017). Várias substâncias derivadas de plantas medicinais como a baicalina (ZOU et al., 2015), a capnoidina (SHEPHERD et al., 2018), o astrágalo (ZHAO et al., 2016), a castanhola (ABIODUN et al., 2016) e o geraniol (SOUBH; ABDALLAH; EL-ABHAR, 2015) tem sido testados como tratamentos alternativos para as IBD, visto que os medicamentos usados atualmente ainda estão associados a efeitos colaterais relevantes e a um alto custo econômico. Este modelo experimental também tem sido utilizado para avaliação da permeabilidade colônica após tratamento com substâncias derivadas de plantas medicinais. O geniposide é um glicosídeo iridóide purificado da fruta da *Gardenia jasminoides Ellis*, utilizada como anti-inflamatório e antioxidante na medicina tradicional chinesa. Xu e colaboradores demonstraram restauração da barreira mucosa e redução de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, levando a melhora da colite induzida pelo TNBS após 14 dias de tratamento com geniposide (XU et al., 2017). Usando um modelo semelhante, Lu e colaboradores relataram que o chá de Sijunzi, preparado com uma mistura de ervas medicinais chinesas (Ginseng Radix et Rhizoma, Atractylodes Macrocephalae Rhizoma, Poria, and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparate cum Melle) promoveu redução do processo inflamatório, além de melhora da barreira mucosa a qual correlaciona ao aumento na expressão da claudina-2 e redução na expressão da NF- $\kappa$ B (LU et al., 2017).

O cajueiro (*Anacardium occidentale Linn*) é membro da família *Anacardiaceae* e nativo da África, Índia e Nordeste brasileiro. Extratos feitos a partir da casca, da entrecasca, do líquido da castanha, das folhas, das raízes e do exsudato (goma) tem sido usados na medicina tradicional para o tratamento de febre e de diversas doenças como asma, distúrbios gastrointestinais e cutâneos (AGRA et al., 2007).

A goma do cajueiro é um exsudato produzido e estocado pelas células epiteliais da casca do tronco do cajueiro, sendo liberada em resposta a traumas mecânicos ou ataque de patógenos, como forma de proteção. A produção média anual da goma de cajueiro no Brasil é de 700g por árvore, com um potencial de produção anual de cerca de 50000 toneladas. Suas propriedades reológicas, além de baixo custo, baixo risco de efeitos colaterais, biocompatibilidade, processamento ecologicamente correto e disponibilidade local, tem estimulado a aplicação da goma do cajueiro na indústria farmacêutica, alimentícia e farmacológica (RIBEIRO et al., 2016).

Após processo de purificação (trituração, dissolução em água com ajuste de pH, filtração, precipitação e liofilização) se obtém um complexo polissacarídeo ácido hidrossolúvel, não-tóxico, composto por uma cadeia principal de  $\beta$ -galactose (1 $\rightarrow$ 3), com ramos de  $\beta$ -galactose (1 $\rightarrow$ 6) e resíduos terminais de ácido glucurônico, arabinose, ramnose, ácido 4-O-metilglucurônico, xilose, glicose e manose (Figura 4) (PAULA; HEATLEY; BUDD, 1998). Apresenta na sua estrutura sete ácidos anacárdicos (ácido salicílico com uma cadeia 15-carbono alquila), conhecidos por apresentarem várias atividades biológicas (DA SILVA et al., 2018).

Figura 4 – Composição química da goma do cajueiro



Fonte: (CARVALHO et al., 2015)

A goma do cajueiro apresenta várias propriedades biológicas já demonstradas. Um efeito gastroprotetor contra ação do naproxeno foi relacionado à diminuição da peroxidação lipídica e da produção de radicais livres, além de aumento na quantidade de muco aderido à mucosa gástrica (CARVALHO et al., 2015). Suas propriedades muco-adesivas promoveram proteção da laringe em estudo experimental após exposição ácida (FIGUEIREDO et al., 2018). Foi efetiva como antidiarreico nos modelos de diarreia aguda (induzida com óleo de rícino), inflamatória (induzida com PGE2) e secretória (induzida pela toxina colérica) (ARAÚJO et al., 2015a). Acelerou o processo de cicatrização (VIEGAS et al., 2006) e apresentou atividade antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, dentre outros (CAMPOS et al., 2012). Apresenta ação anti-inflamatória através da diminuição da produção por macrófagos de IL-6, NO e INF- $\gamma$ , além do aumento nos níveis de IL-10 (YAMASSAKI et al., 2015). Entretanto sua atividade em processos inflamatórios intestinais e o potencial efeito protetivo na barreira mucosa colônica ainda são desconhecidos.

Este é o primeiro estudo na literatura mundial em que a ação da goma do cajueiro foi avaliada em um modelo de colite experimental.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito de um biopolímero, goma do cajueiro, na colite experimental induzida por TNBS.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar a ação da goma do cajueiro na permeabilidade colônica de em ratos com e sem colite induzida pelo TNBS.

Investigar a ação anti-inflamatória da goma do cajueiro em ratos com colite induzida pelo TNBS.

### **3 MÉTODO**

Foi realizado um estudo do tipo experimental cego, randomizado, de caráter analítico e quantitativo, realizado em duas etapas (avaliação da permeabilidade colônica *in vitro*, seguida da avaliação de atividade anti-inflamatória) no LAFFEG (Laboratório de Estudos da Fisiofarmacologia Gastrointestinal) da Universidade Federal do Ceará, no período de outubro de 2017 a setembro de 2018.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Ceará, sob o protocolo 121/16.

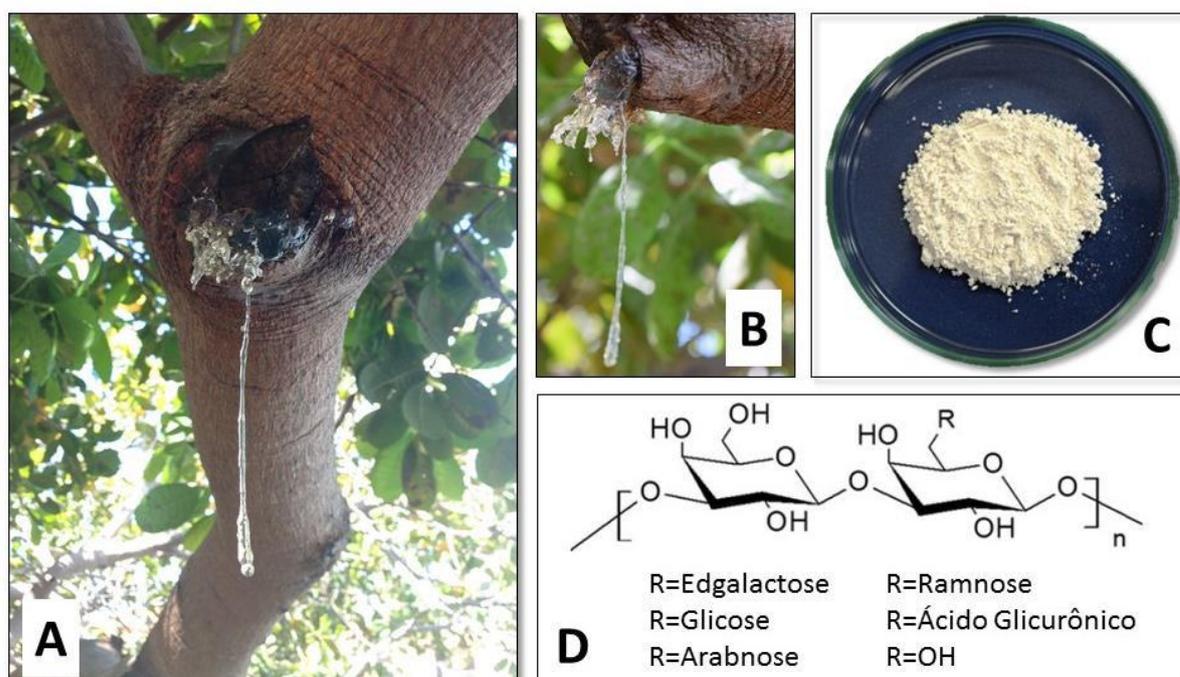
#### **3.1 ANIMAIS**

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 220 e 295 gramas (peso médio de 250 g), provenientes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram acondicionados em gaiolas, sob condição controle de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à alimentação. No entanto, foram privados de alimentação por 12 horas antes dos experimentos, mantendo acesso à água *ad libitum*. Todos os tratamentos e procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

### 3.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GOMA DO CAJUEIRO

Amostras brutas de goma do cajueiro foram coletadas pelo Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC), Parnaíba-PI, Brasil, a partir do tronco de árvores de caju nativas (Figura 5), no município de Ilha Grande de Santa Isabel, Piauí, Brasil (Latitude, graus decimais S -2,8242; Longitude, graus decimais W-41,7331). A árvore foi identificada e o espécime recebeu o comprovante de número 52, sendo depositado no herbário HDELTA (Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Piauí, Brasil). Nódulos do caule foram selecionados e dissolvidos em água destilada à temperatura ambiente para dar origem a uma solução de 5% (peso/volume). O pH da solução foi ajustado para aproximadamente 7.0 por adição de NaOH. A solução límpida foi sucessivamente filtrada e o polissacarídeo foi precipitado com etanol (SILVA et al., 2009). A goma foi purificada como um sal de sódio utilizando o método previamente descrito (PAULA; SANTANA; RODRIGUES, 2001).

Figura 5 – Resina extraída do troco do cajueiro (A e B), Goma do Cajueiro após purificação (C) e representação da estrutura química da goma do cajueiro (D).



Fonte: (NICOLAU, 2018)

### **3.3 INDUÇÃO DE COLITE COM TNBS**

Os animais só receberam água nas 12 horas anteriores ao procedimento. Uma hora antes eles realizaram um preparo mecânico do cólon utilizando-se enema com 20ml de solução salina a 0,9% aplicado através de uma sonda retal tamanho 6 Fr, introduzida até 8 cm acima da margem anal. A seguir os animais foram isolados e anestesiados com cetamina (50 mg/Kg) e xilazina (3 mg/Kg). Depois da anestesia foi introduzida uma sonda retal tamanho 6 Fr até cerca de 8 cm acima da margem anal por onde foi aplicado 20 mg/Kg de TNBS (Sigma-Aldrich-Brasil) diluído em solução de etanol a 50% será então aplicada, com um volume total de 0,8 ml por animal. Os animais ficaram suspensos pela cauda por 30 segundos para evitar o refluxo da solução (MURAD-REGADAS et al., 2006).

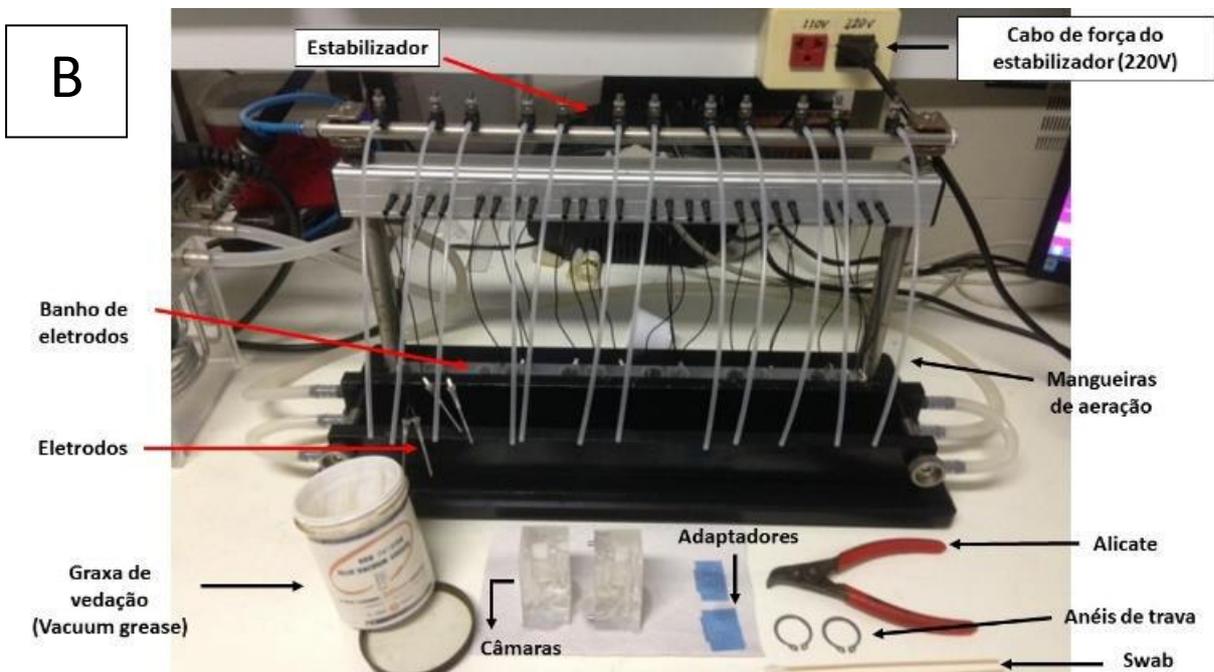
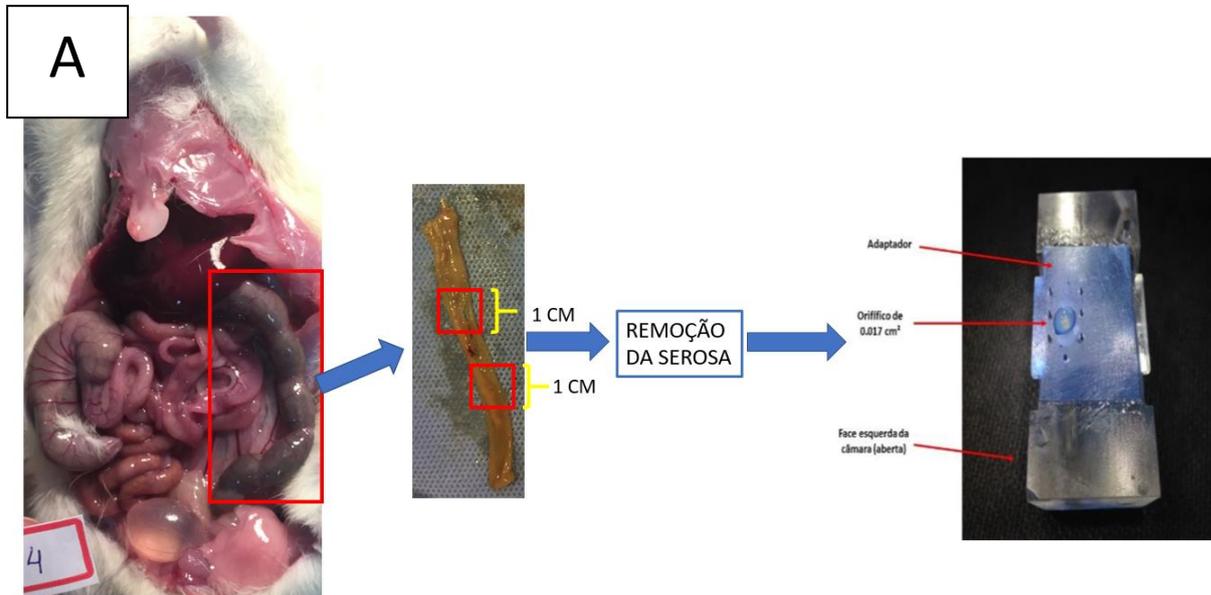
### 3.4 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE

Nessa fase os animais foram randomicamente divididos em dois grupos. O primeiro grupo (Grupo Colite – GC, n: 5) compreendeu os animais que submetidos a indução de colite com TNBS previamente descrita. No segundo grupo (Grupo Sham – GS, n: 5) os animais foram submetidos ao mesmo processo, exceto pela substituição da aplicação do TNBS pela administração de 0,8 ml de solução salina a 0,9%.

Os animais foram submetidos a eutanásia 7 dias após a aplicação de TNBS ou salina, através de overdose de cetamina (200 mg/Kg) e xilazina (12 mg/Kg), seguida de exsanguinação. Usando técnicas operatórias padronizadas, foi realizada laparotomia através de incisão mediana, dissecação e remoção dos segmentos colônicos para estudo, tendo como limite proximal o cólon descendente a cerca de 6 cm da sínfise púbica e o limite distal com o reto, seccionado ao nível da reflexão peritoneal. Nos animais com colite foram retiradas para estudo fragmentos de aproximadamente 1 cm imediatamente proximais e distais às áreas de maior ulceração colônica. Naqueles do grupo salina também foram coletados dois segmentos em posições anatômicas correspondentes, aproximadamente a 2 e 4 cm proximalmente ao ponto de secção colônica distal.

Os fragmentos foram inicialmente avaliadas sob lupa estereoscópica para determinação das superfícies luminal e não-luminal, bem como remoção cuidadosa da camada serosa. Em seguida, foram montados em minicâmaras de Üssing (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Alemanha), adaptadas especialmente para avaliação de fragmentos da mucosa, com área de exposição de 0,017 cm<sup>2</sup>. Após a montagem, solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4; contendo NaCl 118 mM; KCl 4,7 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM e glicose 11 mM) foi adicionada em ambos os lados luminal e não-luminal da câmara, continuamente aerado com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) e mantida em temperatura à 37°C, durante um período de estabilização de 30 minutos (Figura 6).

Figura 6 – (A) Extração e preparo de segmento colônico para aposição na minicâmara montada com um adaptador cujo orifício mede 0,017 cm<sup>2</sup>. (B) Câmara de Üssing e suas ferramentas de funcionamento.

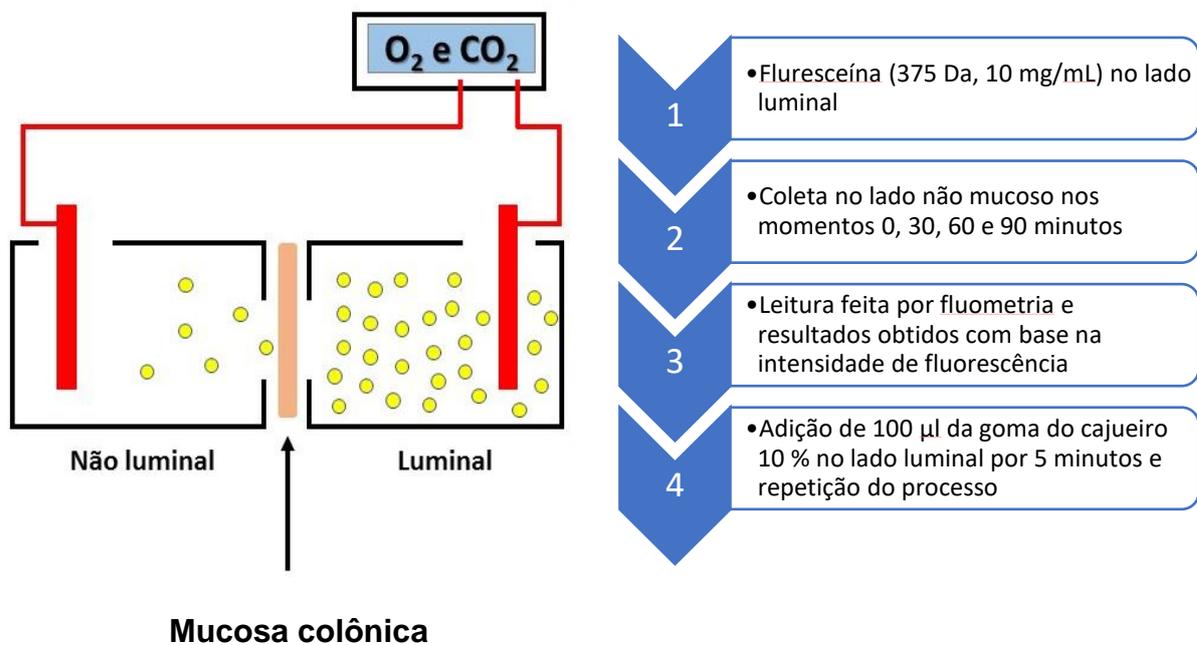


Fonte: (NICOLAU, 2018)

A permeabilidade epitelial foi medida em resposta a incubação com fluoresceína-5 (375 Da; 1mg/ml, diluído na solução de Krebs-Henseleit, pH: 7,4), empregada como traçador permeável que passa através das camadas epiteliais. Uma amostra de 100 µl foi coletada do lado seroso da câmara basal nos intervalos de tempo 0, 30, 60 e 90 min e acondicionados em placa de múltiplos poços para posterior mensuração da intensidade de fluorescência utilizando um fluorímetro (Fluoroskan Ascent; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A mesma quantidade de solução foi retirada a cada intervalo de tempo do lado mucoso a fim de manter equilibrado o volume nos dois lados da câmara. Os resultados foram expressos como a razão de intensidade de fluorescência em comparação com a condição basal (tempo 0) (NICOLAU, 2018).

Após a realização desse processo nos fragmentos de ambos os grupos, as câmaras foram abertas e foi colocado 100 µl da solução de goma do cajueiro a 10% sobre o lado luminal exposto de cada fragmento e deixado em contato com a mucosa durante 5 minutos. Nos fragmentos utilizados como controle o processo foi repetido, exceto pela adição de salina ao invés da goma do cajueiro. A seguir as câmaras foram fechadas e o mesmo método descrito previamente foi realizado para nova mensuração da permeabilidade (Figura 7).

Figura 7 – Esquematização do experimento para avaliação da permeabilidade transepitelial à fluoresceína, antes e após a adição da goma do cajueiro.



## 3.5 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

### 3.5.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

**Grupo Sham – GSH (n: 6):** Aplicação transanal de solução salina a 0,9% durante a indução e tratamento com enema de solução salina.

**Grupo Colite – GC (n: 10):** Indução de colite com 20 mg de TNBS + etanol a 50% conforme descrição prévia e tratamento com enema com solução salina (NaCl 0,9%).

**Grupo Goma do Cajueiro 10 - GGC10 (n: 6):** Indução de colite com 20 mg de TNBS + etanol a 50% conforme descrição prévia e tratamento com enema de goma do cajueiro 10% (10 mg/Kg/dia).

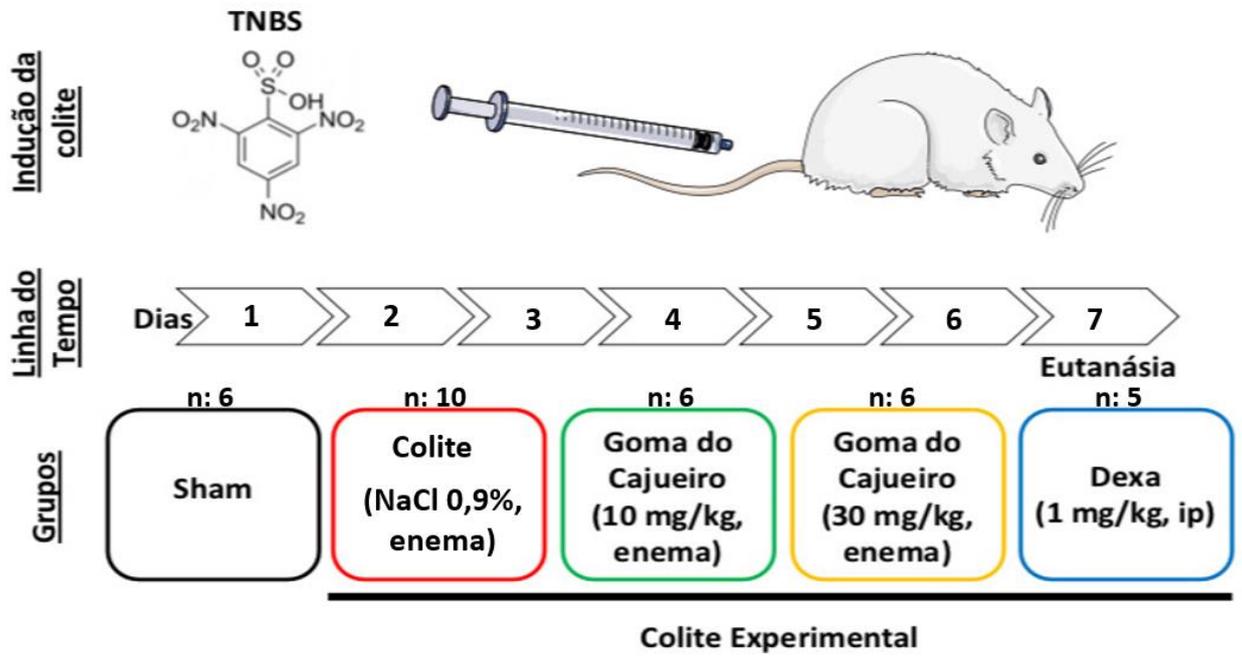
**Grupo Goma do Cajueiro 30 - GGC30 (n: 6):** Indução de colite com 20 mg de TNBS + etanol a 50% conforme descrição prévia e tratamento com enema de goma do cajueiro 10% (30 mg/Kg/dia).

**Grupo Dexametasona – GD (n: 5):** Indução de colite com 20 mg de TNBS + etanol a 50% conforme descrição prévia e tratamento com dexametasona (1 mg/Kg), intraperitoneal.

Os animais foram randomicamente divididos nos grupos citados. A exceção daqueles do Grupo Sham, todos os animais foram submetidos a indução de colite pelo TNBS, conforme a descrito previamente. Os ratos dos Grupos Sham (GSH) e Colite (GC) receberam tratamento diário, durante 7 dias, com enema com solução de salina a 0,9%, através de sonda retal tamanho 6 Fr introduzida até cerca de 8 cm acima da margem anal. Nos grupos Goma do Cajueiro 10 (GC10) e Goma do Cajueiro 30 (GC30) os animais foram submetidos ao mesmo processo, exceto pela substituição da solução de salina pelo enema com solução de goma do cajueiro (10 mg/Kg/dia e 30 mg/Kg/dia), respectivamente. No Grupo Dexametasona (GD) os animais foram tratados pela aplicação intraperitoneal de dexametasona (1 mg/Kg/dia) também durante 7 dias. Em todos os grupos os ratos receberam anestesia intraperitoneal com cetamina (50 mg/Kg) e xilazina (3 mg/Kg) antes dos tratamentos, a fim de reduzir o

refluxo das substâncias utilizadas causado pela contração abdominal. Além disso, após a aplicação dos enemas, os animais ficaram suspensos pela cauda durante 30 segundos para redução do refluxo retal das substâncias utilizadas. A figura 8 sumariza essa fase do experimento, mostrando desde a indução da colite pelo TNBS, o tratamento por 7 dias nos diversos grupos utilizados e o encerramento com a eutanásia dos animais.

Figura 8 – Indução da colite pelo TNBS em ratos e esquema do roteiro experimental.



### 3.5.2 CLASSIFICAÇÃO DO ESCORE DE ADERÊNCIAS

Durante a laparotomia foi realizada a classificação de aderências intracavitárias por um examinador cego aos animais operados, sendo utilizado o sistema de escore de aderências abaixo (NAIR; BHAT; AURORA, 1974):

<b>CRITÉRIO</b>	<b>ESCORE</b>
COMPLETA AUSÊNCIA DE ADERÊNCIAS	0
FAIXA ÚNICA DE ADERÊNCIAS ENTRE VÍCERAS, OU DE UMA VÍSCERA À PAREDE ABDOMINAL	1
DUAS FAIXAS DE ADERÊNCIAS ENTRE VÍCERAS, OU DE VÍSCERA À PAREDE ABDOMINAL	2
MAIS DE DUAS FAIXAS DE ADERÊNCIAS ENTRE VÍCERAS, OU DE VÍSCERA À PAREDE ABDOMINAL, OU TODO O INTESTINO FORMANDO UMA MASSA NÃO ADERIDA À PAREDE ABDOMINAL	3
VÍCERAS DIRETAMENTE ADERIDAS À PAREDE ABDOMINAL, INDEPENDENTE DO NÚMERO E EXTENSÃO DAS FAIXAS DE ADERÊNCIAS	4

### **3.5.3 AVALIAÇÃO DO PESO ÚMIDO DOS COLÓNS**

Antes da análise macroscópica dos escores de lesão dos cólons de animais com ou sem colite, foi retirado fragmentos, medindo cada um 1 cm de comprimento, dos cólons de animais com ou sem colite. Posteriormente, foi feita a pesagem desses fragmentos e os resultados foram expressos pela unidade peso úmido / cm de lesão (MURAD-REGADAS et al., 2006).

### 3.5.4 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA

No 7º dia pós indução da colite, todos os animais do estudo foram submetidos à eutanásia, através de overdose de cetamina (200 mg/Kg) e xilazina (12 mg/Kg), ambos por via intraperitoneal, seguida de exsanguinação. Usando técnicas operatórias padronizadas, foi realizada laparotomia através de incisão mediana, dissecação e remoção de segmento colônico para estudo, tendo como limite proximal o cólon descendente a cerca de 6 cm da sínfise púbica e o limite distal com o reto, seccionado ao nível da reflexão peritoneal.

As peças foram abertas longitudinalmente, lavadas com soro fisiológico e distendidas sobre uma superfície plana, sendo avaliadas por um pesquisador cego para os grupos do trabalho, que realizou uma análise macroscópica com a utilização de lupa estereoscópica e aplicou o escore de inflamação abaixo (MORRIS et al., 1989):

<b>CRITÉRIO</b>	<b>ESCORE</b>
APARÊNCIA NORMAL	0
HIPEREMIA FOCAL, SEM ÚLCERA	1
ULCERAÇÃO SEM HIPEREMIA OU ESPESSAMENTO DA PAREDE COLÔNICA	2
ULCERAÇÃO COM INFLAMAÇÃO EM UMA REGIÃO	3
ULCERAÇÃO/INFLAMAÇÃO EM DUAS OU MAIS REGIÕES	4
LESÃO PRINCIPAL SE EXTENDENDO POR 1 CM AO LONGO DO CÓLON	5
QUANDO A LESÃO PRINCIPAL SE EXTENDE POR MAIS QUE 2 CM AO LONGO DO CÓLON, 1 PONTO É DADO PARA CADA CM ADICIONAL	6-10

### 3.5.5 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA

Na área que macroscopicamente apresentava o maior comprometimento inflamatório em cada cólon dissecado foi isolado um segmento de 1 cm, acondicionado em cassete e encaminhado para fixação em formol a 10%. Após 24 horas todos os cassetes foram mergulhados em álcool absoluto para desidratação. Após diafanização com xilol e inclusão com parafina, as lâminas foram preparadas e coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram avaliadas por um pesquisador cego para os grupos do trabalho, que realizou uma análise microscópica e aplicou o escore de inflamação abaixo (APPLEYARD; WALLACE, 1995):

<b>CRITÉRIO</b>	<b>ESCORE</b>
PERDA DE ARQUITETURA DA MUCOSA	0 – 3
INFILTRAÇÃO CELULAR	0 – 3
ESPESSAMENTO DA CAMADA MUSCULAR	0 – 3
FORMAÇÃO DE ABSCESSO EM CRIPTA	0 – 1
AUSÊNCIA DE CÉLULAS CALICIFORMES	0 – 1

### 3.5.6 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente, predominantemente, nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos. Resumidamente, 50 a 100 mg de cólon de cada animal foram colocados num tampão 1 (NaCl 0,1 M + NaEDTA 0,015 M/L de NaPO<sub>4</sub> 0,02 M em pH 4,7). Posteriormente, homogeneizados num Politron (13000 rpm). Sendo centrifugado a 15 minutos (3000 rpm). Logo em seguida, o sobrenadante foi retirado e o precipitado, novamente foi centrifugado no tampão 1 e colocado para centrifugar nas mesmas condições. O sobrenadante foi, mais uma vez, retirado e, então, o precipitado foi homogeneizado (Politron - 13000 rpm) em um tampão 2 [HTAB (0,05%)/200 ml de NaPO<sub>4</sub> 0,05 M]. A próxima etapa foi colocar esse homogenato para congelar e descongelar em nitrogênio líquido (2 vezes). Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a 10000-20000 rpm por 15 minutos. Finalmente, o sobrenadante foi pipetado na placa (5-10 µl) + 45 µl de NaPO<sub>4</sub> 0,08M e mais a solução de leitura [TMB 25 µl (5 min) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µl (5 min)]. A reação foi terminada com o acréscimo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 µl (4M) e lida em um leitor de placa a 450 nm. Assim, o infiltrado neutrofílico foi obtido a partir de uma curva padrão de neutrófilos. Os resultados são expressos como unidades de MPO por miligrama de tecido (CARVALHO et al., 2015).

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA), exceto na avaliação da permeabilidade onde se utilizou o teste t de Student. Quando houve diferença significativa entre os grupos, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis/Dunn (para variáveis não paramétricas) ou teste de Bonferroni (para variáveis paramétricas). Os resultados foram expressos ou como média  $\pm$  E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana  $\pm$  desvio padrão (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE**

Não houve diferença estatística significativa quando comparadas as permeabilidades colônica em animais sem colite (Grupo Sham) com ou sem aplicação da goma do cajueiro ( $604,5 \pm 309,0$  IF e  $314,4 \pm 84,68$  IF, respectivamente) conforme evidenciado na figura 9.

Na figura 10 observa-se a diminuição significativa ( $p: 0,04$ ) da permeabilidade colônica no minuto 90 após a aplicação da goma do cajueiro, em animais no 7º dia após a indução colite induzida pelo TNBS ( $92,87 \pm 29,60$  IF e  $33,84 \pm 9,576$  IF, respectivamente), quando comparada à permeabilidade basal.

Figura 9 – Permeabilidade transepitelial de fluoresceína após 7 dias em cólon de animais sem colite com e sem aplicação da goma do cajueiro a 10%. O painel A mostra a progressão da permeabilidade no decorrer do tempo (0, 30, 60 e 90 minutos). Painel B mostrando a ausência de diferença estatística entre os dois grupos no minuto 90. \*  $p < 0,05$ . GC: Goma do cajueiro.

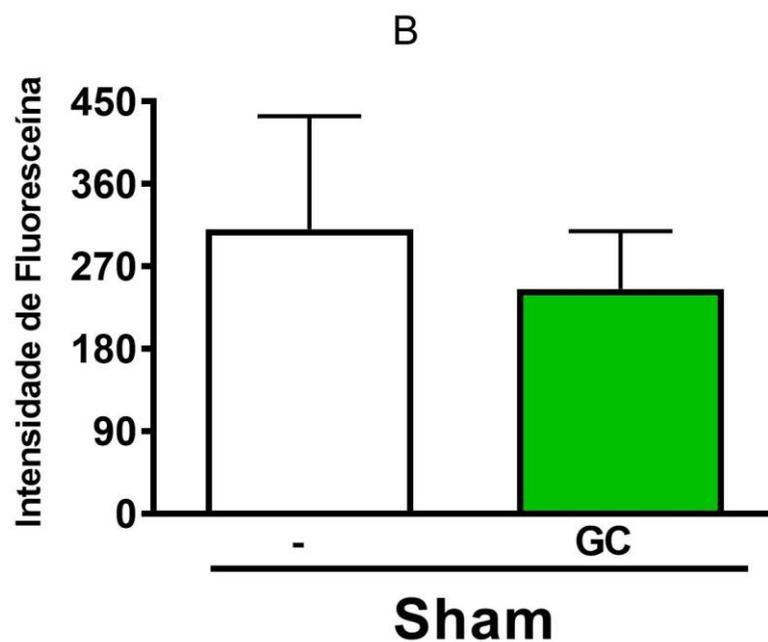
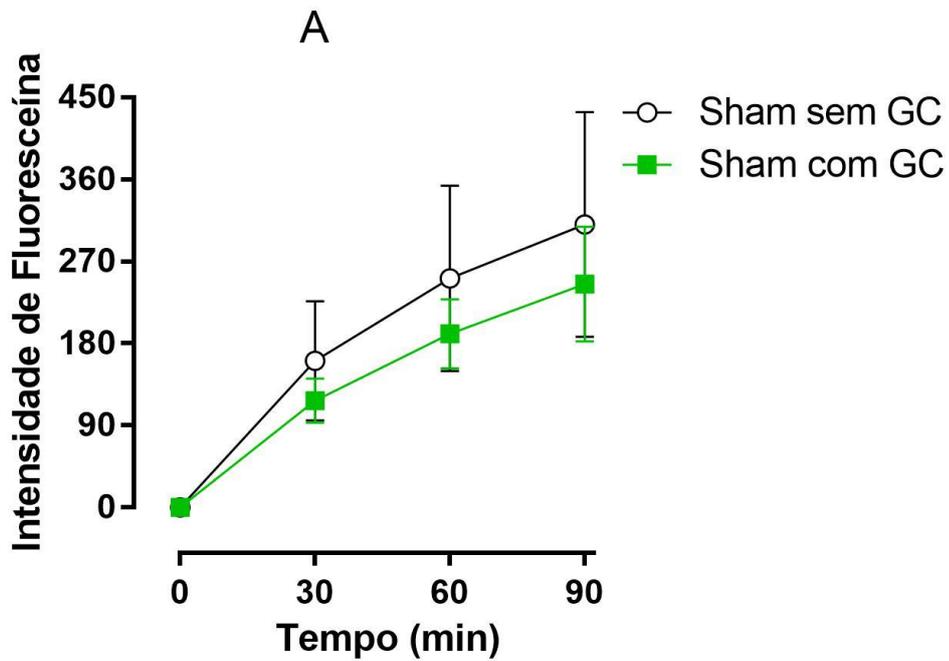
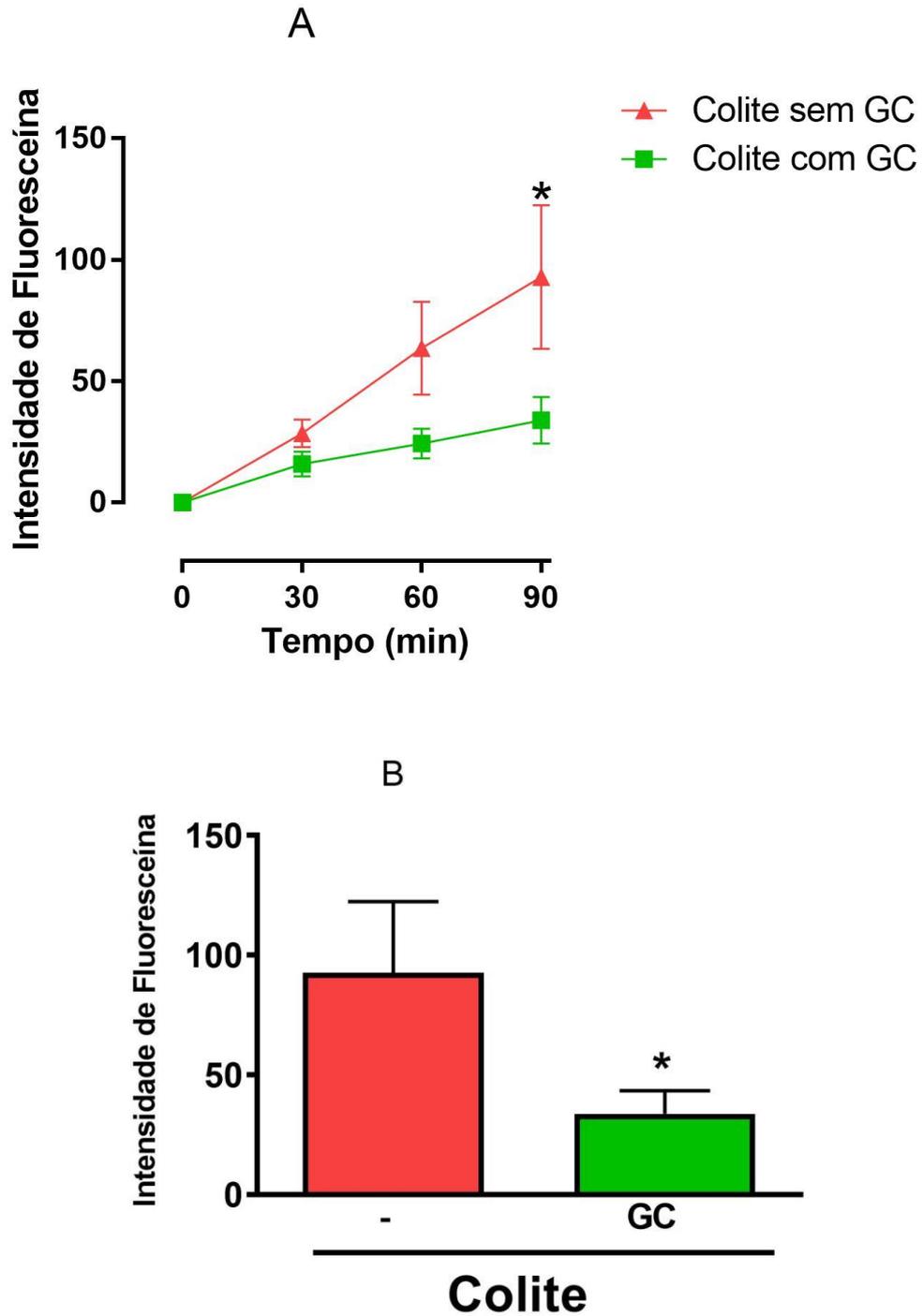


Figura 10 – Permeabilidade transepitelial de fluoresceína após 7 dias em cólon de animais com colite, antes e após aplicação da goma do cajueiro a 10%. O painel A mostra a progressão da permeabilidade no decorrer do tempo (0, 30, 60 e 90 minutos). Painel B mostrando a diminuição significativa da permeabilidade após a aplicação da goma do cajueiro no minuto 90. \*  $p < 0,05$ . GC: Goma do cajueiro.



## **4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

### **4.2.1 AVALIAÇÃO DE ADERÊNCIAS INTRA-ABDOMINAIS**

A avaliação das aderências abdominais, realizada in vivo no sétimo dia, mostrou que os animais do grupo Colite tiveram escores significativamente maiores do que os dos grupos Sham e Dexametasona. Não houve diferença entre os grupos Goma do Cajueiro 10 e 30, quando comparados ao grupo Colite, conforme observa-se na figura 11. A figura 12 ilustra a ausência de aderências nos animais dos grupos Sham e Dexametasona, a presença de mais de duas faixas de aderências nos animais do grupo Colite e faixa única de aderência nos grupos Goma do Cajueiro 10 e 30 mg/Kg.

Figura 11 – Gráfico de dispersão mostrando os escores de aderências nos grupos estudados. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M e foram analisados pelo teste de Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Dunn's. \* $p < 0,05$  versus grupo Sham;  $\psi p < 0,05$  versus grupo Colite. GC: Goma do cajueiro.

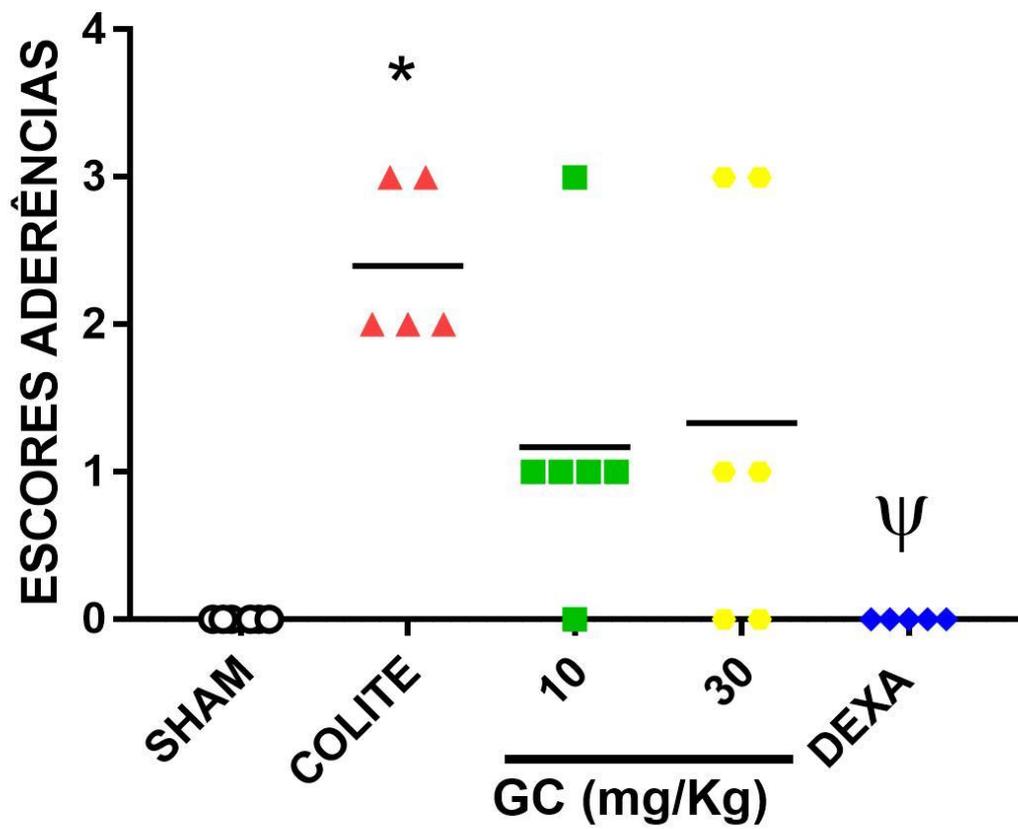
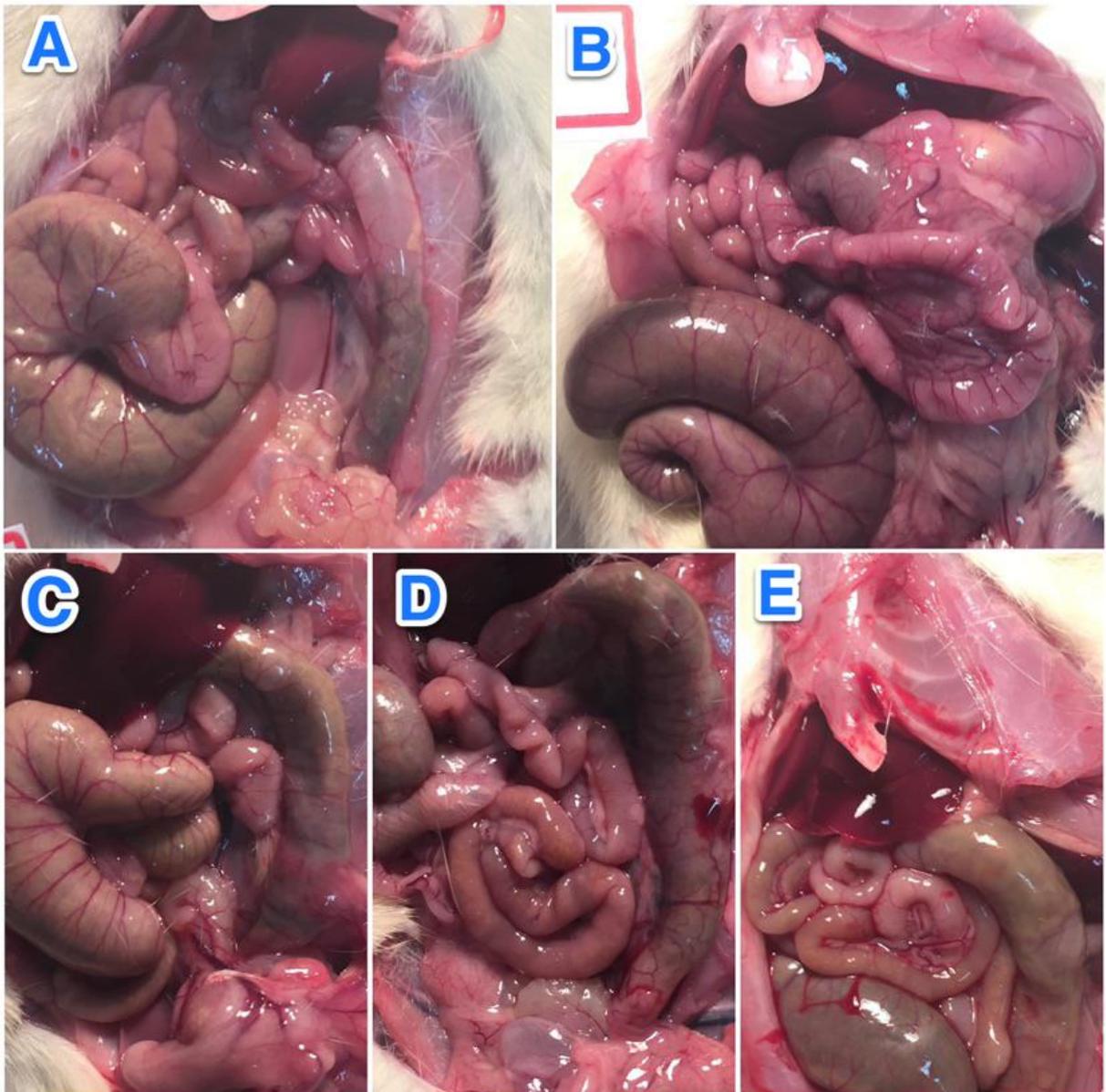


Figura 12 – Fotografias representando as aderências intra-abdominais registradas logo após a laparotomia. (A) grupo Sham, (B) grupo Colite, (C) grupo Goma do Cajueiro 10 mg/Kg, (D) grupo Goma do Cajueiro 30 mg/Kg e (E) grupo Dexametasona.

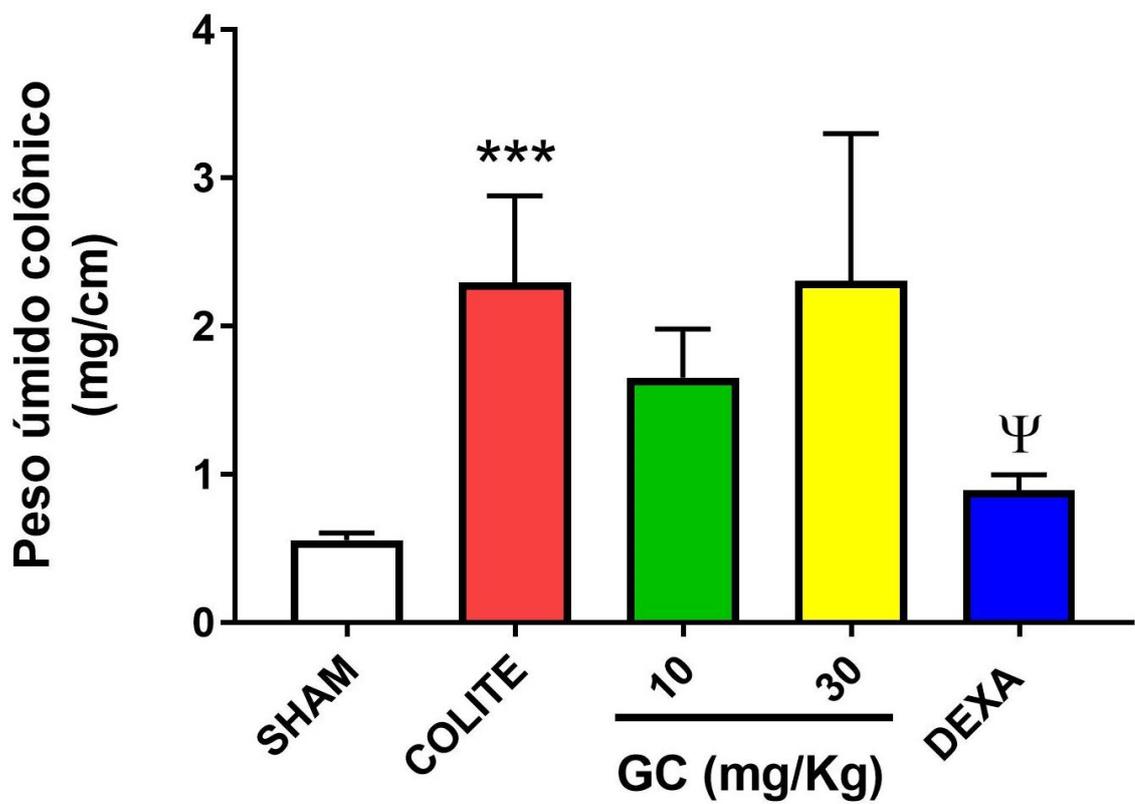


#### **4.2.2 AVALIAÇÃO DO PESO ÚMIDO DOS CÓLONS**

Foi observado um aumento significativo do peso úmido colônico dos animais dos grupos Colite ( $2,29 \pm 0,58$  mg/cm) no 7º dia após a indução com TNBS, quando comparados com o grupo Sham ( $0,56 \pm 0,05$  mg/cm). Também houve diferença estatística entre os grupos Colite e Dexametasona ( $0,89 \pm 0,10$  mg/cm).

Não houve diferença entre os grupos Colite e Goma do cajueiro 10 e 30 mg/Kg. Os resultados estão sumarizados na figura 13.

Figura 13 – Avaliação do peso úmido colônico. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M e foram analisados pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Kruskal–Wallis e teste de Dunn’s. \*\*\* $p < 0,0005$  versus grupo Sham e  $\psi p < 0,05$  versus grupo Colite. GC: Goma do cajueiro.



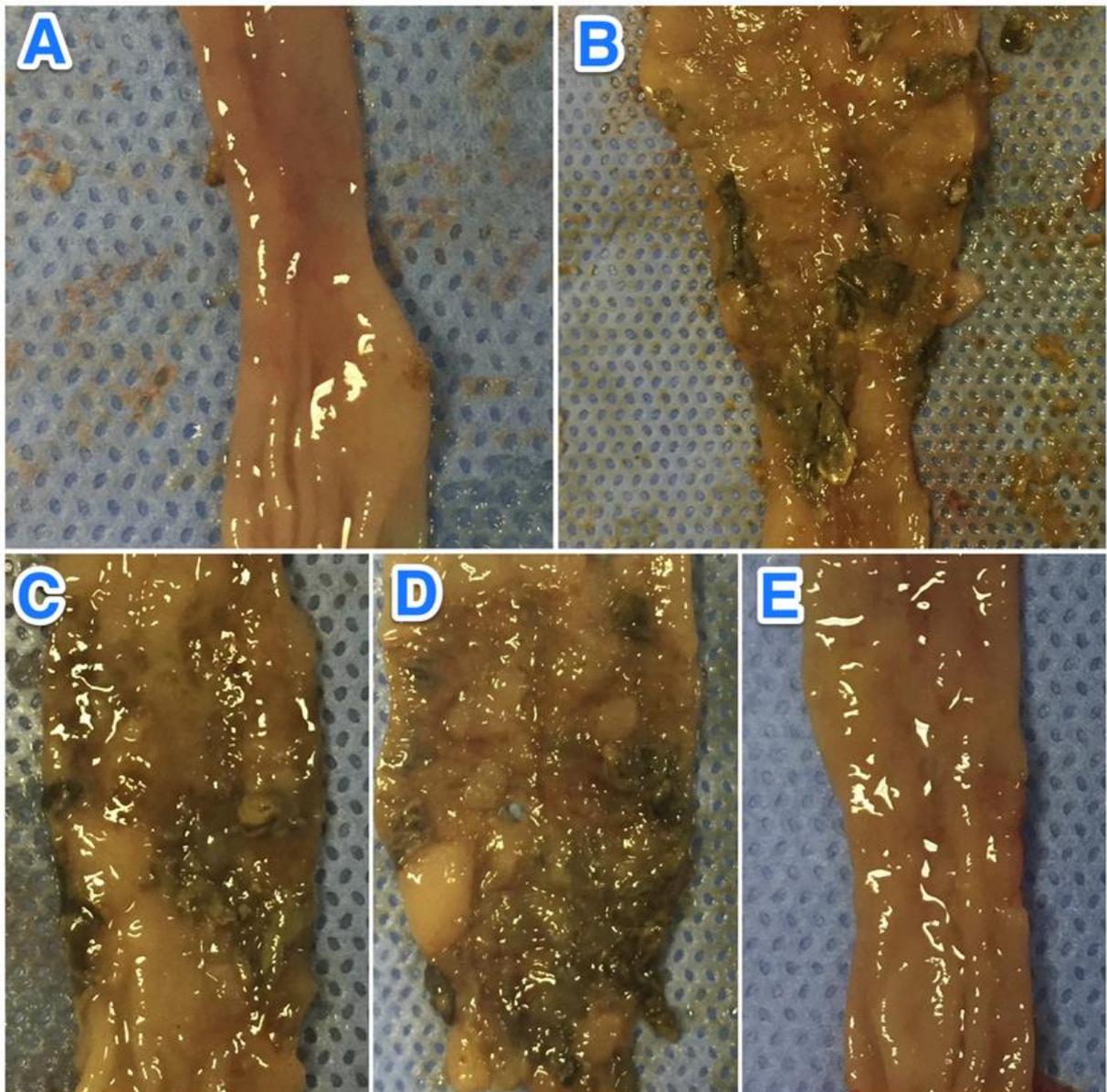
### **4.2.3 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA**

Houve um aumento significativa dos escores macroscópicos de atividade inflamatória no grupo Colite, sete dias após a indução da colite pelo TNBS, quando comparados com os grupos Sham e Dexametasona, conforme pode ser observado na figura 14. Não houve diferença entre os escores dos grupos Goma do Cajueiro 10 e 30 mg/Kg em relação ao grupo Colite.

Na figura 15 se observam úlceras, hiperemia de mucosa e edema de parede nos segmentos colônicos dos animais do grupo Colite, Goma do Cajueiro 10 e 30 mg/Kg, enquanto que os grupos Sham e Dexametasona apresentam-se macroscopicamente normais.



Figura 15 – Fotografias mostrando o aspecto macroscópico colônico após abertura longitudinal dos mesmos. (A) Grupo Sham, (B) Grupo Colite, (C) Grupo Goma do Cajueiro 10 mg/Kg, (D) Grupo Goma do Cajueiro 30 mg/Kg e (E) Grupo Dexametasona.



#### 4.2.4 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA

A avaliação histopatológica após 7 dias mostrou que os animais dos grupos Colite apresentaram aumento nos escores inflamatórios quando comparados aos do grupo Sham e do grupo Dexametasona, enquanto que não houve diferença significativa em relação aos escores dos grupos Goma do Cajueiro 10 e 30 mg/Kg (Figura 16).

A tabela 1 mostra aumento significativo de todos os critérios microscópicos de inflamação, exceto ausência de células caliciformes, no grupo Colite em relação ao grupo Sham, bem como elevação dos critérios perda de arquitetura da mucosa, infiltração celular e espessamento da camada muscular, quando comparados com o grupo Dexametasona. Não houve diferença significativa entre nenhum dos critérios nos grupos Goma do Cajueiro 10 e 30 mg/Kg, quando comparados ao grupo Colite.

A figura 17 ilustra os resultados da avaliação microscópica, evidenciando o processo inflamatório intenso nos animais do grupo Colite, com a presença de infiltrado celular, perda da arquitetura da mucosa, espessamento da camada muscular, formação de abscessos de cripta e depleção de células caliciformes. Nos grupos Sham e Dexametasona observa-se o aspecto colônico normal, enquanto que os grupos Goma do Cajueiro 10 e 30 mg/Kg apresentam manutenção do padrão inflamatório.

Figura 16 – Avaliação microscópica de atividade inflamatória (escore total). Os resultados são expressos como média ± E.P.M e foram analisados pelo teste de Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Dunn’s. \*\*p< 0,005 versus Grupo Sham;  $\psi$ p< 0,05 versus grupo Colite. GC: Goma do cajueiro.

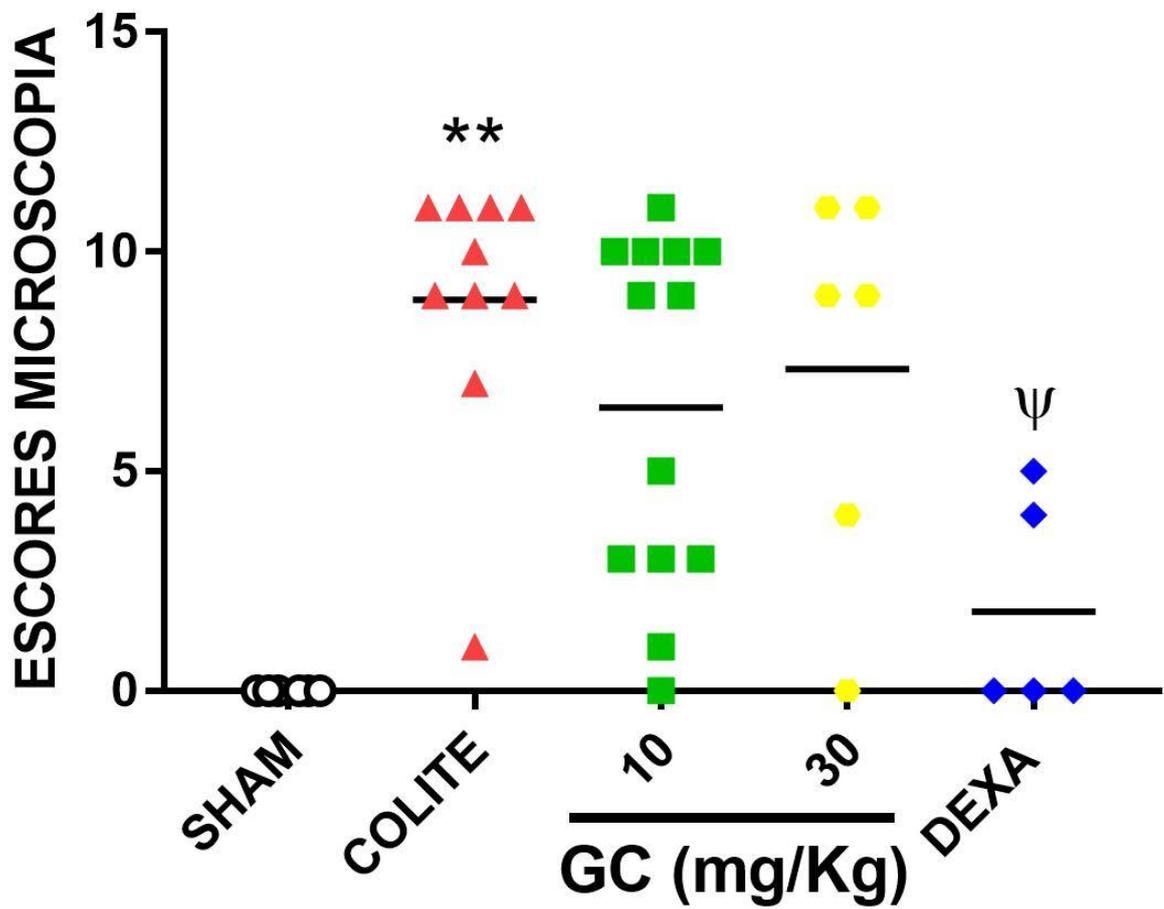
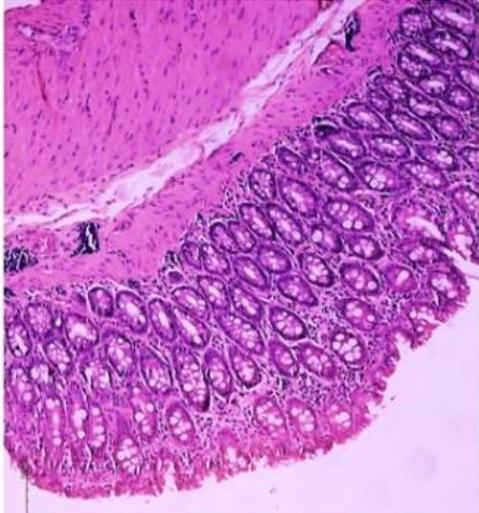


Tabela 1 – Escores das alterações microscópicas colônicas em ratos com e sem colite induzida pelo TNBS. Os resultados são expressos como mediana com mínimo e máximo mostrados nos parênteses. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Dunn´s. \*p< 0,05 versus Grupo Sham; \*\*p< 0,005 versus Grupo Sham; \*\*\*\*p< 0,0001 versus Grupo Sham, ψp< 0,05 versus grupo Colite.

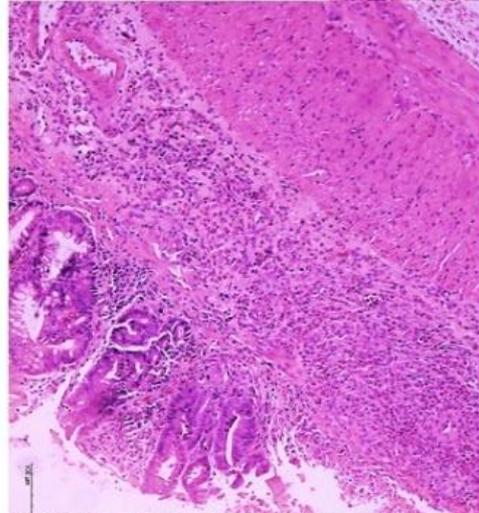
GRUPOS EXPERIMENTAIS (N: 5-13)	PERDA DE ARQUITETURA DA MUCOSA (0-3)	INFILTRAÇÃO CELULAR (0-3)	ESPESSAMENTO DA CAMADA MUSCULAR (0-3)	FORMAÇÃO DE ABSCESSO EM CRIPTA (0-1)	AUSÊNCIA DE CÉLULAS CALICIFORMES (0-1)
SHAM	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
COLITE	3 (2-3) **	3 (1-3) **	1 (1-3) **	1 (1-1) ****	1 (0-1)
GOMA DO CAJUEIRO 10 MG/KG	3 (0-3)	3 (1-3)	1 (0-3)	1 (0-1)	1 (0-1)
GOMA DO CAJUEIRO 30 MG/KG	3 (0-3)	3 (0-3)	1 (0-3)	1 (0-1)	1 (0-1)
DEXA	0 (0-2) ψ	0 (0-1) ψ	0 (0-1) ψ	0 (0-1)	0 (0-0)

Figura 17 – Fotomicrografias colônicas em ratos, com magnificação de 100x. Animais dos grupos Sham e Dexametasona apresentam arquitetura colônica íntegra. Alterações inflamatórias foram observadas em animais do grupo Colite, Goma do Cajueiro 10 e 30 mg/Kg. Seta verde indica perda da arquitetura mucosa e seta amarela

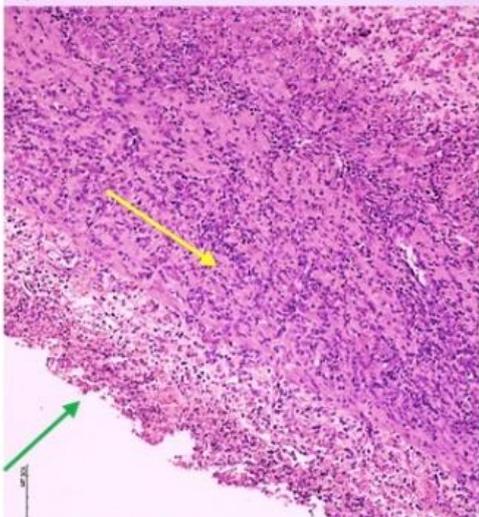
celular inflamatório.



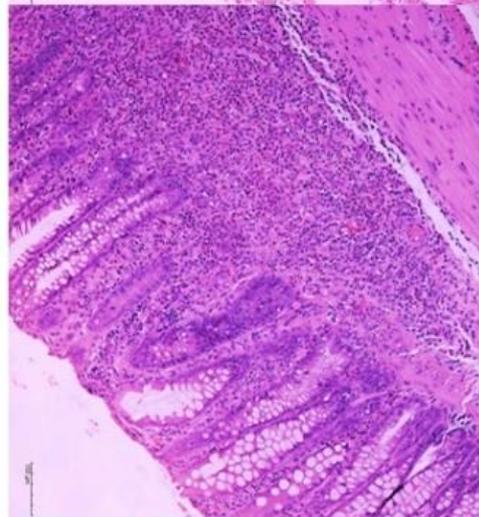
SHAM



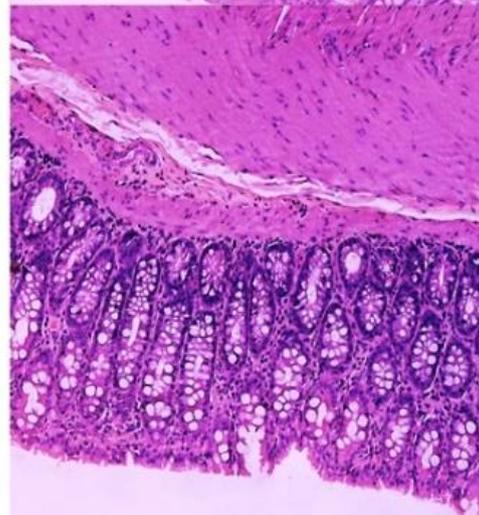
GC 10



COLITE



GC 30

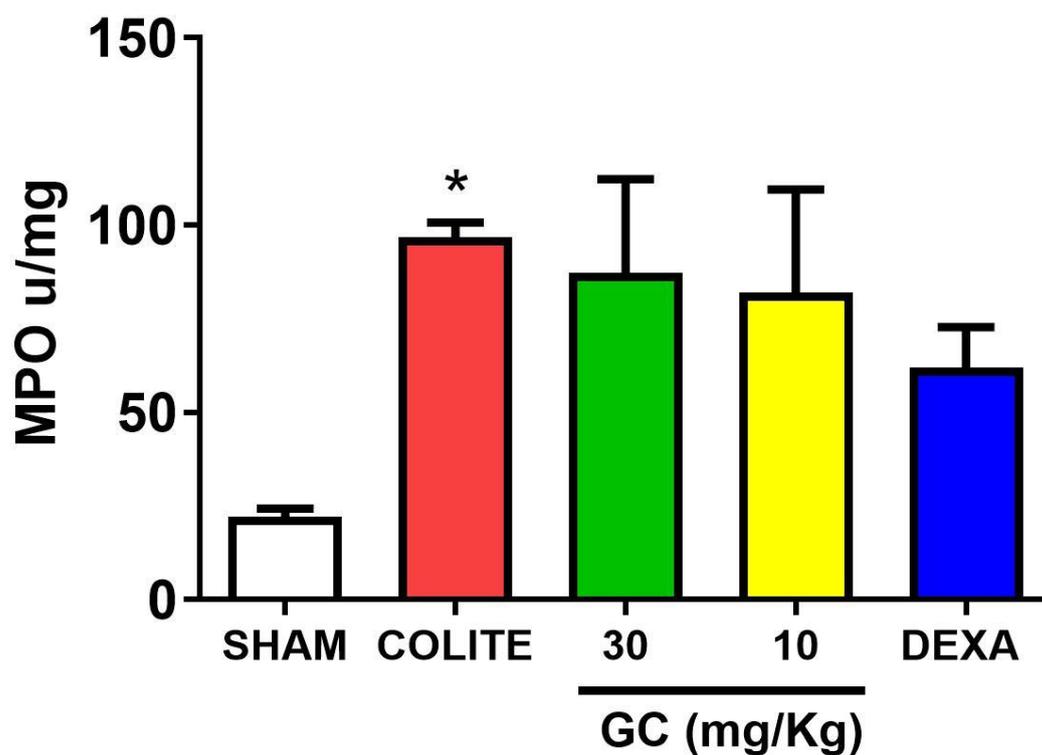


DEXA

#### **4.2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)**

Após 7 dias observou-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da atividade da mieloperoxidase, um marcador indireto de infiltração neutrofílica, nos animais do grupo Colite quando comparados com aqueles do grupo Sham (Figura 19). Na comparação dos animais dos grupos Dexametasona, Goma do cajueiro 10 mg/Kg e Goma do cajueiro 30 mg/Kg com aqueles do grupo Colite não houve diferença estatística.

Figura 19 – Atividade da MPO. As colunas representam a média  $\pm$  EPM do n<sup>o</sup> de neutrófilos/mg de tecido e foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham. GC: Goma do cajueiro.



## 5 DISCUSSÃO

Embora a etiologia precisa das doenças inflamatórias intestinais (DIIs) permaneça desconhecida, vários fatores tem sido relacionados na sua patogenia. Se destacam as alterações genéticas, o balanço dinâmico entre a flora bacteriana comensal e as respostas de defesa dos hospedeiros, especialmente com a barreira mucosa. Quando alterados os mecanismos de reconhecimento antigênico, autofagia e fagocitose, há uma remoção incompleta dos patógenos e manutenção da resposta imune, aumentando a produção de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 e IL-23, em detrimento das supressoras como IL-10 (XAVIER; PODOLSKY, 2007).

A maioria dos medicamentos utilizados no tratamento das DIIs tem como alvo o bloqueio dessa cascata inflamatória. Entretanto, mesmo os agentes biológicos e sua ação em uma citocina específica, apresentam taxas de remissão em torno de 60%, e efeitos adversos de gravidade variada, incluindo maior taxa de complicações infecciosas, risco aumentado de desenvolvimento de infecções oportunistas e linfoma (GOMOLLÓN et al., 2017).

No presente estudo de caráter experimental, foram demonstradas as ações da goma do cajueiro (GC) em um modelo de colite induzida pelo ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) diluído em etanol a 50% em ratos. Esse modelo tem sido amplamente usado por produzir uma inflamação intensa, transmural e granulomatosa, simulando as características clínicas e patológicas encontradas na doença de Crohn em humanos (MORRIS et al., 1989). Os nossos resultados confirmaram a efetividade do modelo visto que no grupo com animais submetidos à indução da colite pelo TNBS houve, após 07 dias, um aumento significativo do peso úmido colônico, dos escores macroscópicos e microscópicos de resposta inflamatória, e da atividade da mieloperoxidase (MPO).

A disfunção da barreira mucosa tem sido apontada como fator importante da etiopatogenia das DIIs, sendo encontrada em 30 a 65% dos pacientes com doença de

Crohn (BENJAMIN et al., 2012). Hilsden e colaboradores relataram que a presença de alteração da permeabilidade intestinal, medida pela taxa de excreção urinária de lactulose/manitol, em pacientes com DC aumenta em sete vezes o risco de recaída (HILSDEN et al., 1999). Baseado nisso várias substâncias tem sido estudadas na terapêutica das DIIs por sua ação na recuperação da barreira mucosa. Peng e colaboradores mostraram melhora da barreira mucosa em cultura de células CACO-2 (*Human caucasian colon adenocarcinoma*) após a utilização de butirato em baixa concentração (2 mM) (PENG et al., 2007). Em um ensaio clínico controlado, duplo cego e randomizado o tratamento tópico de RCU distal refratária com a associação do butirato ao 5-ASA foi mais efetivo do que com 5-ASA isoladamente (P. et al., 2003). A glutamina foi outro nutriente testado para o tratamento das DIIs. Benjamin e colaboradores demonstraram melhora da permeabilidade em pacientes com DC em remissão após 2 semanas de suplementação oral com glutamina (BENJAMIN et al., 2012).

Em nosso estudo não foram observadas alterações na permeabilidade nos segmentos colônicos sem colite (grupo Sham) após a aplicação *in vitro* da goma do cajueiro. Acreditamos que deve ser necessário algum dano tecidual para que haja a adesão da goma de cajueiro e que por isso não houve interferência na permeabilidade nos segmentos sãos. No entanto, quando o mesmo processo foi realizado em segmentos colônicos de animais após 7 dias de indução da colite pelo TNBS houve uma diminuição significativa da permeabilidade com a adição da goma do cajueiro. Essa melhora *in vitro* da permeabilidade abre a possibilidade de aplicação terapêutica da GC em colite através da restauração da barreira mucosa.

Em sua tese, Nicolau mostrou aderência luminal da goma do cajueiro a 10% à mucosa esofágica de pacientes com doença do refluxo gastroesofágico, com aumento da resistência elétrica transepitelial e diminuição da permeabilidade mantida até uma hora após a aplicação deste polissacarídeo. Ele sugere que a natureza aniônica da goma do cajueiro e elevada capacidade de ligação a resíduos de aminoácidos de mucina, carregados positivamente, ou ao próprio epitélio esofágico, justificaria esse efeito protetor. Além disso, seu trabalho demonstrou que mesmo uma dose elevada da goma do cajueiro (2000 mg/kg) não produziu nenhum efeito tóxico sobre os animais (NICOLAU, 2018). Figueiredo e colaboradores demonstraram ação tópica protetora da goma do cajueiro em laringe de camundongos, com redução da permeabilidade

após exposição ao ácido, que relacionam as propriedades muco-adesivas desse polissacarídeo (FIGUEIREDO et al., 2018). Parte do efeito gastroprotetor da goma do cajueiro observado em ratos Wistar após exposição ao naproxeno também foi creditado ao retorno da camada de muco à níveis semelhantes dos animais do grupo controle, sem exposição ao medicamento (CARVALHO et al., 2015). Acreditamos que a goma do cajueiro adere à mucosa colônica de forma semelhante, exercendo uma função de barreira semelhante a desempenhada pela mucina na mucosa normal. O mecanismo de ação exato deste achado ainda necessita ser identificado.

Além da ação relativa à sua propriedade muco-adesiva, vários estudos tem sugerido outros efeitos da goma do cajueiro. Carvalho e colaboradores mostraram que após a utilização da goma do cajueiro em ratos com dano gastrointestinal induzido pelo naproxeno houve uma diminuição dos níveis de mieloperoxidase (MPO), um marcador indireto de infiltração neutrofílica, e malondialdeído (MDA), um metabólito do processo de peroxidação lipídica, além de elevação da GSH (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina), que atua como antioxidante endógeno. Concluíram que parte do efeito gastroprotetor da goma do cajueiro se devia a sua ação anti-inflamatória, reduzindo a infiltração neutrofílica e produção de radicais livres, e antioxidante, diminuindo a peroxidação lipídica (CARVALHO et al., 2015). Yamassaki e colaboradores estudaram o efeito da goma do cajueiro em macrófagos peritoneais murinos estimulados com lipopolissacarídeo. Demonstraram baixa citotoxicidade de GC, redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e INF- $\gamma$  e aumento da IL-10, de ação anti-inflamatória (YAMASSAKI et al., 2015). Além disso, já foi demonstrado que a GC também age como anti-diarreico em roedores tanto em diarreia aguda induzida com óleo de rícino, quanto em diarreia inflamatória induzida pela prostaglandina E2 (PGE2) e também na diarreia secretória (induzida pela toxina colérica) (ARAÚJO et al., 2015).

Com o nosso achado de melhora na permeabilidade *in vitro* no tecido colônico após indução de colite, associado às atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e anti-diarreicas da goma do cajueiro já descritas, esse polissacarídeo apresentaria um potencial terapêutico nas doenças inflamatórias intestinais. Deste modo foi testada sua ação anti-inflamatória no modelo de colite induzida por TNBS.

Na avaliação de aderências intra-cavitárias, que estão relacionadas ao processo inflamatório transmural desenvolvido pelo TNBS, não houve melhora significativa após o uso da goma do cajueiro na dose de 10 mg/Kg, nem de 30 mg/Kg. Não houve redução peso úmido após os sete dias de tratamento com a GC em nenhuma das dosagens. Os escores de atividade inflamatória macroscópicos não mostraram diferença entre os animais com colite não tratados e aqueles que receberam a GC em ambas as doses. De maneira similar nenhum dos critérios microscópicos de inflamação (perda de arquitetura da mucosa, infiltração celular, espessamento da camada muscular, formação de abscesso em cripta e ausência de células caliciformes) foi reduzido significativamente após o tratamento com as duas dosagens da goma do cajueiro, conseqüentemente o escore histopatológico também não foi alterado pela aplicação do polissacarídeo. Os níveis de MPO se elevaram nos animais com colite, evidenciando infiltração neutrofílica, mas não houve redução após o tratamento com a goma do cajueiro nas duas dosagens. Baseado nesses dados constatamos que o tratamento por 7 dias pelo enema com a goma de cajueiro não apresentou ação anti-inflamatória no modelo de colite utilizado.

Na literatura apenas um polissacarídeo, o astrágalo, derivado da *Astragalus membranaceus*, erva amplamente utilizada na medicina tradicional chinesa para fortalecimento imune, mostrou ação anti-inflamatória em um modelo de colite induzida pelo TNBS. Os autores atribuíram esse efeito a uma diminuição da expressão IL-2, IL-6, IL-17, IL-23 e ROR- $\gamma$ t e aumento nos níveis de TGF- $\beta$  e STAT-5, que levaria ao aumento nos níveis e da ação inibitória dos linfócitos Treg (ZHAO et al., 2016).

A goma do cajueiro é um polissacarídeo hidrofílico de viscosidade baixa, cuja adsorção é diretamente influenciada pelo pH, de modo que em meios mais ácidos, com pH em torno de 4, a sua adesão a superfícies sólidas é maior (RIBEIRO et al., 2016). Considerando que parte importante da ação biológica da GC depende do efeito tópico, por suas propriedades muco-adesivas, e que o pH colônico dos ratos está em torno de 5,9 (MCCONNELL; BASIT; MURDAN, 2008) possivelmente a aderência da GC *in vivo* ao cólon dos animais, foi menor do que a encontrada nos segmentos gastrointestinais mais altos e de pH mais baixo. Além disso, entendemos que nos modelos experimentais citados previamente, utilizados na laringe (FIGUEIREDO et al., 2018), esôfago (NICOLAU, 2018) e estômago (CARVALHO et al., 2015), o processo inflamatório induzido ocorre de forma mais superficial, acometendo

principalmente a mucosa destes órgãos, o que proporcionaria um melhor alvo terapêutico para a ação tópica da goma do cajueiro. No modelo experimental de colite induzida pelo TNBS há uma inflamação transmural de modo que deve ser necessário um mecanismo de ação mais sistêmico para que o processo inflamatório seja debelado. Nossos resultados mostram melhora significativa de todos os parâmetros inflamatórios, com exceção na taxa de MPO, nos animais tratado com dexametasona por via intraperitoneal, confirmando essa hipótese.

Em resumo, este estudo demonstra que a goma do cajueiro apresenta uma melhora na permeabilidade colônica *in vitro*, no modelo de colite induzida pelo TNBS. Esse efeito de barreira provavelmente está relacionado às suas propriedades mucoadesivas e pode potencialmente proteger a mucosa colônica, bloqueando o contato com substâncias agressoras, algo a ser explorado em estudos futuros. Entretanto não houve efeito anti-inflamatório *in vivo* após 7 dias de tratamento com aplicação retal deste polissacarídeo em ratos com a colite transmural após a indução pelo TNBS. Estudos *in vivo* poderão ser realizados a fim de determinar se a ação tópica da goma do cajueiro verificada neste trabalho poderá ser efetiva utilizando modelos experimentais de colite mais superficiais, como a induzida pelo dextran sulfato de sódio, simulando as características clínicas e histológicas da retocolite ulcerativa (LAROUI et al, 2012).

## 6 CONCLUSÕES

A partir de nossos resultados podemos concluir que o biopolímero, goma do cajueiro, apresenta um efeito de barreira *in vitro* em animais com colite induzida pelo TNBS, constatada pela melhora da permeabilidade colônica.

No entanto, a goma do cajueiro não teve ação anti-inflamatória em ratos com colite induzida pelo TNBS, já que não melhorou nenhum dos parâmetros inflamatórios utilizados neste estudo.

## REFERÊNCIAS

- ABIODUN, O. O. et al. Antiinflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae): In vitro and in vivo evidences. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 309–319, 2016.
- AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- APPLEYARD, C. B.; WALLACE, J. L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. **Am. J. Physiol**, v. 269, p. 119–25, 1995.
- ARAÚJO, T. S. L. et al. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 299–307, 2015a.
- ARAÚJO, T. S. L. et al. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 299–307, 2015b.
- BEMELMAN, W. A. et al. ECCO-ESCP consensus on surgery for Crohn's disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2018.
- BENJAMIN, J. et al. Glutamine and whey protein improve intestinal permeability and morphology in patients with crohn's disease: A randomized controlled trial. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 57, n. 4, p. 1000–1012, 2012.
- CAMPOS, D. A. et al. Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 270–274, 2012.
- CARVALHO, N. S. et al. Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Drug Development Research**, v. 76, n. 3, p. 143–151, 2015.
- CHEN, Q. Q. et al. Mesenchymal stem cells alleviate TNBS-induced colitis by

modulating inflammatory and autoimmune responses. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 29, p. 4702–4717, 2013.

CURY, M. DE S. Diagnóstico endoscópico das doenças inflamatórias intestinais. In: MOSS, A. C.; CURY, D. B. (Eds.). . **Doenças Inflamatórias Intestinais**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Rubio Ltda., 2015. p. 41–49.

DA SILVA, D. P. B. et al. Chemical characterization and pharmacological assessment of polysaccharide free, standardized cashew gum extract (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 213, n. November 2017, p. 395–402, 2018.

D'HAENS, G et al. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet*, v. 371, n. 9613, p. 660–667, 2008.

FIGUEIREDO, A. A. et al. Topical protection of mice laryngeal mucosa using the natural product cashew gum. **Laryngoscope**, v. 128, n. 5, p. 1157–1162, 2018.

GOMOLLÓN, F. et al. 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: Part 1: Diagnosis and medical management. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 11, n. 1, p. 3–25, 2017.

HALFELD, L. C. O. Epidemiologia das Doenças Inflamatórias Intestinais. In: CURY, D. B.; MOSS, A. C. (Eds.). . **Doenças Inflamatórias Intestinais**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Rubio Ltda., 2015. p. 3–11.

HILSDEN, R. J. et al. Intestinal permeability and postheparin plasma diamine oxidase activity in the prediction of Crohn's disease relapse. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 5, n. 2, p. 85–91, 1999.

HOLLANDER, D. et al. Increased Intestinal Permeability in Patients with Crohn's Disease and Their Relatives. **Annals of Internal Medicine**, v. 105, n. 14, p. 883–885, 1986.

LANDY, J. et al. Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 11, p. 3117–3126, 2016.

LAROUÏ H., et al. Dextran Sodium Sulfate (DSS) Induces Colitis in Mice by Forming Nano-Lipocomplexes with Medium-Chain-Length Fatty Acids in the Colon. **PLoS ONE**

7(3): e32084, 2012.

LIBERTUCCI, J. et al. Inflammation-related differences in mucosa-associated microbiota and intestinal barrier function in colonic Crohn's disease. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, p. 420–431, 2018.

LU, Y. et al. Sijunzi Decoction attenuates 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats and ameliorates TNBS-induced claudin-2 damage via NF-KB pathway in Caco2 cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2017.

MAASER, C. et al. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detections of complications. **Journal of Crohn's and Colitis**, 2018.

MAGRO, F. et al. Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 1: Definitions, diagnosis, extra-intestinal manifestations, pregnancy, cancer surveillance, surgery, and ileo-anal pouch disorders. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 11, n. 6, p. 649–670, 2017.

MATEUS, V. et al. Anti-Inflammatory Effect of Erythropoietin in the TNBS-induced Colitis. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 120, n. 2, p. 138–145, 2017.

MCCONNELL, E. L.; BASIT, A. W.; MURDAN, S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 1, p. 63–70, 2008.

MICHIELAN, A.; D'INCÀ, R. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

MIZPUTEN, S. J.; CURY, D. B. Manifestações clínicas da doença de Crohn. In: MOSS, A. C.; CURY, D. B. (Eds.). . **Doenças Inflamatórias Intestinais**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Rubio Ltda., 2015a. p. 24–30.

MIZPUTEN, S. J.; CURY, D. B. Manifestações clínicas da retocolite ulcerativa. In: MOSS, A. C.; CURY, D. B. (Eds.). . **Doenças Inflamatórias Intestinais**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Rubio Ltda., 2015b. p. 31–38.

MOLODECKY, N. A. et al. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases. p. 46–54, 2012.

MORRIS, G. P. et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v. 96, n. 3, p. 795–803, 1989.

MURAD-REGADAS, S. M. et al. Effect of soluble fiber or fructooligosaccharide supplementation upon trinitrobenzenesulphonic acid induced colitis in rats. **Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**, v. 21, n. 5, p. 315–320, 2006.

NAIR, S. K.; BHAT, I. K.; AURORA, A. L. Role of Proteolytic Enzyme in the Prevention of Postoperative Intraperitoneal Adhesions. **Archives of Surgery**, v. 108, n. 6, p. 849–853, 1974.

NG, S. C. et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **The Lancet**, v. 390, n. 10114, p. 2769–2778, 2017.

NICOLAU, L. A. D. Efeito esofagoprotetor de um biopolímero, a goma do cajueiro, na doença do refluxo não-erosiva em murinos e em biópsias esofágicas humanas: perfil anti-inflamatório e efeito tópico. 117 f. **Tese (Doutorado em Farmacologia)** Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2018.

ØRESLAND, T. et al. European evidence based consensus on surgery for ulcerative colitis. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 9, n. 1, p. 4–25, 2015.

P., V. et al. Topical butyrate improves efficacy of 5-ASA in refractory distal ulcerative colitis: Results of a multicentre trial. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 33, n. 3, p. 244–248, 2003.

PAULA, R. C. M. DE; HEATLEY, F.; BUDD, P. M. Characterization of Anacardium occidentale Exudate Polysaccharide. **Polymer International**, v. 45, n. 1, p. 27–35, 1998.

PAULA, R. C. M. DE; SANTANA, S. A.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of Albizia lebbeck gum exudate. v. 44, p. 133–139, 2001.

PENG, L. et al. Effects of butyrate on intestinal barrier function in a caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. **Pediatric Research**, v. 61, n. 1, p. 37–41, 2007.

- RASHIDIAN, A. et al. Atorvastatin attenuates TNBS-induced rat colitis: the involvement of the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Inflammopharmacology**, v. 24, n. 2–3, p. 109–118, 2016.
- RIBEIRO, A. J. et al. Gums' based delivery systems: Review on cashew gum and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 188–200, 2016.
- SHEPHERD, C. et al. A medicinal plant compound, capnoidine, prevents the onset of inflammation in a mouse model of colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 211, n. September 2017, p. 17–28, 2018.
- SILVA, D. A. DA et al. Synthesis and characterization of cashew gum / acrylic acid nanoparticles. **Materials Science & Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 437–441, 2009.
- SOUBH, A. A.; ABDALLAH, D. M.; EL-ABHAR, H. S. Geraniol ameliorates TNBS-induced colitis: Involvement of Wnt/ $\beta$ -catenin, p38MAPK, NF $\kappa$ B, and PPAR $\gamma$  signaling pathways. **Life Sciences**, v. 136, p. 142–150, 2015.
- SOUZA, H. S. P. DE. Etiologia e Patogênese das Doenças Inflamatórias Intestinais: Conceitos Atuais. In: CURY, D. B.; MOSS, A. C. (Eds.). . **Doenças Inflamatórias Intestinais**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Rubio Ltda., 2015. p. 12–23.
- VIEGAS, G. et al. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 149–154, 2006.
- VIVINUS-NÉBOT, M. et al. Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: Role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. **Gut**, v. 63, n. 5, p. 744–752, 2014.
- XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 427–434, 2007.
- XU, B. et al. Geniposide ameliorates TNBS-induced experimental colitis in rats via reducing inflammatory cytokine release and restoring impaired intestinal barrier function. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 2017, n. 38, p. 688-698, 2017.
- YAKYMENKO, O. et al. Infliximab restores colonic barrier to adherent-invasive *E. coli* in Crohn's disease via effects on epithelial lipid rafts. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 53, n. 6, p. 677–684, 2018.

YAMASSAKI, F. T. et al. Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 241–248, 2015.

ZHAO, H. M. et al. Astragalus polysaccharide attenuates rat experimental colitis by inducing regulatory T cells in intestinal Peyer's patches. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 11, p. 3175–3185, 2016.

## **ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430970 Fortaleza – CE

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE GOMA DE CAJU EM ANASTOMOSE COLÔNICA DE RATOS COM COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO TRINITROBENZENOSSULFÔNICO”, protocolo 121/16, sob responsabilidade de Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização, pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 27 de junho de 2017.

Vigência do projeto	01/07/2017 à 31/12/2017
Espécie/Linhagem	Rato Wistar
Nº de Animais	72
Peso	250 g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UFC



Fortaleza, 29 de junho de 2017

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Coordenador do CEUA UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**ALEXANDRE HAVT BINDÁ**  
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 100002

**ANEXO 2 – TABELAS DE DADOS**

## ANÁLISE DE PERMEABILIDADE

<b>Tempo (min)</b>	<b>Sham sem GC 1</b>	<b>Sham sem GC 2</b>	<b>Sham sem GC 3</b>	<b>Sham sem GC 4</b>	<b>Sham sem GC 5</b>
0	0	0	0	0	0
30	327,6154	98,90476	934,5	23,83333	194,3
60	476	143,6667	1638	26,3	360,3
90	543,4615	171,4762	1780	34,76667	492,7
<b>Tempo (min)</b>	<b>Sham com GC 1</b>	<b>Sham com GC 2</b>	<b>Sham com GC 3</b>	<b>Sham com GC 4</b>	<b>Sham com GC 5</b>
0	0	0	0	0	0
30	48,15	35,4	141,1	160	119,5
60	93,2	347,5	261,6	167,8	239,5
90	113,2	591	341,3	162,1	364,5

Unpaired t test, P: 0,1959

<b>Tempo (min)</b>	<b>Colite Com GC 1</b>	<b>Colite Com GC 2</b>	<b>Colite Com GC 3</b>	<b>Colite Com GC 4</b>	<b>Colite Com GC 5</b>
0	0	0	0	0	0
30	102,0526	1,516129	12,46	11	31,7
60	127,6842	4,145161	19,09	37,11475	37,3
90	154,3684	8,177419	22,65	62,27869	48,2
<b>Tempo (min)</b>	<b>Colite Sem GC 1</b>	<b>Colite Sem GC 2</b>	<b>Colite Sem GC 3</b>	<b>Colite Sem GC 4</b>	<b>Colite Sem GC 5</b>
0	0	0	0	0	0
30	32	45,4	36,54546	25,97561	12,6
60	141,8333	113,6	63,68182	98,7317	15,8
90	248,0833	159,1	101	154,439	20,7

Unpaired t test, P: 0,0472

## ESCORE DE ADERÊNCIAS

SHAM	COLITE	GC 10	GC 30	DEXA
0	3	0	0	0
0	3	1	1	0
0	2	3	3	0
0	2	1	0	
0	2	1	1	0
0	2	1	3	0

Dunn's multiple comparisons test

SHAM vs. COLITE – P: 0,0020

COLITE vs. GC 10 – P: 0,6763

COLITE vs. GC 30 – P: 0,6116

COLITE vs. DEXA – P: 0,0034

### PESO ÚMIDO

SHAM	COLITE	GC 10	GC 30	DEXA
0,41	2,84	0,79	0,75	1,15
0,48	7,38	1,54	1,42	0,94
0,45	1,46	2,12	1,91	0,65
0,69	2,18	1,16	0,65	
0,65	1,78	3,03	1,97	1,08
0,66	1,39	1,28	7,14	0,65
	1,78			
	1,714			
	1,232			
	1,198			

Dunn's multiple comparisons test

SHAM vs. COLITE – P: 0,009

COLITE vs. GC 10 – P: > 0,999

COLITE vs. GC 30 – P: > 0,999

COLITE vs. DEXA – P: 0,0289

### ESCORE DE MORRIS - MACROSCOPIA

SHAM	COLITE	GC 10	GC 30	DEXA
3	5	3	3	4
3	5	4	6	3
3	6	5	6	3
4	5	3	4	
4	5	6	4	4
4	5	4	6	3
	4			
	5			
	4			
	5			

Dunn's multiple comparisons test

SHAM vs. COLITE – P: 0,0473

COLITE vs. GC 10 – P: > 0,999

COLITE vs. GC 30 – P: 0,1908

COLITE vs. DEXA – P: 0,0408

### ESCORE MICROSCOPIA

SHAM	COLITE	GC 10	GC 30	DEXA
0	9	10	4	4
0	11	9	9	5
0	10	5	11	0
0	6	10	0	0
0	9	10	9	0
0	9	11	11	
	7			
	1			
	11			
	11			

Dunn's multiple comparisons test

SHAM vs. COLITE – P: 0,0013

COLITE vs. GC 10 – P: > 0,999

COLITE vs. GC 30 – P: > 0,999

COLITE vs. DEXA – P: 0,0480

### ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE

<b>SHAM</b>	<b>COLITE</b>	<b>GC 10</b>	<b>GC 30</b>	<b>DEXA</b>
16,54482	94,45941	103,1166	88,88034	80,99269
27,3182	76,37553	26,93344	3,46287	33,28203
18,27626	104,4633	-4,61716	157,5606	56,7526
23,66295	-12,3124	115,6214	74,64409	114,8519
48,86495	84,45556	-2,30858	-3,27049	76,56791
25,39438	-10,7734	-4,42478	111,1966	
	73,4898			
	-5,57907			
	94,65179			
	105,8099			

Dunn's multiple comparisons test

SHAM vs. COLITE – P: 0,0139

COLITE vs. GC 10 – P: > 0,999

COLITE vs. GC 30 – P: > 0,999

COLITE vs. DEXA – P: 0,6186