

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**ANÁLOGOS DE HEPARINA EXTRAÍDOS DA
ASCÍDIA *Styela plicata* COM POTENTE
EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO EM MODELO
DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL.**

CELSO LUIS RIBEIRO BELMIRO

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



ANÁLOGOS DE HEPARINA EXTRAÍDOS DA ASCÍDIA *Styela plicata* COM POTENTE EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO EM MODELO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL.

CELSO LUIS RIBEIRO BELMIRO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica e apresentada ao Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Química Biológica).

Orientador: Mauro Sérgio Gonçalves Pavão

Rio de Janeiro
abril de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA**Belmiro,C.L.R.**

Análogos de heparina extraídos da ascídia *Styela plicata* com potente efeito anti-inflamatório em modelo de doença inflamatória intestinal/ Celso Luis Ribeiro Belmiro. Rio de Janeiro: UFRJ/ ICB, 2008

xvii, 85f.: il.: 30cm

Tese (Doutorado) – UFRJ/ ICB/ Programa de Pós-graduação em Química Biológica, 2008.

Orientador: Mauro Sérgio Gonçalves Pavão

Referências Bibliográficas: f. 61-73.

1. Glicosaminoglicanos. 2. Doença inflamatória intestinal. 3. Matriz extracelular. 4. Mucosa intestinal. I. Pavão Mauro Sérgio Gonçalves. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de pós-graduação em Química Biológica. III. Análogos de heparina extraídos da ascídia *Styela plicata* com potente efeito anti-inflamatório em modelo de doença inflamatória intestinal.

CELSO LUIS RIBEIRO BELMIRO

ANÁLOGOS DE HEPARINA EXTRAÍDOS DA ASCÍDIA *Styela plicata* COM POTENTE EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO EM MODELO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL.

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica e apresentada ao Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Química Biológica).

Aprovado por:

Prof. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão, Doutor em Ciências,
Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ (orientador)

Prof. Aurélio Vicente Graça de Souza, Doutor em Química Biológica,
Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ

Prof. Silvana Allodi, Doutor em Ciências Biomédicas,
Professor associado do Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ

Prof. Marcelo Pelajo Machado, Doutor em Biologia celular e Molecular
Pesquisador associado e chefe do Departamento de Patologia, FIOCRUZ

Prof. Débora Foguel, Doutor em Bioquímica,
Professor associado do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ (revisor)

Anna Paola Trindade Rocha Pierucci, Doutor em Ciências de Alimentos,
Professor Adjunto do Instituto de Nutrição, UFRJ

Rio de Janeiro
abril de 2008

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu protetor que sempre me mostra o caminho a seguir, me dando sabedoria e humildade para caminhar a longa estrada do saber e da vida.

A minha mãe, Delia Assunção Ribeiro, por ter sido e ser sinônimo de amor.

Ao meu amor, vida e companheira, Vanessa Belmiro, amor de hoje amanhã e sempre. Quem eu admiro por sua força, nobreza e competência, e que me deixa com os olhos rasos de água quando lembro de tudo que já passamos juntos. Por seu amor, dedicação e carinho para comigo. E, pelo apoio nas horas mais difíceis desta caminhada. Te amo! E é claro, ao meu amigo e companheiro Bidu.

Ao meu pai, Amaro Belmiro, aquele com toda a sua simplicidade e dificuldades da vida, enxergou bem a frente, nunca deixando me faltar educação.

A minha irmã, Maria de Lurdes, por sempre ter acreditado e torcido por mim. E ao meu grande sobrinho, Kim.

Ao meu orientador, Mauro Pavão, por ter acreditado em mim, e me dado à oportunidade de fazer parte da família conjuntivo, seus ensinamentos, incentivos e orientação durante minha pós-graduação. Acima de tudo pela amizade!

Ao meu co-orientador, Dr. Heitor de Souza, do Laboratório Multidisciplinar, pela parceria com o nosso laboratório e pela dedicação, conhecimentos e competência empregados em nosso trabalho.

A Dr^a. Celeste Elia pela colaboração com o nosso laboratório, parceria esta que ainda irá muito longe.

A Morgana T. L. Castelo Branco, do Departamento de Histologia e Embriologia - DHE-ICB, pela sua amizade e colaboração com o nosso laboratório.

Ao meu pai-amigo, Carlos Terra, por ter acreditado em mim, e se hoje escrevo estas páginas, foi devido aos seus conselhos e empenho para que eu entrasse na Faculdade de Cabo Frio, onde tudo começou. E a grande artista plástica e bem humorada, Ester Terra, pelas boas gargalhadas e aventuras. E a minha sempre Carlinha.

Ao meu sogrão, Márcio Duque, pelo apoio e incentivos. E, a sua coleção de orquídeas, de onde eu colhi a mais bela e rara, *Vanessa belmirus*. E a sua também rara *Raquel duqui*, pelo carinho.

Aos companheiros de pesquisa, falar desta galera é muito complexo, pois a Família Conjuntivo, conforme o próprio nome já diz, é formado por uma conjunto

de pessoas unidas através dos mais variados sentimentos. Um grupo fraterno. Irmãos, irmãos com quem compartilhamos momentos tristes e alegres, irmãos de coração! Irmãos que eu vi chegarem e partirem, irmãos com quem nos desentendemos, calamos e até choramos. Mas principalmente sorrimos muito. Amigos e irmãos, cada um com seu jeito próprio de ser e de gostar, amigos que sem sombra de dúvida povoarão os meus sentimentos nos mais inesperados momentos. Numa conversa de bar, na sala de aula, na bancada de um laboratório, nos mais diferentes lugares em que a vida me levar. Jamais esquecerei de cada um de vocês que com a particularidade de cada um fazem parte de minha vida. Pois afinal de contas cada um de vocês é parte de um dos sentimentos mais nobre que habita em mim, a AMIZADE. E como diz o poeta Milton Nascimento “ Amigo é coisa para se guardar dentro do lado esquerdo do peito, dentro do coração...”

Portanto aqui vai o meu muito obrigado, muitos queridos, muitos amigos, muitos sentimentos, muito, muito Obrigado!!!!

MAURO PAVÃO, LEANDRA MELIN, JOANA CABRAL, ELIENE KOZLOWSKI, PAOLA LOPEZ, CAROLINA BLANCO, CINTIA MARIA, CRISTIANE SOBRAL, ANGELICA, RAFAEL AQUINO, FÁBIO RABELO, LEO CINELE, JÃO MARCELO, EDUARDO MIUDO, NELSON MILLER, EDUARDO VILANOVA, RICARDO VIGALO, ROBERTO ROBERTINO, RICARDO PEREIRA, VITOR PUMIM, MARIANA PEREIRA, ANA CRISTINA, MICHELE CASTRO, LIVIA LOIOLA, BRUNO VAIRO, BIANCA GLAUSER, MAISA LUCIANA, TUANE VIEIRA, ADRIANA BRIGITE, ANA TOVAR, PAULO MOURÃO, LUIS CLÁUDIO.

Aos professores Paulo Mourão, Luiz Cláudio, Ana Tovar, Ana Cristina e Mariana de Sá, pelos conhecimentos compartilhados.

Aos professores Do Instituto de Bioquímica Médica, pelo intercâmbio de conhecimentos, durante os cursos. Em especial a professora Débora Foguel, revisora de minha tese, pelo apoio. A Coordenadora do Curso de Pós Graduação em Química Biológica, Andréia Da Poian, pelo apoio. E a super secretária Teresa Lima, pelos esclarecimentos burocráticos, que sempre nos pegam pelas mãos e pés.

Ao saudoso mestre e amigo Professor Renato Azevedo, pelos exemplos de competência e amor dedicados à educação, que nos deixam saudades.

Aos professores que aceitaram fazer parte da banca examinadora de defesa de tese de Doutorado, contribuindo com os seus conhecimentos para o enriquecimento desta tese.

Aos meus amigos do Laboratório Multidisciplinar, o qual eu pude ter o privilégio de trabalhar durante minha pós-graduação. Em especial a Cesonia de Assis Martinusso e Alyson do Rosário Junior, pela dedicação e apoio nas técnicas de imunohistoquímica.

Ao professor Marcelo Pelajo, chefe do Departamento de Patologia, FIOCRUZ, pela disponibilidade de atender as solicitações para utilização do microscópio confocal. E a sua equipe operacional, Pedro Paulo e Bernardo.

A professora Anna Paola, pelo entusiasmo e colaboração com uma parte importante de nossas pesquisas futuras, a nanotecnologia.

Aos animais que fizeram parte integrante deste projeto, sem o qual este trabalho não poderia ter sido concluído.

Obrigado.

ANÁLOGOS DE HEPARINA EXTRAÍDOS DA ASCÍDIA *Styela plicata* COM POTENTE EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO EM MODELO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL.

CELSO LUIS RIBEIRO BELMIRO

Orientador: Mauro Sérgio Gonçalves Pavão

Resumo da tese de Doutorado submetido ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Química Biológica).

Os glicosaminoglicanos (GAGs), são os maiores constituintes da matriz extracelular e têm um papel importante na cicatrização de ferimentos. Existem algumas evidências de que a heparina possa ter efeitos terapêuticos benéficos na doença inflamatória intestinal (DII). Neste estudo, investigamos o efeito da heparina e dermatam sulfato obtidos da ascídia *Styela plicata* em modelo de colite em rato.

A colite foi induzida com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), em ratos Wistar, e os animais tratados com ambos, (heparina e dermatam sulfato), da ascídia ou de mamífero, com a administração subcutânea de 8mg/kg/dia, durante 7 dias. O

efeito do tratamento na mucosa inflamada foi monitorada macroscopicamente e histologicamente. As amostras do cólon foram analisadas quanto a infiltração de células mononucleares, expressão e localização subcelular do NFkB e p-ERK, através da técnica de imunohistoquímica. A atividade apoptótica foi avaliada utilizando a técnica do TUNEL. Os níveis de citocinas presente no cólon dos animais foram avaliados por ELISA no sobrenadante da cultura de tecidos. A quantidade e identificação dos GAGs foram determinadas pela quantidade de ácido exuroônico e eletroforese em gel de agarose, respectivamente. A ação anti-coagulante dos GAGs foi avaliada pelo tempo parcial de tromboplastina ativada (aPTT).

O tratamento com GAGs reduziu significativamente os escores macroscópico e histológico dos animais tratados com TNBS particularmente com a heparina da ascídia. O número de macrófagos e linfócitos presente no cólon dos animais tratados com TNBS, reduziu significativamente após o tratamento com GAGs, particularmente com a heparina da ascídia ($p < 0.001$). O aumento dos níveis de TNF- α , TGF- β e VEGF, no cólon inflamado foi restaurado a níveis basais após o tratamento com GAGs. O tratamento com GAGs inibiu a expressão e a translocação nuclear de ambos, NFkB ($p < 0.001$) e pERK ($p < 0.001$), nas células mononucleares do cólon dos animais tratados com TNBS. A apoptose das células epiteliais induzida por TNBS foi significativamente atenuada após o tratamento com GAGs ($p < 0.001$). A deposição de fibras de colágeno no cólon inflamado foi significativamente correlacionada com os níveis de TGF- β ($r: 0,71$, $p < 0.0001$), e diminuiu a níveis basais, após o tratamneto com GAGs ($p < 0.001$). O tratamento com TNBS induziu um aumento de cerca de 2.2 vezes na quantidade de GAGs

totais, com um relativo aumento do heparan sulfato e condroitim sulfato, e diminuição do dermatam sulfato. O tratamento com ambos, GAGs de mamífero e ascídia restaurou os níveis e proporção dos GAGs do cólon dos animais. A administração dos GAGs por 7 dias não produziu mudanças significativas no aPTT plasmático.

Os resultados acima mostram que a heparina e o dermatam sulfato da ascídia possuem forte efeito anti-inflamatório em um modelo animal de DII. A ausência de ação anti-coagulante dos GAGs, após administração subcutâneo, sustenta o uso destes GAGs no tratamento da DII sem o risco de hemorragia.

Palavras-chave: 1. Glicosaminoglicanos. 2. Doença inflamatória intestinal. 3. Matriz extracelular. 4. Mucosa intestinal.

ANÁLOGOS DE HEPARINA EXTRAÍDOS DA ASCÍDIA *Styela plicata* COM POTENTE EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO EM MODELO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL.

CELSO LUIS RIBEIRO BELMIRO

Orientador: Mauro Sérgio Gonçalves Pavão

Abstract da tese de Doutorado submetido ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Química Biológica).

Sulfated glycosaminoglycans (GAGs) are major constituents of the extracellular matrix and they have an important role in wound healing. There is some evidence showing that heparin may have beneficial therapeutic effects in inflammatory bowel disease (IBD). In this study, we investigated the effect of heparin and dermatan sulfate obtained from the ascidian *Styella plicata* on a rat model of colitis.

Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-colitis was induced in Wistar rats. Animals were treated with either ascidian or mammalian heparin and dermatan sulfate,

8mg/kg/day during 7 days subcutaneously. The effect of treatment on mucosal inflammation was assessed macroscopically and histologically. Colon samples were analyzed for mononuclear cell infiltration, expression and subcellular distribution of NF-kappaB and p-ERK, through immunohistochemistry. Apoptotic rates were assessed using the TUNNEL technique. Colonic levels of cytokines were measured by ELISA of organ culture supernatants. The amount and identity of GAGs were determined by the content of hexuronic acid and agarose gel electrophoresis, respectively. Anticoagulant action of GAGs was measured by activated partial thromboplastin time (aPTT).

Treatment with GAGs significantly reduced the macroscopic and histological scores of TNBS-treated animals, particularly with ascidian heparin. The number of colonic macrophages and lymphocytes in TNBS-colitis significantly decreased after treatment with GAGs, particularly with ascidian heparin ($p < 0.001$). Increased levels of TNF-alpha, TGF-beta, and VEGF in the inflamed colon were restored to basal levels after treatment with GAGs. Treatment with GAGs inhibited the expression and nuclear translocation of both NF-kappa B ($p < 0.001$) and p-ERK ($p < 0.001$) in colonic mononuclear cells of TNBS-treated animals. Epithelial apoptosis induced by TNBS-colitis was significantly attenuated after treatment with GAGs ($p < 0.001$). Colonic deposition of collagen fibers significantly correlated with the levels of TGF-beta ($r: 0.71, p < 0.001$), and decreased to basal levels after treatment with GAGs ($p < 0.001$). TNBS induced a 2.2-fold increase in the contents of GAGs, with a relative increase in heparan sulfate and chondroitin sulfate, and decrease of dermatan sulfate. Treatment with both ascidian and mammalian GAGs restored total levels and proportions of colonic GAGs. The administration of GAGs for 7

days did not produce significant changes in plasma aPTT.

The above results show that ascidian heparin and dermatan sulfate possess high anti-inflammatory effect in an animal model of IBD. The absence of anticoagulant action of the GAGs after subcutaneous administration supports the use of these GAGs in the management of IBD without the risk of hemorrhage.

Kew-words: 1. Glycosaminoglycans. 2. Inflammatory bowel disease. 3. Extracellular matrix. 4. Intestinal mucosa.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AH	Ácido hialurônico
BSA	Albumina sérica bovina
CD	Conjunto de diferenciação
Cetavlon	Brometo de N-cetil-N,N,N-trimetilamônio
CNI	Crohn não inflamado
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DMB	Azul de 1,9-dimetilmetileno
DS	Dermatam sulfato
DS Mam	Dermatam sulfato de mamífero
DS Sp	Dermatam sulfato da <i>Styela plicata</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminoácetico
ELISA	Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima
GAGs	Glicosaminoglicanos
GalNac	N-acetil galactosamina
GlcNac	N-acetil glucosamina
Glicanos	Glicosaminoglicanos
Hep Mam	Heparina de mamífero
Hep Sp	Heparina da <i>Styela plicata</i>
HLA	Complexo de histocompatibilidade principal humano
HS	Heparam sulfato
Th1	linfócitos T auxiliares
TLR	receptores semelhantes ao Toll

TNBS	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNBS+Hep Mam	Animais que tiveram a colite induzida com TNBS e foram tratados com heparina de mamífero
TNBS+Hep Sp	Animais que tiveram a colite induzida com TNBS e foram tratados com heparina da <i>Styela plicata</i>
TNBS+DS Mam	Animais que tiveram a colite induzida com TNBS e foram tratados com dermatam sulfato de mamífero
TNBS+DS Sp	Animais que tiveram a colite induzida com TNBS e foram tratados com heparina da <i>Styela plicata</i>
TUNEL	Identifica células apoptóticas <i>in situ</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01 – Morfologia do intestino grosso.	4
Figura 02 – Ilustração da via de sinalização MAPK (ERK).	14
Figura 03 – Vias clássica e alternativa da ativação do NF-kappa-B.	16
Figura 04 – Unidades dissacarídicas dos glicosaminoglicanos.	19
Figura 05 – Marcação por HE das secções de tecido do cólon distal dos animais	43
Figura 06 – Escore macroscópico e microscópico do cólon dos animais.	44
Figura 07 – Imunohistoquímica do cólon marcado com anticorpo, anti-CD3.	46
Figura 08 - Imunohistoquímica do cólon marcado com anticorpo, anti-ED1.	47
Figura 09 – Dosagem das citocinas TNF- α , VEGF e TGF- β .	49
Figura 10 – Imunohistoquímica do cólon marcado com anticorpo, anti-NFkB p65	50
Figura 11 – Imunofluorescência do cólon marcado com anticorpo, anti-pERK 1/2	52
Figura 12 – Quantidade de colágeno, através da técnica de picrossirius.	54
Figura 13 – Imunofluorescência do cólon através do ensaio do TUNEL.	57
Figura 14 – Análises do tempo de sangramento (aPTT), e plaquetas totais.	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I – Principais características estruturais dos glicosaminoglicanos.	19
Tabela II – Composição dos glicosaminoglicanos do cólon dos animais.	59

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
2. Fundamento teórico	03
2.1. Anatomia e morfologia do intestino Epitélio Intestinal	03
2.1.1. Epitélio Intestinal	05
2.1.2. Lâmina própria	06
2.2. Imunidade da mucosa intestinal	06
2.2.1. Macrófagos e Linfócitos T	07
2.2.2. Citocinas	09
2.2.2.1. Fator de Necrose Tumoral-alpha (TNF- α)	09
2.2.2.2. Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF)	10
2.2.2.3. Fator Transformacional do crescimento-Beta (TGF- β)	11
2.2.3. Sinalização intracelular	12
2.3. Glicosaminoglicanos	17
2.4. Retocolite Ulcerativa versus Doença de Crohn	23
2.5. Aspectos moleculares e celulares das DII	26
3. Objetivo Geral	30
3.1 Objetivos específicos	30
4. Materiais e métodos	31
4.1. Animais	31
4.2. Indução da colite experimental	31
4.3. Procedimentos experimentais	32
4.4. Avaliação macroscópica do cólon	33

4.5. Escore histológico do cólon	33
4.6. Análise imunohistoquímica do cólon	34
4.7. Microscopia confocal	35
4.8. Cultura de órgãos e quantificação das citocinas	36
4.9. Histomorfometria da marcação com sirius red	37
4.10. Isolamento dos glicosaminoglicanos	37
4.11. Eletroforese em gel de agarose	38
4.12. Tratamento enzimático e químico	39
4.13. Avaliação da ação anti-coagulante	39
4.14. Detecção da apoptose	40
4.15. Análise estatística	40
5. Resultados	41
5.1. Mudanças histológicas no tecido do cólon	41
5.2. Infiltrado celular no cólon inflamado	45
5.3. Produção de citocinas e sinalização intracelular no tecido do cólon	48
5.4. Apoptose no tecido do cólon	55
5.5. Quantificação dos glicosaminoglicanos do cólon	58
5.6. Efeitos do tratamento com glicosaminoglicanos na coagulação	60
6. Discussão	62
7. Conclusões	72
8. Referências	73
9. Anexo	85

1 Introdução

As doenças inflamatórias crônicas constituem condições de grande importância na medicina clínica e enorme impacto na sociedade, acometendo milhões de indivíduos em todo o mundo. Estas doenças são causadas por alterações na resposta imunitária, envolvendo mecanismos diversos, freqüentemente sincrônicos e por vezes complementares, tais como a ativação inapropriada de linfócitos T, expressão anormal de citocinas e quimiocinas, perda da tolerância imunológica, auto-imunidade, migração celular para os sítios inflamatórios, entre outros. O mecanismo que regula a migração celular para os sítios inflamatórios depende da expressão de selectinas e de outras moléculas de adesão no contexto da interação de células inflamatórias circulantes com o endotélio vascular.

Exemplos de doenças inflamatórias crônicas e/ou auto-imunes são as doenças inflamatórias intestinais (DII), a esclerose múltipla, a artrite reumatóide, o lúpus eritematoso sistêmico, entre outras. Todavia, algumas apresentam especificidade contra determinados tecidos ou órgãos, tais como o trato gastrointestinal (DII), a pele (psoríase), a tireóide (Tireoidite de Hashimoto, Doença de Graves), as células beta pancreáticas (diabetes mellitus tipo 1), as vias respiratórias (asma brônquica), e diversas doenças cardiovasculares.

Nos últimos trinta anos, as DII têm constituído o principal modelo para o estudo de inflamação no aparelho digestivo. A pesquisa na área das DII tem tamanha abrangência, que acaba por influenciar a pesquisa de uma série de outras doenças inflamatórias, até mesmo fora do trato gastrointestinal.

As DII são afecções crônicas de etiologia desconhecida (idiopática), que compreendem basicamente a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa. As DII apresentam distribuição universal, acometendo milhões de pessoas, mas estão se

tornando cada vez mais comuns em regiões previamente consideradas como sendo de baixa taxa de incidência, tais como o sul e o leste da Europa, o Oriente Médio, a América Latina e, especialmente, o sudeste asiático (LOFTUS, 2004; OUYANG, 2005).

Modelos experimentais de DII têm contribuído para a compreensão da natureza das anormalidades da regulação imunológica responsável pela inflamação e destruição tecidual, mas também são essenciais para testar novos tratamentos (STROBER, 2002; XIA BING, 2004). A colite induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) é um dos modelos experimentais de DII mais utilizados, em que uma resposta imunitária do tipo Th1 resulta em processo patológico que se assemelha ao observado nas DII, particularmente na Doença de Crohn (LAWRANCE, 2003; BUSSEROLLES, 2005).

A heparina é um polissacarídeo sulfatado que vem sendo utilizado como o principal agente no tratamento e na profilaxia da trombose venosa profunda. Embora ações anti-inflamatória e anti-neoplásica da heparina também tenham sido observadas anteriormente, as formulações comerciais não são preconizadas para o tratamento desses transtornos por não haver avaliação favorável quanto aos riscos e benefícios. As doses necessárias para a produção do efeito anti-inflamatório ou anti-neoplásico tornam elevado o risco de sangramento. Em relatos de casos e em ensaios clínicos abertos, foi observado que o tratamento com heparina eventualmente resultava em atenuação da atividade clínica em pacientes com doenças inflamatórias crônicas, inclusive as DII (PANES, 2000; BLOOM, 2004), o que sugere a existência de um mecanismo terapêutico além do efeito anticoagulante.

2 Fundamento teórico

2.1 Anatomia e morfologia do intestino

A parede do tubo digestivo, que se estende do esôfago ao reto, é formada por quatro camadas denominadas de mucosa, submucosa, muscular e serosa (Figura 1). A camada mucosa é constituída por um epitélio de revestimento, um tecido conjuntivo subjacente, denominado lâmina própria, seguido de uma camada muscular. A camada submucosa é constituída por tecido conjuntivo de densidade variável mas, em geral, frouxo. Esta camada contém os vasos sanguíneos de maior calibre do tubo digestivo que enviam seus ramos para a camada mucosa, para a camada muscular e para a camada serosa.

A camada muscular é constituída por uma camada interna de células musculares lisas com disposição circular e por uma camada muscular externa de células musculares lisas dispostas longitudinalmente. A serosa é uma membrana constituída por uma só camada de células epiteliais pavimentosas simples, denominada de mesotélio, e por uma pequena quantidade de tecido conjuntivo subjacente (ROSS,1993).

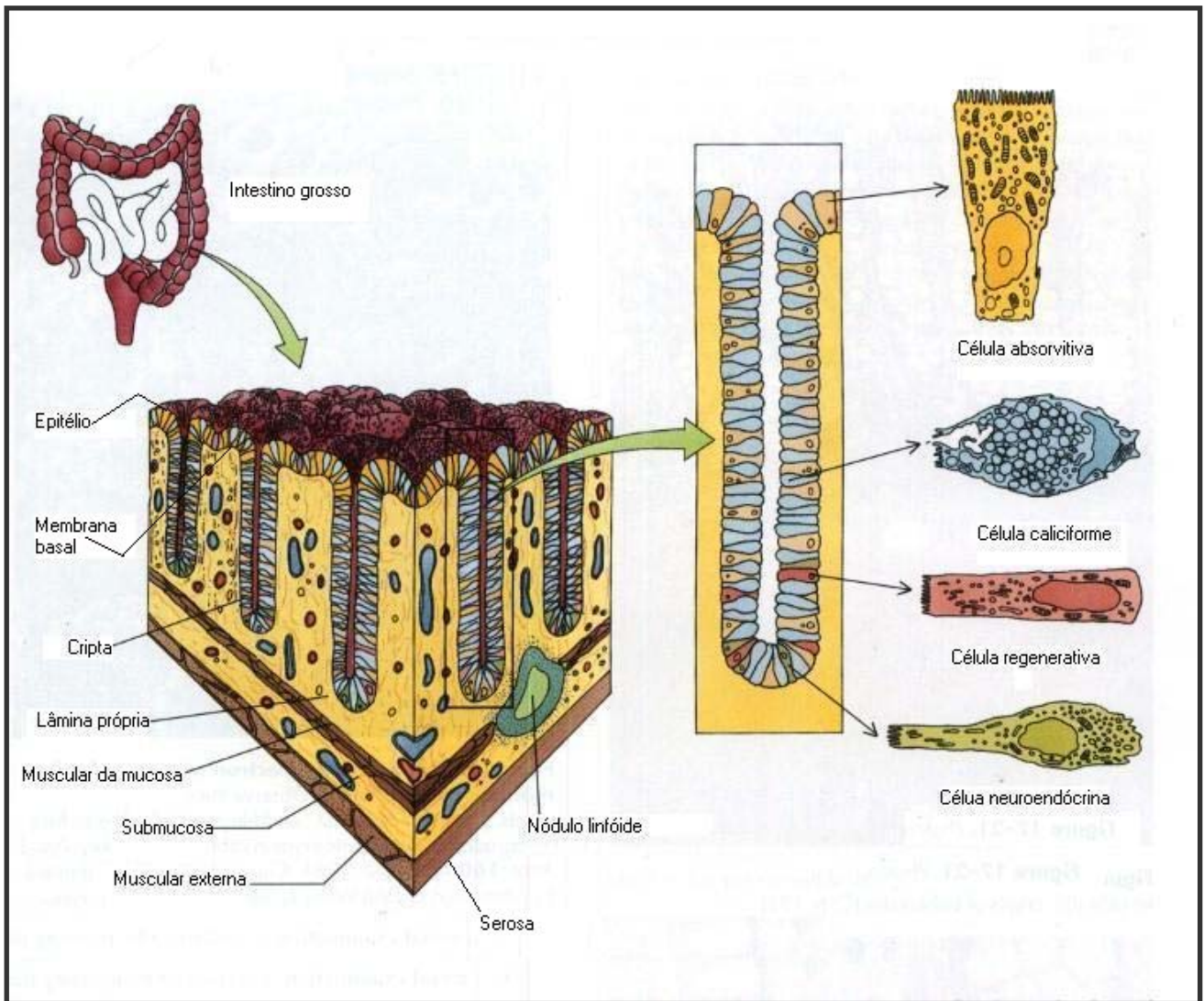


Figura 1: Morfologia do intestino grosso. Adaptado de Ross e Romrell (1993)

2.1.1 Epitélio intestinal

O epitélio do trato gastrointestinal é composto por uma única camada de células que separa antígenos estranhos da maior população de linfócitos encontrados na mucosa intestinal. O compartimento epitelial é composto por células denominadas enterócitos e colonócitos, além de linfócitos intra-epiteliais. Até o final da década de 70, acreditava-se que o epitélio tivesse apenas uma função de revestimento, parte da barreira física da mucosa do tubo digestivo. A descoberta de antígenos no epitélio intestinal contribuiu para modificar a compreensão do papel do epitélio na defesa intestinal (SOUZA, 2001).

Os enterócitos, como células típicas de epitélio absorptivo, têm alto conteúdo de mitocôndrias, responsáveis pelo aporte energético necessário à síntese protéica. Apresentam também um sistema de Golgi proeminente, que atua no mecanismo de transporte e secreção de material no interior dos enterócitos. O retículo endoplasmático liso e rugoso atua no transporte, metabolismo, secreção e excreção de substâncias exógenas e endógenas. Estas organelas participam ainda dos processos de endocitose e exocitose nos enterócitos. O retículo endoplasmático liso tem papel preponderante no metabolismo lipídico, no qual os lisossomos também estão envolvidos (MADI, 2001).

Na parte basal dos enterócitos, ou seja, na superfície externa de interface com o tecido conjuntivo, verifica-se uma membrana delicada e bem delineada denominada membrana basal. Esta é constituída de colágeno tipo IV, glicoproteínas e proteoglicanos, responsáveis pelo fechamento das fendas intercelulares existentes na base do epitélio (Madi, 2001).

2.1.2 Lâmina própria

A lâmina própria é o espaço ocupado pelo tecido conjuntivo e seu componente celular formado por linfócitos, plasmócitos, macrófagos, mastócitos ocasionais, eosinófilos e raras células dendríticas, imersos na matriz do tecido conjuntivo, composta de fibras de colágeno (I e III), elastina, ácido hialurônico e proteoglicanos, que são produzidos por fibroblastos intestinais (SCHUPPAN, 1990).

O tecido conjuntivo da lâmina própria possui ainda delgadas fibras reticulares e fibroblastos, os quais proliferam na base das criptas e migram paralelamente às células epiteliais, formando uma camada ao longo da vilosidade. Funcionalmente, atuam na elaboração de componentes da matriz extracelular que seriam responsáveis pela diferenciação de células epiteliais, além de ampliar a resposta inflamatória (BERSCHNEIDER, 1992).

2.2 Imunidade da mucosa intestinal

A mucosa intestinal é permanentemente desafiada por antígenos de origem bacteriana, viral e parasitária, além de antígenos presentes nas diversas substâncias ingeridas diariamente. Portanto, é necessário um mecanismo eficiente de controle do que é ou não patogênico, a fim de desenvolver um sistema imune efetivo para limitar a invasão eventual de agentes infecciosos e também prevenir a integridade anatômica e funcional do epitélio e tecidos subjacentes (BROWN, 2007; RUTHRUFF, 2007).

Existem várias evidências de que o intestino desenvolva uma barreira com complexas funções de seleção e defesa, tanto de caráter fisiológico como morfológico. Essas barreiras envolvem desde o muco que recobre os enterócitos, até as barreiras mais internas, como a própria membrana celular, as organelas intercelulares, a membrana basal e as células do sistema imunitário que povoam a lâmina própria até a muscular da mucosa (BROWN, 2007).

O sistema imunológico da mucosa é composto por um grande número de células de origem linfóide (principalmente linfócitos e macrófagos) e algumas células de origem não-linfóide. Anticorpos produzidos na mucosa devem conferir resistência a bactérias, vírus, parasitas, toxinas, etc. Essa resposta imunitária é iniciada após estimulação antigênica, onde o linfo-epitélio especializado capta e transfere os antígenos para células apresentadoras de antígenos do tecido linfóide associado. Neste tecido, os antígenos são apresentados para linfócitos T, os grandes orquestradores imunológicos, iniciando a cascata de eventos que resulta na resposta imunitária (SOUZA, 2001; BAUMGART^a, 2007).

2.2.1 Macrófagos e linfócitos T

São vários os mediadores envolvidos no processo inflamatório, entretanto, vamos nos concentrar apenas nos macrófagos e linfócitos T, e seus produtos.

Os macrófagos constituem a segunda maior população celular do sistema imunológico, sendo composto por células de uma mesma linhagem, cuja função primária é a de fagocitose. Estas células mononucleares originam-se na medula óssea e adquirem, após processo de maturação e ativação, diferentes formas. A primeira célula a deixar a medula óssea e entrar na corrente sanguínea, ainda não completamente diferenciada, é o monócito. Nos tecidos, após maturar, passa a chamar-se macrófago ou histiócito (ABBAS, 1991).

Dentre as funções dos macrófagos, destacam-se, além da fagocitose de partículas estranhas e a produção de citocinas, a apresentação de antígenos de superfície que são reconhecidos pelos linfócitos T. Os macrófagos participam ainda da resposta imuno-humoral, fagocitando, principalmente, partículas opsonizadas por fragmentos do sistema complemento e por complexos imunes. A capacidade dos

macrófagos e linfócitos de estimularem-se mutuamente contribui para uma importante amplificação dos mecanismos específicos de imunidade (ABBAS, 1991).

Entre as células linfóides da mucosa intestinal, os linfócitos T originários da medula óssea desempenham um papel crucial atuando como mediadores da resposta imunológica. O evento central, tanto para a produção da resposta imunitária humoral, como para a mediada por células, depende da ativação e da expressão clonal de linfócitos T auxiliares (Th). Porém, dependendo da forma como o antígeno é apresentado ao linfócito Th, e na ausência de moléculas co-estimulatórias, os linfócitos T maduros podem tornar-se anérgicos, determinando um estado de tolerância (MACDONALD^a, 1990; LAROUX, 2001). Os linfócitos T são células altamente seletivas no que se refere ao reconhecimento de antígenos. Necessitam da colaboração prévia de células apresentadoras de antígenos, macrófagos e células dendríticas, as quais, através do sistema MHC, apresentam as partículas antigênicas ligadas a sua superfície.

A ativação de linfócitos Th é desencadeada pela interação do complexo formado pelo receptor de linfócitos e a molécula CD3 (TCR-CD3) com um antígeno peptídico ligado a uma molécula da classe II do MHC na superfície de uma célula apresentadora de antígeno (CAP). Os linfócitos Th (CD4+) ativados da mucosa produzem citocinas que levam a ativação de outras células efetoras, inclusive linfócitos T, que podem atuar diretamente ou produzirem citocinas pró- inflamatórias e quimiocinas que, juntamente com o aumento da expressão de moléculas de adesão, controlam os processos de ativação e migração para os sítios inflamatórios (BAUMGART^a, 2007; BROWN, 2007).

2.2.2 Citocinas

O desenvolvimento de uma resposta imunitária efetiva depende da interação de células linfóides e do sistema hematopoiético, que é mediada por um grupo de proteínas de baixo peso molecular, denominadas citocinas. As citocinas são produzidas basicamente por leucócitos, mas também por células mesenquimais, epiteliais, endoteliais e da medula óssea, em resposta a diversos estímulos indutores. Podem atuar de forma autócrina, afetando o comportamento das células que liberam as citocinas, ou de forma parácrina, afetando o comportamento de células adjacentes. Algumas citocinas são estáveis o suficiente para atuarem de forma endócrina, afetando o comportamento de células distantes, embora isso dependa de sua capacidade de entrar na circulação e de sua meia-vida sangüínea (JANEWAY, 2007).

A ação das citocinas depende da ligação com receptores específicos na membrana da células-alvo cuja interação gera sinais de transdução, culminando com a alteração da expressão genética e efeitos biológicos específicos. A maior fonte de citocinas na mucosa intestinal são os linfócitos T ativados, particularmente os CD4+ (Th) (SOUZA, 2001). São muitas as citocinas envolvidas no processo de sinalização celular durante a resposta imunológica, entretanto, daremos ênfase às citocinas investigadas neste trabalho.

2.2.2.1 Fator de necrose tumoral- α (TNF- α)

O fator de necrose tumoral- α é sintetizado pelos linfócitos e macrófagos na forma solúvel ou associados à membrana. Ele é composto por três cadeias protéicas idênticas (um homotrímero), que se ligam a receptores da família TNFR (JANEWAY, 2007). O TNF- α desempenha um importante papel na patofisiologia da DII,

apresentando níveis elevados em biópsias de pacientes acometidos com a doença. Neste caso, o TNF- α estaria prolongando a inflamação através de vários mecanismos: ativação das vias NF-kappa-B e MAPK-cinase em vários tipos celulares; aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular e aumento da síntese de quimiocinas. Além disso, o TNF- α também estimula os miofibroblastos da mucosa intestinal a sintetizar grandes quantidades de metaloproteases da matriz, causando a sua degradação e da mucosa intestinal. As metaloproteases da matriz, por sua vez, clivam e potencializam a atividade de quimiocinas, contribuindo para aumentar o recrutamento de células inflamatórias e a deposição de colágeno pelos miofibroblastos e fibroblastos na ME da mucosa intestinal. A administração de anticorpos contra TNF- α tem-se demonstrado eficaz no tratamento de pacientes com DII (SALAS, 2000; THEISS, 2005; MONTELEONE, 2006).

2.2.2.2 Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)

O fator de crescimento do endotélio vascular é uma citocina produzida por células epiteliais, fibroblastos e células musculares lisas. O VEGF pertence a uma família composta de sete membros, que atuam através de receptores específicos. Ele induz a diferenciação, migração e proliferação das células endoteliais no processo da angiogênese (GRIGA, 1999; CARVALHO, 2007).

O VEGF tem papel fundamental no desenvolvimento embrionário e em diversas outras condições fisiológicas e patológicas, incluindo DII. Este aspecto será abordado com mais detalhes adiante.

2.2.2.3 Fator transformacional de crescimento-Beta (TGF- β)

O fator transformacional do crescimento-Beta é uma citocina pleiotrópica encontrada nos mamíferos em três isoformas, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. O TGF- β e suas isoformas regulam múltiplas funções celulares, incluindo proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular. Podem atuar de maneira autócrina, parácrina e endócrina, a fim de regular diversos processos fisiológicos (DIJKE, 2007; WAN, 2007). No trato gastrointestinal, o TGF- β é produzido principalmente por macrófagos e plaquetas. Um dos efeitos mais conhecidos do TGF- β é o estímulo à proliferação e diferenciação de fibroblastos e miofibroblastos, o que leva ao aumento da deposição de colágeno na matriz extracelular.

O quadro de fibrose é a maior e mais séria complicação da DII ocorrendo, principalmente, pelo aumento do número de fibroblastos e miofibroblastos, que são responsáveis pela síntese de colágeno I (BEDDY, 2004; THEISS, 2005). Mudanças intensas no epitélio intestinal requerem o controle contínuo da proliferação celular e do processo de síntese da matriz extracelular, e o TGF- β vem sendo apontado como a citocina mais importante nestes processos. Sobre condições fisiológicas, o TGF- β tem participação fundamental no mecanismo de defesa da mucosa intestinal, induzindo a proliferação celular, principalmente do epitélio intestinal, prevenindo, desta forma, a destruição da mucosa intestinal (THEISS, 2005).

Estudos recentes mostram que o TGF- β , além de sua função imunossupressora através do controle da diferenciação de linfócitos T (TH1 e Th2), tem forte atividade pró-inflamatória, atuando na diferenciação de células T simples (CD4+), em uma nova linhagem de células T helper, as células T helper-17 (Th17). Estas células apresentam um grande potencial pró-inflamatório, caracterizados pela produção da interleucina-17 (IL-17), que atua principalmente no recrutamento de

neutrófilos e secreção de metaloproteases na matriz (VELDHOEN, 2006; MANGAN, 2006; BAUMGART, 2007).

Trabalhos recentes têm mostrado a presença de grandes quantidades de células Th17, em processos inflamatórios graves e até em doenças autoimune (VELDHOEN, 2006; MANGAN, 2006), assim como na mucosa inflamada de pacientes com DII (BAUMGART, 2007). A administração de anticorpos anti-TGF- β em sítios de inflamações crônicas, melhorou ou até aboliu a doença devido a inibição da diferenciação de células T simples (CD4+) em células Th17.

2.2.3 Sinalização intracelular

Vários sinais extracelulares são traduzidos no interior da célula por uma família de proteína kinase, serina/treonina, conhecidos como proteínas cinase ativada por mitógenos (MAPKs). Em mamíferos, a família MAPK apresenta três principais subgrupos: proteína cinase regulada por sinais extracelulares (ERK); p38 (também conhecida como MAPK8) e a cinase N-terminal JUN (JNK). As MAPKs possuem importante papel em diferentes processos celulares, tais como proliferação, resposta ao estresse, apoptose e defesa imune, sendo inicialmente ativadas por sinais na superfície celular, usualmente através de receptores ligados a membrana (LIU, 2007).

Em células quiescentes, as isoformas ERK 1 e ERK 2 estão localizadas no citoplasma devido a sua ligação específica com a clássica MAPKs, MEK 1 e MEK 2, que retêm ERK 1 e ERK 2 no citoplasma. A fosforilação de ERK 1 e ERK 2 é desencadeada por estímulos extracelulares, como os fatores de crescimento (PDGF, FGF e EGF), que conduzem a dissociação de ERK da MEK, com subsequente translocação para o núcleo (TORII, 2004; PHILIPPE, 2004; CHAMBARD, 2006). No

núcleo, ERK fosforila e ativa vários alvos nucleares, como fatores transcricionais que regulam a expressão de genes envolvidos na proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose celular (YOAV, 2006) (Figura 2).

A cascata de sinalização mediada por ERK 1 e ERK 2 não está envolvida apenas em processos celulares normais, mas também na patologia de várias doenças, incluindo câncer, arteriosclerose, artrite e DII (GEORGE, 2002; HOLLENBACH, 2005; LIU, 2007). As ERKs 1 e 2 cooperam no orquestramento da resposta inflamatória. Por exemplo, ERK 1 é necessária para proliferação de células T e polarização de linfócitos T CD4⁺. As ERKs 1 e 2 também são cruciais para a indução de IL-2 e estão envolvidas com a resposta citotóxica dos linfócitos T CD8⁺(LIU, 2007).

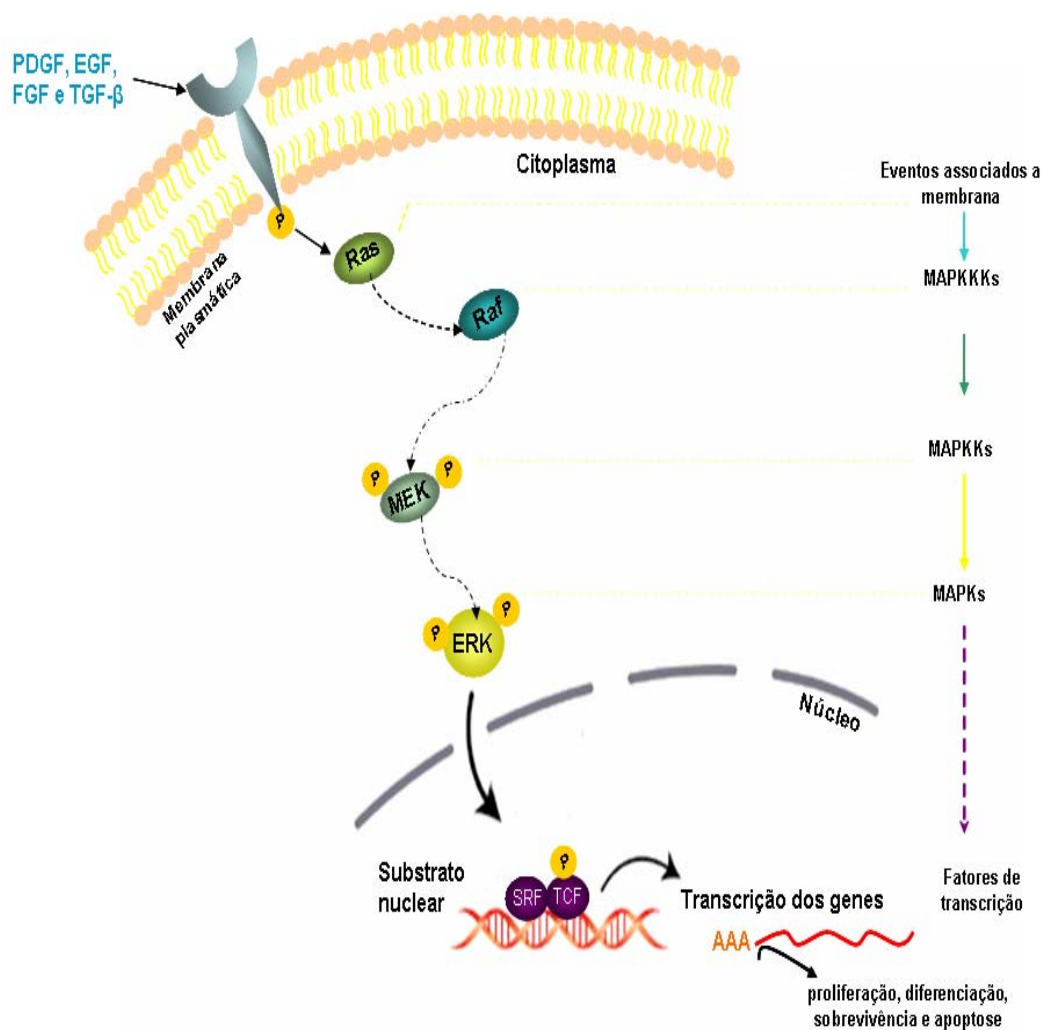


Figura 2: Ilustração da via de sinalização MAPK (ERK). Esta via é ativada por estímulos extracelulares (PDGF, EGF e FGF) através de um mecanismo mediado pela GTPase RAS que após sofrer mudanças conformacionais ativa a Raf. A Raf ativada, fosforila e ativa MEK em seus dois resíduos de serina. Esta, por sua vez, ativa e fosforila ERK que pode entrar no núcleo e fosforilar um grande número de fatores de transcrição, como o fator de complexo ternário (TCF), fator de resposta ao soro (SRF), entre outros. Modificado de Liu Y e cols., 2007.

O fator de transcrição nuclear Kappa-B (NFκB) pode induzir e reprimir a expressão de genes pela ligação direta a discretas seqüências de DNA, conhecida como elementos Kappa-B. Em células de mamífero, existem cinco membros da família NFκB, RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NFκB1) e p52/p100 (NFκB2), e complexos diferentes de NFκB são formados de seus homo e heterodímeros. Em muitos tipos celulares, o complexo NFκB é retido no citoplasma por uma família de proteínas inibidoras, conhecidas como inibidores do NFκB (IκBs). A ativação do NFκB envolve tipicamente a fosforilação do IκB pelo complexo IκB kinase (IKK), resultando na degradação do IκB. Como consequência, o NFκB é liberado, permitindo sua livre translocação para o núcleo onde liga-se a regiões promotoras de vários genes (Figura 3).

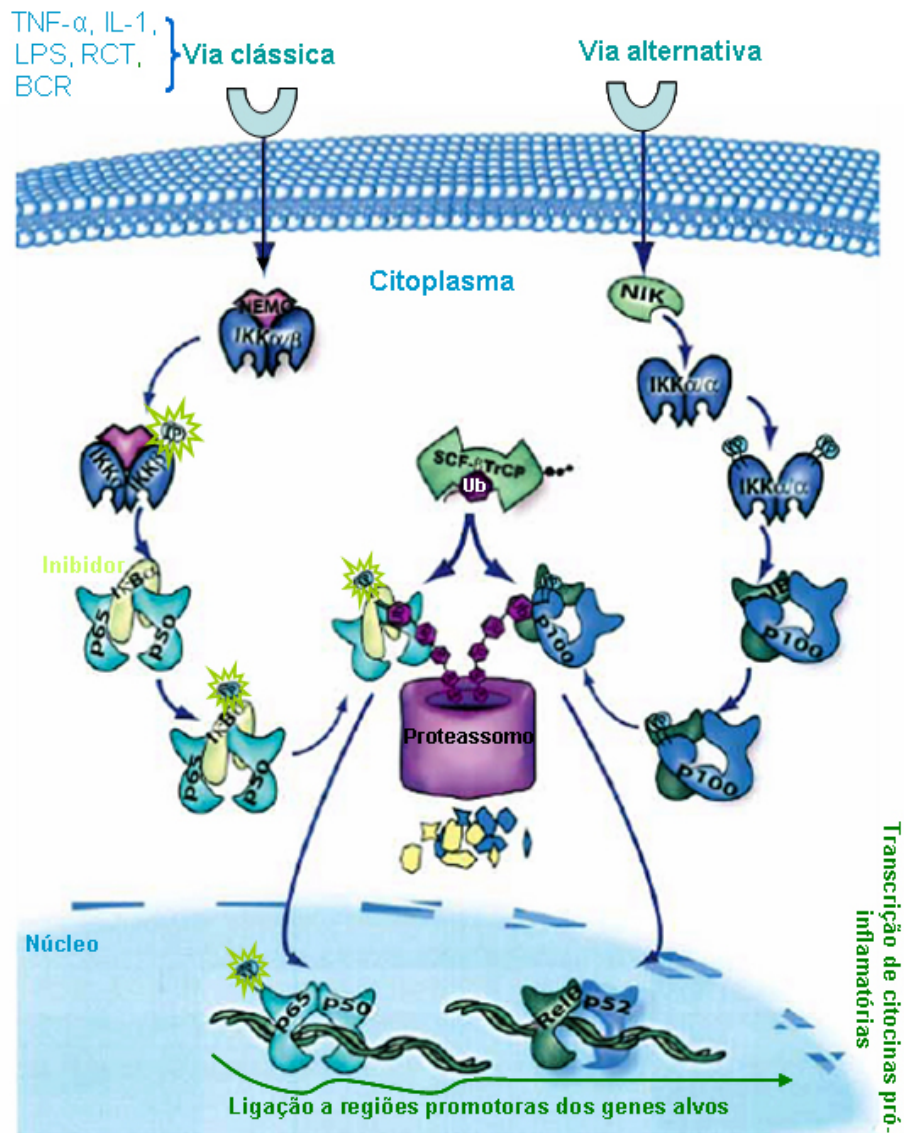


Figura 3: Vias clássica e alternativa da ativação do NF-kappa-B. A via clássica (complexo formado pelas subunidades p65/p50) é ativada por uma variedade de agonistas. A ativação desta via depende do complexo (NEMO-IKK β) que fosforila (P) o inibidor IκB α , resultando na sua poliubiquitinação (Ub) e rápida degradação pelo proteossomo. Como consequência, o NF-kappa-B transloca-se até o núcleo. Esta via é essencial para a resposta imune e a inflamação. Modificado de Hayden MS e Ghosh S., 2004.

Os genes regulados pelo NF-kappa-B incluem aqueles que controlam a apoptose, adesão celular (selectinas e VCAM-1), proliferação, resposta imune inata e adaptativa, inflamação (TNF- α , IL-1), resposta ao estresse celular e remodelação tecidual (HAYDEN, 2004; PERKINS, 2007).

A via de ativação do NF-kappa-B mais frequentemente observada é a via canônica ou clássica, a qual é induzida em resposta a citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e o IL-1. O NF-kappa-B pode também ser ativado por produtos de bactérias, tal como o lipopolissacarídeo. Esta via é caracterizada pela rápida fosforilação do I κ B com sua subsequente ubiquitinação e degradação pelo proteossoma (BEINKE, 2004; PERKINS, 2007).

2.3 Glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos são uma família complexa de polissacarídeos lineares, constituídos por unidades dissacarídicas repetitivas de hexosamina (N-acetil-glicosamina ou N-acetil-galactosamina) unida através de ligação O-glicosídica à um ácido hexurônico (ácido glucurônico ou ácido idurônico) ou à galactose (Tabela I e Figura 4). Os resíduos de ácido hexurônico podem apresentar O-sulfatação no carbono 2, enquanto que a galactose pode estar 6-O-sulfatada. Já a hexosamina pode apresentar O-sulfatação nos carbonos 4 e/ou 6 e, ainda, N-sulfatação. Os grupamentos sulfato, juntamente com as carboxilas dos ácidos urônicos, atribuem a estas moléculas uma alta densidade de cargas negativas.

A família de glicosaminoglicanos é composta por quatro subgrupos quimicamente distintos: o da heparina e heparam sulfato, o do condroitim sulfato e dermatam sulfato, o queratam sulfato e o ácido hialurônico (JEANLOZ, 1960).

Tabela I
PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS
GLICOSAMINOGLICANOS (JEANLOZ, 1960)

<i>GAG</i>	<i>P.M.^a</i> (<i>Da</i>)	<i>MONOSSACARÍDEOS^b</i>	<i>POSIÇÃO</i> <i>DO</i> <i>SULFATO</i>	<i>LIGAÇÃO</i> <i>GLICOSÍDICA</i>
Ácido hialurônico	5 - 50 x 10 ⁵	N-acetilglicosamina	-	β(1-4)
		Ácido glicurônico	-	β(1-3)
Condroitim 4-sulfato	2 - 5 x 10 ⁴	N-acetilgalactosamina	4	β(1-4)
		Ácido glicurônico	-	β(1-3)
Condroitim 6-sulfato	2 - 7 x 10 ⁴	N-acetilgalactosamina	6	β(1-4)
		Ácido glicurônico	-	β(1-3)
Dermatam sulfato	2 - 5 x 10 ⁴	N-acetilgalactosamina	4	β(1-4)
		Ácido idurônico	-	α(1-3)
Queratam sulfato	1 - 3 x 10 ⁴	N-acetilglicosamina	6	β(1-3)
		galactose	-/6	β(1-4)
Heparam sulfato	1 - 6 x 10 ⁴	glicosamina	2/6	α(1-4)
		N-acetilglicosamina	-/6	α(1-4)
		Ácido glicurônico	-	β(1-4)
		Ácido idurônico	-/2	α(1-4)
Heparina	0.5 - 5 x 10 ⁴	glicosamina	2/6	α(1-4)
		ácido glicurônico	-	β(1-4)
		ácido idurônico	-/2	α(1-4)

^a - Peso molecular médio varia neste intervalo de acordo com a origem dos glicosaminoglicanos;

^b - Todos os açúcares estão na configuração D, exceto o ácido idurônico que está na configuração L.

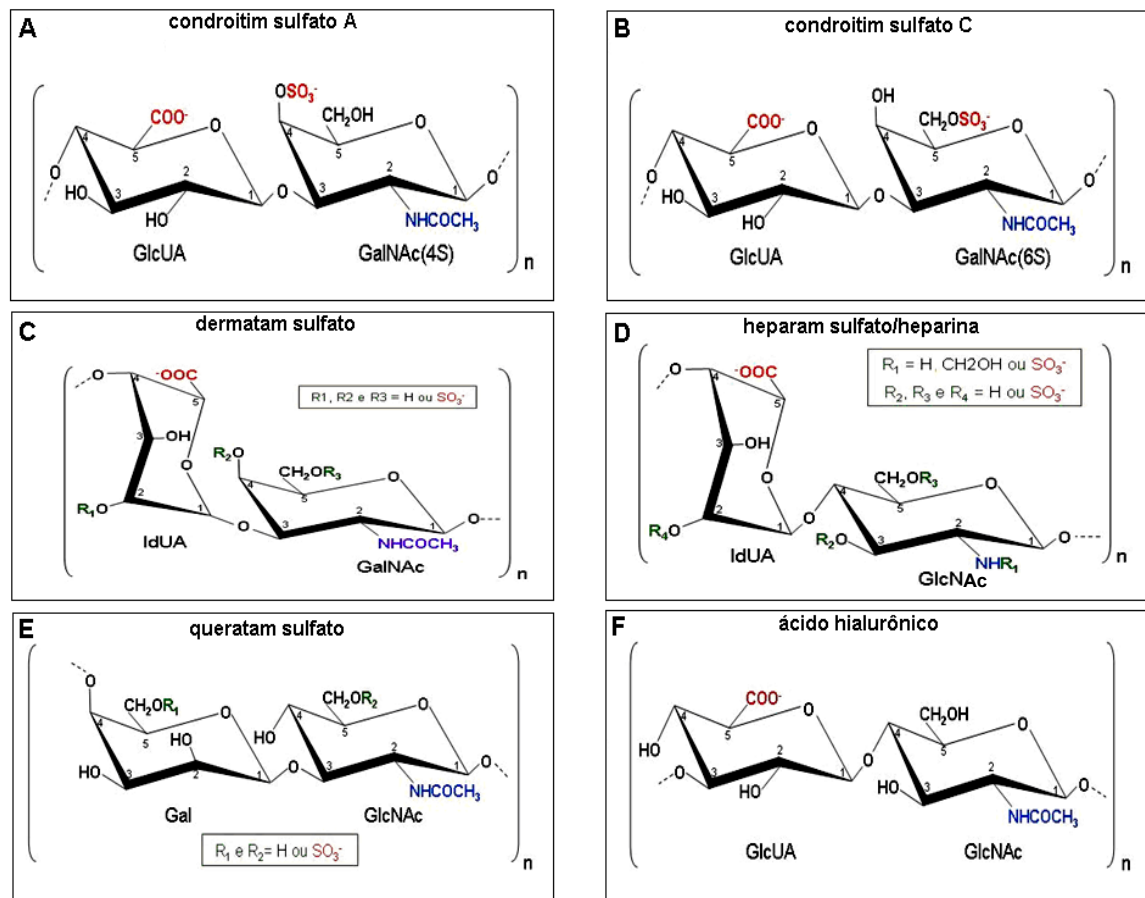


Figura 4: Unidades dissacarídicas dos glicosaminoglicanos: A, B e F possuem ácido glicurônico; C possui ácido idurônico e D pode apresentar além do ácido glicurônico, o ácido idurônico como seu componente de ácido urônico. Quanto ao constituinte de hexosamina, A, B e C são formados por N-acetilgalactosamina e D, E e F por N-acetilglucosamina. Substituição de ácido urônico por galactose é encontrada em E.

O presente trabalho focaliza-se nos glicosaminoglicanos do grupo do condroitim sulfato/dermatam sulfato (galactosaminoglicanos) e da heparina (glucosaminoglicano). A unidade dissacarídica do condroitim sulfato é formada por ácido glucurônico- β -1 \rightarrow 3-N-acetil-galactosamina, variando em tamanho até 100 ou mais unidades repetitivas. Os resíduos de N-acetil-galactosamina estão substituídos com sulfato ligados nas posições hidroxílicas 4 e/ou 6, dando origem aos isômeros 4-sulfatado (denominado originalmente de condroitim sulfato-A) e 6-sulfatado (denominado originalmente de condroitim sulfato-C). As cadeias de condroitim sulfato estão O-ligadas a um resíduo específico de serina no esqueleto protéico através do tetrassacarídeo β -D-ácido glucurônico-1 \rightarrow 3- β -D-galactose-1 \rightarrow 3- β -D-galactose-1 \rightarrow 4- β -D-xilose, denominado de região de ligação (LAMARI, 2006).

Dermatam sulfato (originalmente chamado de condroitim sulfato-B) é uma outra forma de condroitim sulfato, na qual o ácido glucurônico foi epimerizado em ácido idurônico. Os resíduos de ácido idurônico podem estar substituídos com sulfato ligado na posição hidroxílica 2, enquanto que as unidades de N-acetil-galactosamina podem conter sulfato na posição hidroxílica 4 e/ou 6.

Além das unidades dissacarídicas típicas descritas na Figura 4, vários outros tipos de dissacarídeos têm sido observados em variantes de glicosaminoglicanos, especialmente os condroitim sulfatos encontrados em fontes não-mamíferas. Por exemplo, um dermatam sulfato contendo N-acetil-galactosamina 4,6-O-sulfatada foi isolado da cartilagem de lula (denominado condroitim sulfato-E); um outro tipo de condroitim, contendo dissacarídeos de ácido glucurônico 2-O-sulfato- β -1 \rightarrow 3-N-acetil-galactosamina 6-O-sulfato, foi isolado da cartilagem de tubarão (denominado condroitim sulfato-D) (SUGAHARA, 2003). A ocorrência de unidades de ácido glucurônico 3-O-sulfatada foi descrito no condroitim sulfato do pepino do mar

(VIEIRA, 1991). Além disso, condroitim sulfatos contendo ramificações de α -L-fucose (VIEIRA, 1998), D-glicose (HABUCHI, 1977) ou β -frutofuranose (RODRIGUEZ, 1988) foram encontrados no pepino do mar e na cartilagem de lula e em bactéria uropatogênica, respectivamente.

Preparações de dermatam sulfato enriquecidas em sequências dissacarídicas contendo ácido idurônico 2-sulfato e N-acetil galactosamina 4-sulfato apresentam atividade anticoagulante significativa. Sequências de 3 ou mais dissacarídeos 2,4-sulfatados na cadeia do dermatam sulfato ligam-se ao cofator II da heparina ativando a capacidade do cofator em inibir a trombina (TOLLEFSEN, 1982; 1983). Ao contrário do dermatam sulfato, o condroitim sulfato é desprovido de qualquer atividade anticoagulante.

Assim como o condroitim sulfato, inúmeros variantes de dermatam sulfato apresentando diferentes padrões de sulfatação têm sido descritos. Assim, as ascídias, também conhecidas como tunicados, contêm dermatam sulfatos supersulfatados, todos apresentando 2-O sulfatação nas unidades de ácido idurônico, mas diferindo no padrão de sulfatação nos resíduos de N-acetil-galactosamina (4-O- ou 6-O-sulfato) (PAVÃO, 1995; 1998).

A maioria dos glicosaminoglicanos são sintetizados por enzimas localizadas no aparelho de Golgi e encontram-se ligados à uma cadeia protéica, formando um complexo denominado de proteoglicanos. Estas moléculas são impelidas para a superfície celular ou espaço extracelular. Diferente dos outros GAGs, o ácido hialurônico não é sintetizado ligado covalentemente à cadeia protéica, ele é sintetizado por enzimas localizadas na membrana plasmática e é lançado diretamente no meio externo (Prehm, 1983).

A heparina de mamífero é um glucosaminoglicano que apresenta unidades dissacarídicas compostas por ácido glucurônico- β -1 \rightarrow 4-N-acetil-glicosamina, e é um produto exclusivo dos mastócitos e basófilos de mamíferos. A heparina difere do heparam sulfato no grau de modificação dos seus resíduos de açúcar. Durante a biossíntese, a heparina sofre uma maior extensão de sulfatação e epimerização do ácido glucurônico em idurônico, de modo que mais de 85% dos resíduos de N-acetil-glicosamina encontram-se N-deacetilados e N-sulfatados, e mais de 70% do ácido hexurônico está convertido em idurônico (VARKI, 1999).

Devido a sua interação com a antitrombina, a heparina apresenta uma potente atividade anticoagulante e vem sendo usada na clínica na prevenção da trombose venosa profunda, há mais de 70 anos (GOA, 2005). A ligação com a antitrombina ocorre através de uma sequência pentassacarídica composta por N-acetil-glicosamina-6-sulfato- α -1 \rightarrow 4-ácido glucurônico- β -1 \rightarrow 4-Glicosamina-N,3-sulfato- α -1 \rightarrow 4-ácido idurônico-2-sulfato- α -1 \rightarrow 4-glicosamina-N,6-sulfato, que está presente em cerca de 1/3 das cadeias da heparina (THUNBERG, 1982; OSCARSSON, 1989).

Semelhante ao observado para condroitim sulfato/dermatam sulfato, a ocorrência de heparina não está restrita a mamíferos. Vários análogos da heparina têm sido descritos em moluscos (DIETRICH, 1985, 1999), crustáceos (HOVINGH, 1982; DEMIR, 2001) e ascídias (CAVALCANTE, 2000; PAVÃO, 2002; SANTOS, 2007). Na ascidia *Styela plicata*, foi descrita uma heparina com baixa atividade anticoagulante, composta, majoritariamente, pelos dissacarídeos ácido hexurônico 2-O-sulfato-1 \rightarrow 4- β -N-acetil-glicosamina N-sulfato e ácido hexurônico 2-O-sulfato-1 \rightarrow 4- β -N-acetil-glicosamina N,6-sulfato.

Os glicosaminoglicanos são os principais constituintes da matriz extracelular da mucosa intestinal, (HASSELL, 1986), onde apresentam, entre outras, função de barreira eletrostática e mecânica envolvida na regulação da permeabilidade vascular e da matriz extracelular (ROSENZWEIG, 1982; SUNERGREN, 1987; MALIK, 1989; POWERS, 1989). Os glicosaminoglicanos da matriz extracelular também regulam a difusão de colóide e água (COMPER, 1978; HORI, 2001) e, por causa de sua natureza hidrofílica e suas interações específicas com outros componentes da matriz, estes polímeros estão também envolvidos na manutenção da integridade estrutural do intestino (LINDAHL, 1978; COMPER, 1990; KJELLEN, 1991; HORI, 2001), impedindo que bactérias, vírus e toxinas penetrem fundo na mucosa intestinal e desencadeiem todo o processo inflamatório característico da doença inflamatória intestinal.

2.4 Retocolite ulcerativa *versus* doença de Crohn

O início do quadro inflamatório ocorre, em geral, em adultos jovens, que apresentam predominantemente diarreia, dor abdominal e febre, freqüentemente acompanhadas de manifestações extra-intestinais, com comprometimento de articulações, olhos, pele, além de anemia e desnutrição. Embora a evolução clínica e o prognóstico das DII sejam variáveis, estima-se que a cada 10 anos de doença, cerca de 10 a 15% dos pacientes necessitem de cirurgia para tratamento de complicações. Outro motivo de grande preocupação é o fato de os pacientes com DII também apresentarem um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer intestinal. Assim como o observado em outras doenças inflamatórias crônicas, o tratamento não é curativo e as opções terapêuticas são poucas. O tratamento medicamentoso em geral restringe-se a medidas paliativas para o controle de

sintomas e freqüentemente acompanha-se de efeitos adversos, muitas vezes limitantes.

A retocolite ulcerativa é basicamente uma doença da mucosa, que se inicia na região ano-retal e acomete o cólon de forma uniformemente difusa e superficial (inflamação não-transmural). Além do acometimento quase que exclusivo da mucosa, outra característica muito importante da colite ulcerativa é o fato das alterações ocorrerem de forma uniforme e contínua, sem haver áreas entremeadas de mucosa normal. As alterações envolvidas incluem inflamação e necrose do epitélio e abcesso de criptas, com raras ulcerações que se estendem até a lamina própria (CRAWFORD, 2000; BAUMGART^b, 2007).

A doença de Crohn, por sua vez, é caracterizada por uma inflamação crônica do tipo granulomatosa e localizada, com maior freqüência, na região do íleo terminal, podendo acometer qualquer parte do sistema digestivo, desde a boca até o ânus (Crawford, 2000). A inflamação compromete todas as camadas da parede intestinal (transmural), atingindo também o mesentério e os gânglios linfáticos regionais e é, geralmente, descontínua com segmentos inflamados de intestino separados por segmentos aparentemente normais. Os sintomas geralmente são: diarréia sanguinolenta, dor abdominal, febre, emagrecimento e anemia (CRAWFORD, 2000; BAUMGART^b, 2007).

Estudos prévios têm mostrado que a incidência da doença de Crohn vem aumentando com o decorrer dos anos e que esta ocorre em todo o mundo, mas tem sido descrita com maior freqüência nos países mais desenvolvidos do mundo ocidental (KARLINGER, 2000; BAUMGART^b, 2007). No Brasil, os estudos epidemiológicos ainda são precários para determinar, com segurança sua prevalência. Além disso, a escassez de recursos técnicos e humanos também pode

comprometer o diagnóstico da doença de Crohn. Entretanto, centros de referência para a doença sugerem o seu aumento nas últimas décadas.

Embora a doença de Crohn possa surgir em qualquer idade, é mais comum em adultos jovens, de etnia caucasiana, sem predileção de gênero e, além disso, sua prevalência é maior em áreas urbanas do que em áreas rurais (CRAWFORD, 2000; BROWN, 2007).

A conduta médica para o tratamento das DII é baseada na localização e gravidade do processo inflamatório e nas complicações das doenças. As duas metas principais são o tratamento da fase aguda e a manutenção da remissão. Os antiinflamatórios como os salicilatos (sulfassalazina, mesalazina (5-ASA), e outros), e os corticosteróides (hidrocortisona, prednisona, budesonida, beclometasona, e outros) são preconizados como medicamentos básicos para a indução da remissão de exacerbações agudas das DII. Para a manutenção da remissão, o 5-ASA tem sido o agente de escolha mais eficiente particularmente na retocolite ulcerativa. Na Doença de Crohn, em alguns casos são também utilizados antibióticos temporariamente tais como metronidazol e ciprofloxacino, especialmente no tratamento de fístulas e abscessos perineais. Imunossupressores tais como a 6-mercaptopurina, a azatioprina, o metotrexate, a ciclosporina, entre outros, são medicamentos em geral utilizados como de segunda linha para indução da remissão em doentes refratários ou dependentes de corticosteróide, ou para aqueles que desenvolveram complicações ou efeitos adversos às drogas de primeira linha. Entretanto, os imunossupressores também são potencialmente tóxicos e, tornam os pacientes mais suscetíveis a infecções. Nos últimos dez anos surgiram as chamadas terapias biológicas, dentre as quais destaca-se o anticorpo anti-TNF-alfa. Os resultados favoráveis com o anti-TNF-alfa para doença de Crohn grave, refratária ou

com características penetrantes, com fistulas, têm estimulado a pesquisa de novos alvos terapêuticos e ao desenvolvimento de novos medicamentos contra citocinas e fatores de crescimento envolvidos na patogênese das DII (BAUMGART^b, 2007; RUTHRUFF, 2007).

2.5 Aspectos moleculares e celulares das DII

A hipótese mais aceita para etiopatogenia das DII é de que elas resultem de uma resposta imunitária anormal contra a microbiota comensal, em indivíduos geneticamente suscetíveis (FIOCCHI, 1998; PODOLSKY, 2002). O epitélio do trato gastrointestinal interage com bactérias comensais e com patógenos, através de receptores especiais, os PRRs (*pattern recognition receptors*), que reconhecem estruturas conservadas de bactérias e vírus e ativam vias pró-inflamatórias, para o combate a infecção. Constituem as duas classes de PRRs, os TLR (*Toll-like receptors*) em geral, localizados na membrana, e os NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*), receptores para peptidoglicanos bacterianos presentes no citoplasma das células epiteliais e das células linfóides (MACDONALD, 2005). A sinalização através de TLR ou de NOD ativa o fator de transcrição NF-kappa B, que transloca-se para o núcleo e regula a expressão de vários genes pró-inflamatórios (INOHARA, 2003; BAUMGART^a, 2007). Nas DII, ocorre uma ativação exagerada e persistente do NF-kappa B, resultando em produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (SCHEIBER, 1998; BEINKE, 2004).

Outra importante família de mediadores da inflamação são as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs, *mitogen-activated protein kinases*). As proteínas MAPKs controlam diretamente a atividade de diversos fatores de transcrição relevantes para a produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias

que estão exacerbadas nas DII. Embora a MAPK p38 apresente a atividade mais aumentada dentre as MAPK na mucosa intestinal de pacientes com DII (WAETZIG^a, 2002; HOMMES, 2002), estudos recentes destacam papéis adicionais para o subtipo ERK 1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*). Em experimento *in vitro*, a inibição de ERK 1/2 resultou em redução da expressão do fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) e de fibronectina, mediados pelo TGF-beta (*transforming growth factor beta*). Os resultados confirmam a ação pró-fibrótica patológica do TGF-beta nos pacientes com Doença de Crohn estenosante, mas também indicam que seus efeitos são mediados, pelo menos em parte, pela via de sinalização celular MAPK-ERK 1/2 (MULSOW, 2005). Além disso, a ativação de ERK 1/2 mediada pela quimiocina CCL20, aumentada na inflamação intestinal, e pelo seu receptor CCR6, aumentado na diferenciação de epitélio intestinal, regula a proliferação e a migração celular incluindo células de câncer de colo, revelando um ponto de convergência entre inflamação e câncer (BRAND, 2006).

Na Doença de Crohn, o desequilíbrio da imunorregulação na mucosa intestinal manifesta-se pela produção local exagerada de citocinas do tipo Th1 (*T helper type-1*), tais como o TNF-alfa (fator de necrose tumoral alfa) (GORDON, 2005), por linfócitos T caracteristicamente resistentes à apoptose e com potencial proliferativo aumentado (BU, 2001; STURM, 2004). E, de fato, a eficiência do tratamento com medicamentos anti-TNF-alfa deve-se, pelo menos em parte, à indução de apoptose de linfócitos T da mucosa intestinal (DISABATINO, 2004). Entretanto, o processo inflamatório crônico característico das DII é complexo e envolve a destruição da barreira epitelial e ulceração, expondo ainda mais as células da lâmina própria aos antígenos bacterianos e alimentares.

Evidências recentes sugerem que interações de fatores imunitários e não-imunitários (de origem não linfóide) constituam também componentes fundamentais na patogênese de diversas doenças inflamatórias tais como asma e artrite reumatóide (GAULDIE, 1992; KOOPMAN, 1993; SCHUPPAN, 2000), assim como o que se observa nas DII (FIOCCHI, 1997; BAUMGART^a, 2007). Um dos fatores não-imunitários que tem merecido maior atenção nos processos inflamatórios é a microvasculatura tecidual, cujo estudo tem se desenvolvido recentemente. A exacerbação da capacidade de aderir leucócitos pelas células do endotélio microvascular da mucosa intestinal de pacientes com DII mostra que a interação leucócito-endotélio desempenha um papel fundamental tanto na gênese como na manutenção do processo inflamatório intestinal. Moléculas de adesão celular têm expressão aumentada no endotélio vascular da mucosa intestinal nas DII e sofrem estimulação por citocinas inflamatórias. O resultado é o aumento da adesividade das células circulantes ao endotélio vascular, promovendo infiltração tecidual de células inflamatórias que, por sua vez, produzem mais mediadores inflamatórios, gerando um ciclo vicioso (BINION, 1998; MACDONALD^b, 2005). O aumento da expressão de moléculas de adesão, incluindo as selectinas (SCHÜRMAN, 1995; ANDOH, 2005), é acompanhado pelo aumento na produção de citocinas pro-inflamatórias tais como o TNF-alfa, interferon gama, interleucina 12, interleucina 18, entre outras, e de fatores de crescimento tais como o VEGF e o TGF-beta (PODOLSKY, 2002; MACDONALD, 2005).

A angiogênese (neovascularização) é um dos achados histopatológicos mais precoces em doenças crônicas tais como a artrite reumatóide e a psoríase, e pode ser fonte de moléculas pró-inflamatórias importantes para o processo patológico (STORGARD, 1999; CREAMER, 1997). Definida como o processo de

formação de novos capilares a partir de vasos pré-existentes, a angiogênese é um constituinte fundamental de vários processos biológicos tais como crescimento, desenvolvimento, cicatrização, mas também é um fenômeno essencial no crescimento de tumores. Recentemente, as DII vêm sendo consideradas, dentre diversas condições inflamatórias crônicas mediadas pelo sistema imunitário, como doenças caracterizadas ou causadas por angiogênese excessiva ou anormal (CARMELIET, 2003). Dentre as moléculas implicadas na estimulação da angiogênese, o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) tem sido a mais estudada, participando tanto da iniciação quanto da perpetuação do processo de angiogênese, através da ligação com seus receptores específicos (FERRARA, 2003; JAVERZAT, 2002). A angiogênese dirigida por processos inflamatórios diversos, ocorre também em virtude da interação entre leucócitos e células endoteliais, de forma que a inflamação promove a angiogênese e esta, por sua vez, contribui para a perpetuação de processos inflamatórios crônicos (JACKSON, 1997) No contexto das DII, células mesenquimais tais como os fibroblastos estromais e os miofibroblastos sofrem ativação e participam do recrutamento, retenção e ativação de células inflamatórias, sintetizando mediadores inflamatórios e componentes da matriz extracelular (POWELL, 1999; ANDOH, 2005). Além disso, as células mesenquimais têm sido implicadas na resolução da atividade inflamatória, atuando sobre o remodelamento tecidual, entretanto também estão associadas com a excessiva deposição de colágeno e fibrogênese, especialmente na DC (PODOLSKY, 2002).

3 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos terapêuticos e adversos de análogos da heparina com menor potencial hemorrágico em animais com doença inflamatória intestinal estabelecida por TNBS.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1 Verificar a presença de parâmetros inflamatórios através dos escores macroscópico e histológico no tecido do cólon.

3.1.2 Análise do infiltrado celular no tecido do cólon, e identificar a presença de células mononucleares, principalmente macrófagos e linfócitos.

3.1.3 Dosagem de citocinas envolvidas na patologia das Doenças inflamatórias intestinais.

3.1.4 Verificar a participação da sinalização intracelular no tecido do cólon.

3.1.5 Análise de eventos apoptóticos no tecido do cólon.

3.1.6 Análise da síntese de glicosaminoglicanos no tecido do cólon.

3.1.7 Verificar possíveis efeitos colaterais decorrente do uso dos glicosaminoglicanos.

4 Materiais e Métodos

Os protocolos experimentais com animais de laboratório utilizados no presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética com Animais em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.1 Animais

Ratos Wistar machos, dez animais para cada grupo (pesando entre 250 e 300g), obtidos de um fornecedor local (BioCampo Produtos Biológicos LTDA – ME, Rio de Janeiro) foram mantidos em um ciclo claro e escuro (12h/12h) com a temperatura ambiente controlada (24^oC). Os animais foram armazenados em um suporte elevado, dentro de gaiolas de arame contendo três animais por gaiola. Ração padrão formuladas por laboratório e bebedouro com água foram disponibilizadas aos animais *ad libitum*.

4.2 Indução da colite experimental

No dia (d) zero, os ratos foram cuidadosamente anestesiados com uma injeção intramuscular de 100mg/kg de cetamina (Cristália, São Paulo, Brasil) e 16mg/kg de Xilazina (Bayer AS, São Paulo, Brasil), e a colite induzida pela instilação de 0,8ml de uma solução contendo 20mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) em etanol 17,5% (Merck, Damstadt, Germany), usando uma cânula de borracha (8cm de comprimento), inserida através do reto. Aos animais foram oferecidos o acesso a ração padrão e água *ad libitum*. Manifestações clínicas como diarreia, sangramento e perda de peso foram observadas durante este período.

4.3 Procedimentos experimentais

Após um período inicial de aclimação de uma semana, os animais foram randomicamente agrupados em cinco grupos de dez animais, e observados durante uma semana. Os animais do grupo TNBS foram submetidos à indução da colite com o TNBS, mas não receberam nenhum tratamento, sendo os animais sacrificados no dia experimental sete. Quatro grupos de animais foram tratados com os diferentes glicosaminoglicanos, sendo atribuído as seguintes denominações: grupo TNBS+HepMam, animais tratados com heparina não fracionada de mucosa intestinal de porco (Sigma, St. Louis, MO, USA); grupo TNBS+HepSp, animais tratados com heparina da ascídia *S.plicata*; grupo TNBS+DSMan, animais tratados com dermatam sulfato de mucosa intestinal de porco (Sigma, St. Louis, MO, USA); grupo TNBS+DSSp, animais tratados com dermatam sulfato da ascídia *S.plicata*. Os animais destes grupos foram submetidos a indução da colite com TNBS, seguido pelo tratamento com os glicosaminoglicanos na dose de 8mg/Kg por via subcutânea, por dia, durante sete dias. O grupo Controle foi constituído de animais que não receberam o TNBS e nem tratamento com os diferentes glicosaminoglicanos, e foram sacrificados após o período de aclimação.

Para os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de quetamina (Cristália, São Paulo, Brasil), na dose de 100mg/kg, e de xilazina (Bayer AS, São Paulo, Brasil), na dose de 16mg/kg e, em seguida, submetidos a uma leve laparotomia sob condições estéreis. O cólon distal foi removido, aberto longitudinalmente e lavado com salina estéril. Imediatamente após a lavagem, o cólon foi examinado e aos danos visíveis atribuídos escores. Após a atribuição dos escores, quatro amostras de tecido do cólon foram obtidas

para análise histológica de rotina, imunohistoquímica, cultura de tecido e bioquímica dos glicosaminoglicanos. Um rápido procedimento de morte através de deslocamento cervical foi uniformemente realizado em todos os animais.

4.4 Avaliação macroscópica do cólon

As lesões do cólon foram avaliadas e escores foram atribuídos por dois observadores independentes, de acordo com os seguintes parâmetros macroscópicos: 0, sem alteração; 1, hiperemia localizada; 2, úlceras lineares sem inflamação; 3 úlceras lineares com inflamação em um local; 4, dois ou mais locais com úlceras e ou inflamação; 5, dois ou mais locais com inflamação e com úlceras maiores que 1cm de comprimento (MORRIS, 1989).

4.5 Escore histológico do cólon

As amostras de tecido foram fixadas em 40g/l de formaldeído e emblocadas em parafina. Secções de 5µm de espessura foram cortadas, coradas com hematoxilina-eosina e analisadas microscopicamente por dois observadores independentes. Os seguintes parâmetros histológicos foram estudados: ulceração, hiperplasia e infiltrado inflamatório. Para o infiltrado inflamatório e a hiperplasia a seguinte classificação foi considerada: 3, intensa; 2, moderada; 1, leve; 0, ausente. Para úlceras a graduação foi: 4, erosão glandular difusa ou ulceração profunda extensa; 3, erosão glandular ou ulceração profunda e focal; 2, ulceração superficial e difusa; 1, ulceração superficial e focal; 0, ausente; com o escore total alcançando de 0 a 10 (HAHN, 2001).

4.6 Análise imunohistoquímica do cólon

As amostras de tecido emblocadas em parafina foram submetidas a avaliações histoquímicas, através da técnica de imunoperoxidase indireta, usando os seguintes anticorpos: anti-corpo mono-clonal anti-rato CD3(PC3/188), para linfócitos T (Santa Cruz Biotechnology, INC), anticorpo mono-clonal anti-rato ED1, para macrófagos (Serotec, USA), anticorpo mono-clonal anti-rato NF-Kappa B p65(F-6) (Santa Cruz Biotechnology, INC). Resumidamente, as secções de tecido foram submetidas à recuperação antigênica com tampão citrato pH6 na panela de pressão por 2 minutos. Em seguida submetidas ao bloqueio de peroxidase endógena com uma solução de H₂O₂ a 3% em metanol por 20 min. Então as amostras foram incubadas à temperatura ambiente com um tampão de bloqueio contendo 2,5% albumina bovina, 2,0% de leite desnatado e 8,0% de soro fetal bovino por 30 min, sob agitação. Para a marcação com NF-Kappa B, os tecidos foram permeabilizados com PBS +TRITON-X 0,3%, antes do procedimento de bloqueio de ligações inespecíficas.

Em seguida, foram aplicados 50µl de cada anticorpo monoclonal por 1h, diluídos 1:50 com PBS. Para o controle negativo, as secções de tecido de cada animal foram incubadas apenas com PBS ou com 50µl de IgG1 de camundongo. Após lavagem em PBS por 10min, todas as secções foram incubadas por 45min com 50µl de um anticorpo IgG secundário de cabra contra camundongo, conjugado à peroxidase (Zymed Laboratories In.). Após uma nova lavagem com PBS e posterior revelação com uma solução contendo peróxido de hidrogênio e diminobenzidina, as secções foram desidratadas e montadas em meio de montagem histológico, e analisadas por dois observadores independentes, usando microscópio óptico com aumento de 400X. As células da lâmina própria que exibiram uma

reatividade identificável na sua superfície, diferente do background foram consideradas como positivas. Todas as células da lâmina própria foram avaliadas em no mínimo quinze áreas distintas, utilizando um sistema quantitativo de captura de imagens de alta qualidade (2048 x 1536 pixels), Image Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Os resultados foram expressos pelo percentual de células positivas da lâmina própria.

4.7 Microscopia confocal

Na análise por imunofluorescência, as secções emblocadas foram primeiramente submetidas a técnica de recuperação antigênica com tampão citrato pH6 na panela de pressão por 2 minutos. Em seguida foram incubadas à temperatura ambiente com um tampão de bloqueio contendo 2,5% de albumina sérica bovina (BSA), 2,0% de leite desnatado e 8,0% de soro fetal bovino (FCS), sob agitação, por 30 min. As secções foram, então, apropriadamente incubadas, diluindo primeiramente o anticorpo monoclonal anti-rato p-ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology, INC)(1:50), numa solução 1,0% de soro fetal bovino (FCS) em PBS, e mantidas por uma hora em câmara úmida a 37°C. Em seguida, as secções de tecido foram lavadas 3 vezes em PBS por 5min cada, e incubadas por 1h com a fração Fab do anticorpo IgG anti-camundongo de cabra, conjugado a fluoresceína (FITC) (Dako A/S, Glostrup, Denmark). A contra-coloração foi feita com 0,01% de azul de Evan's em PBS, a 37°C por 15 min. Posteriormente, as lâminas foram montadas com um meio anti-embaçante contendo glicerol e p-fenilenodiamina (Sigma Chemical Co., St Louis Mo, USA e observadas com um microscópio confocal Zeiss LSM 510. Pelo menos quatro imagens representativas de cada lâmina foram capturadas para análise. Para o controle negativo, cada amostra foi incubada com PBS e outra com anticorpo anti-camundongo IgG1, conjugado com FITC.

A análise quantitativa das secções foi feita com o uso do programa quantitativo de captura de imagens de alta qualidade (2048 x 1536 pixels), Image Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Todas as células da lâmina própria foram avaliadas em no mínimo quinze áreas distintas, e os resultados expressos pelo percentual de células positivas da lâmina própria.

4.8 Cultura de tecidos e quantificação das citocinas

Os explantes da mucosa do cólon foram mantidos em cultura por 24h a 37°C sob uma atmosfera de 95% de CO₂, utilizando-se um procedimento pré-estabelecido. Todos os meios de cultura consistiram de meio RPMI 1640 e 10% de soro fetal bovino (Life Technologies, Great Island, USA), contendo penicilina (100KU/L) e estreptomicina (100mg/L). Após 24h de cultura, o meio dos órgãos foi coletado e utilizado para os ensaios de dosagem das citocinas TNF- α , TGF- β e VEGF. As amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes utilizados para medir as concentrações das citocinas TNF- α , TGF- β e VEGF, através do método de ELISA específico para estas moléculas (R&D System, Mineapolis, MN). Os pesos úmidos das biopsias dos grupos estudados foram comparados com a quantidade de proteína dos homogenatos dos tecidos. O valor obtido nas dosagens de TNF- α , TGF- β e VEGF, foram normalizados pela quantidade de proteína dos homogenatos. As concentrações mínimas detectadas pelos ensaios com TNF- α , TGF- β e VEGF foram respectivamente: < 5,0 pg/mL, 4,2 pg/mL e 3,0 pg/mL.

4.9 Histomorfometria da marcação com sirius red

Amostras de tecido do cólon dos ratos dos grupos estudados foram fixados em 40g/L de formaldeído e emblocados em parafina. Secções de 5µm de espessura foram cortadas em e coradas com uma técnica modificada de Sirius red (DOLBER, 1987, 1993), para marcação de colágeno. Histomorfometria das secções de tecido foram analisadas usando um sistema de análise de imagem, composto por uma câmara digital (Coolpix 990, Nikon, Japan) acoplada a um microscópio óptico (Eclipse 400, Nikon, Japan). No mínimo, quinze áreas distintas do tecido intestinal das secções marcadas com Sirius red foram capturadas dos animais, com um aumento de 400X. A quantificação foi estimada em imagens capturadas de alta qualidade (2048 x 1536 pixels), considerando o percentual de áreas marcadas, pelo total do tecido (marcado e não marcado), utilizando o Image Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). A densidade relativa de colágeno foi expressa em valores percentuais.

4.10 Isolamento dos glicosaminoglicanos

Amostras intestinais secas (~0,5g) foram individualmente suspensas em 10 ml de tampão 0,1 M acetato de sódio (pH 5,5), contendo 100mg de papaína, 5mM de EDTA, e 5mM de cisteína e incubadas a 60°C por 24h. As misturas foram centrifugadas (2000 x g por minuto a temperatura ambiente) e 100mg de papaína em 20ml do mesmo tampão, contendo 5mM de EDTA e 5mM de cisteína foram adicionadas e a mistura separada por centrifugação e incubada por mais 24h. O sobrenadante limpo das duas extrações foi agrupado e, em seguida, os polissacarídeos foram precipitados com uma solução de cloreto de cetilpiridina (concentração final 0,5%), seguido de 2 volumes de etanol 95%, e mantido a 4°C por

24h. Os precipitados formados foram coletados por centrifugação (2000 x g por 10min a temperatura ambiente), liofilizados e dissolvidos em 2ml de água destilada. A quantidade de glicosaminoglicanos nas amostras intestinais foi estimada pela quantidade de ácido hexurônico, utilizando a técnica de reação com carbazol (BITTER, 1962).

Espécimes adultas de ascídia *Styela plicata*, foram coletadas no Quadrado da Urca, Baía de Guanabara, Rio de Janeiro. A túnica das ascídias eram abertas, as vísceras separadas e deslipidadas em acetona a 4 °C, por 24 h, após secas em estufa 60 °C. Aproximadamente (20 g), de amostras de vísceras secas da *S. plicata* foram processadas conforme descrito acima, no mínimo quatro extrações. Entretanto Os GAGs presentes nos sobrenadantes das quatro extrações foram precipitados separadamente com uma solução de cloreto de cetilperidina (CPC) 0,5 % e quantidades crescentes de etanol absoluto, (50%, 75% e 100%), adaptado de Vieira e colaboradores (1991).

4.11 Eletroforese em gel de agarose

Os glicosaminoglicanos extraídos das diferentes amostras de intestino intactos ou degradados enzimaticamente foram analisados por eletroforese em gel de agarose, como descrito previamente (DIETRICH, 1976). Aproximadamente 1,5µg (em quantidade de ácido urônico) dos glicosaminoglicanos e uma mistura de glicosaminoglicanos padrão, contendo condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato (na quantidade de 1,5µg cada) foram aplicadas em um gel de agarose 0,5%, em tampão 0,05M 1,3 diaminopropano: acetato (pH 9,0), e corrida por 1h a 110mV. Após a eletroforese, os glicosaminoglicanos foram fixados no gel com uma solução aquosa de brometo de cetilmetilamônia 0,1% (CETAVLON) e corados com azul de toluidina 0,1% em solução de ácido acético: etanol: água

(0,1:5:5, v/v/v). A proporção relativa dos glicosaminoglicanos sulfatados foi estimada pela densitometria das bandas metacromáticas em um densitômetro da Biorad.

4.12 Tratamento enzimático e químico

Os glicosaminoglicanos extraídos das amostras intestinais (~100 μ g) foram incubados com 0,01U de condroitinase AC ou condroitinase ABC em 0,1ml de tampão 50mM Tris-HCl (pH 8,0), contendo 5mM de EDTA e 15mM de acetato de sódio. Após incubação a 37°C por 12h, 0,01U de enzima foram adicionadas à mistura e a reação continuada por um período adicional de 12 h. Clivagem desaminativa com ácido nitroso dos glicosaminoglicanos sulfatados foi realizada como descrito por Shievely (1989). A degradação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose.

4.13 Avaliação da ação anti-coagulante

Para determinar o efeito dos glicosaminoglicanos na coagulação, os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de 100mg/kg de quetamina (Cristália, São Paulo, Brasil) e 16mg/kg de Xilazina (Bayer AS, São Paulo, Brasil). A artéria carótida foi isolada e puncionada com uma seringa contendo citrato de sódio, para coleta do sangue. Os testes de aPTT foram realizados com o uso de um coagulômetro Amelung KC4A (sigma Diagnostics), conforme metodologia descrita por Anderson, e col., 1976. As amostras de plasma pobre em plaquetas (100 μ l) foram incubadas a 37°C por 1 min e após esse tempo 100 μ l de cefalina ativada (Celite Biolab) foi adicionado. Após incubação por 2 min, a reação foi disparada com

a adição de 100µl de CaCl₂ 25mM e o tempo necessário para a formação do coagulo registrado em um coagulômetro.

4.14 Detecção da apoptose

As amostras de tecido do cólon dos animais dos grupos estudados foram fixadas em 40g/L de formaldeído, emblocados em parafina e cortados em secções de 5µm de espessura. As células apoptóticas foram detectadas pelo ensaio de marcação com TUNEL (*terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT)-mediated dUDP-biotin nick end labeling*), utilizando o quite de detecção de apoptose *in situ*, Apop Tag Fluorescente (Chemicon Int. Inc., Temecula, CA, USA), de acordo com as recomendações do manual de instruções. O número de células positivas foi contado em 30 áreas do cólon escolhidas ao acaso.

4.15 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando um software SPSS para Windows (Versão 10.1, SPSS Inc., 1989-1999, EUA). Diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliadas por análise de variância utilizando o teste one-way ANOVA, seguido de teste *post hoc* (teste Dunnett's T3) para comparações múltiplas dois a dois. Correlações entre os escores inflamatórios, a densidade de células positivas avaliadas por imunohistoquímica e imunofluorescência, e os níveis de citocinas foram avaliadas usando o coeficiente de correlação de Spearman. Os valores foram expressos como médias e erro padrão da média, ou como medianas (com os percentis 25 e 75). O nível de significância foi considerado para P<0,05.

5 Resultados

5.1 Mudanças histopatológicas no tecido do cólon

A colite induzida por TNBS é um modelo bem estabelecido em roedores para se estudar o efeito de novos agentes terapêuticos. A administração intra-retal de TNBS em ratos induz uma colite com características semelhantes às aquelas observadas em seres humanos. Além disso, tem sido descrito que a heparina e seus análogos são potentes agentes antiinflamatórios no tratamento da DII, tanto em testes clínicos em seres humanos, quanto em animais (FOLWACZNY, 1999; BLOOM, 2004). Entretanto, a terapia com heparina pode causar hemorragia e outros efeitos colaterais (PAPA A, 2000; PANES, 2000; GAO, 2005). Baseado nestes dados, neste trabalho, nós investigamos o efeito da administração de análogos da heparina obtido de invertebrado marinho, utilizando um modelo de inflamação intestinal em ratos induzido por TNBS.

Nós observamos que os animais que receberam TNBS desenvolveram colite acompanhada de uma perda de peso significativa. Mudanças morfológicas macroscópicas evidentes foram observadas predominantemente na parte distal do cólon. As lesões inflamatórias no cólon incluíam edema da mucosa, ulceração e evidência de inflamação transmural, responsáveis pelo aumento do escore macroscópico observado nas Figuras 5 e 6 A. O tratamento terapêutico da inflamação consistiu da administração subcutânea de glicosaminoglicanos de mamífero e ascídia, iniciado 2h após a administração do TNBS e continuando por 7 dias. Após o tratamento dos animais com os glicosaminoglicanos, uma atenuação marcante da inflamação foi observada ao nível macroscópico, quando comparado com o grupo de animais TNBS que não receberam os glicosaminoglicanos (Figuras 5 e 6A).

A análise histológica das secções de intestino fixadas com formalina e coradas com hematoxilina-eosina (Figuras 5), revelou um aumento do escore inflamatório microscópico nos animais que receberam TNBS, quando comparado com aqueles que não receberam o TNBS (Figura 5 e 6B). O tratamento com os glicosaminoglicanos de mamífero ou de ascídia por 7 dias reduziu significativamente o escore inflamatório microscópico nos animais que receberam TNBS. Entretanto, o tratamento com heparina e DS de *S. plicata* produziu um maior efeito antiinflamatório, conforme observado pela diminuição mais acentuada do escore microscópico (Figura 5 e 6B).

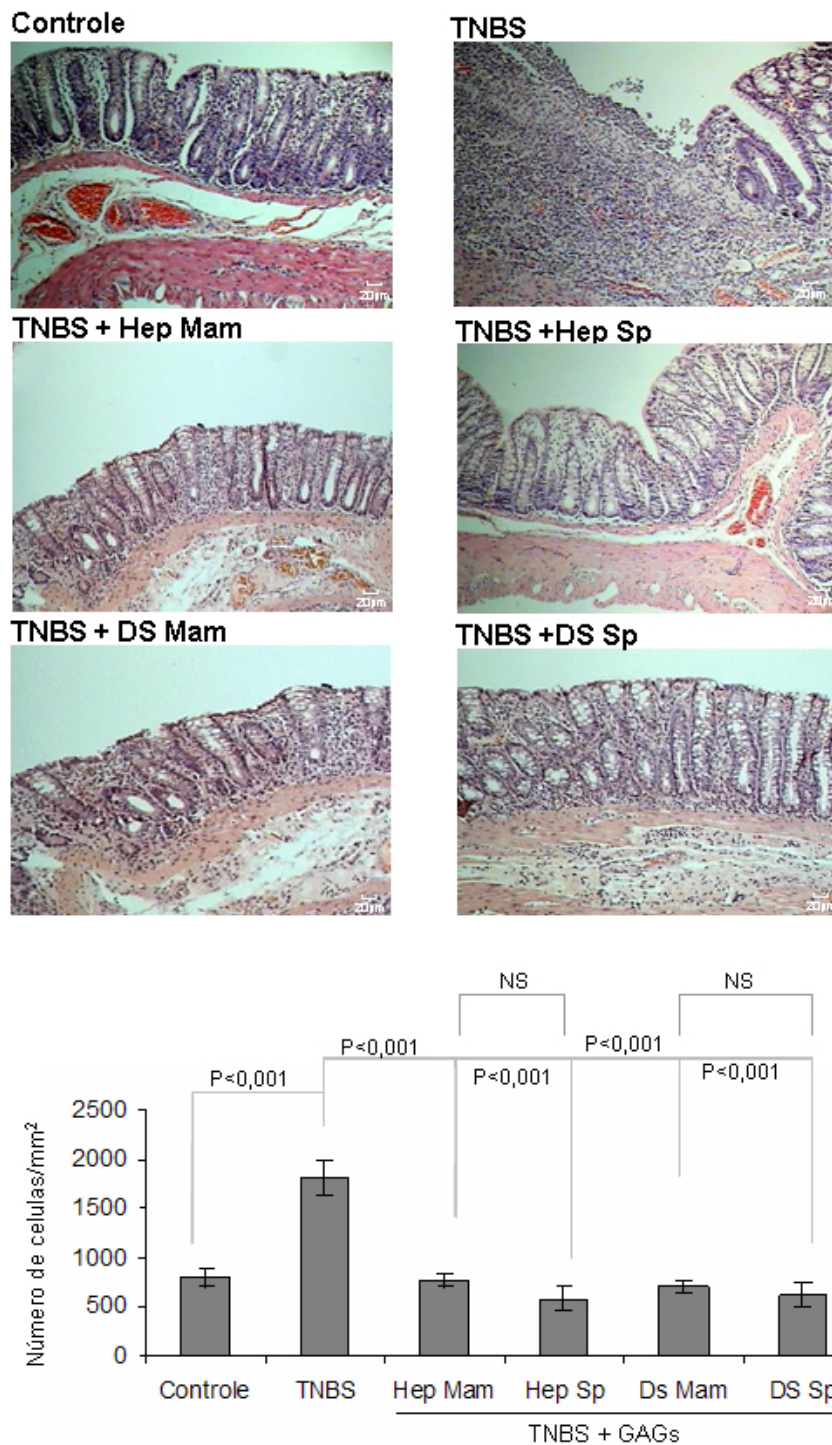


Figura 5: Marcação por HE (hematoxilina e Eosina) das secções de tecido obtidas do cólon distal dos animais: cólon do rato controle saudável, cólon de ratos com colite sem tratamento (TNBS) e cólon de ratos com colite, mas que receberam GAGs (TNBS+GAGs), respectivamente. Amostra do colón do grupo que não recebeu tratamento, apresentava ulceração, intenso infiltrado celular e edema, enquanto que os animais tratados com GAGs apresentam menos aspectos de inflamação. As diferenças foram analisadas usando o ANOVA one-way com o teste Dunnett's para comparações múltiplas. As diferenças significantes estão apresentadas no gráfico de barras (aumento original 100X). NS: Não Significante.

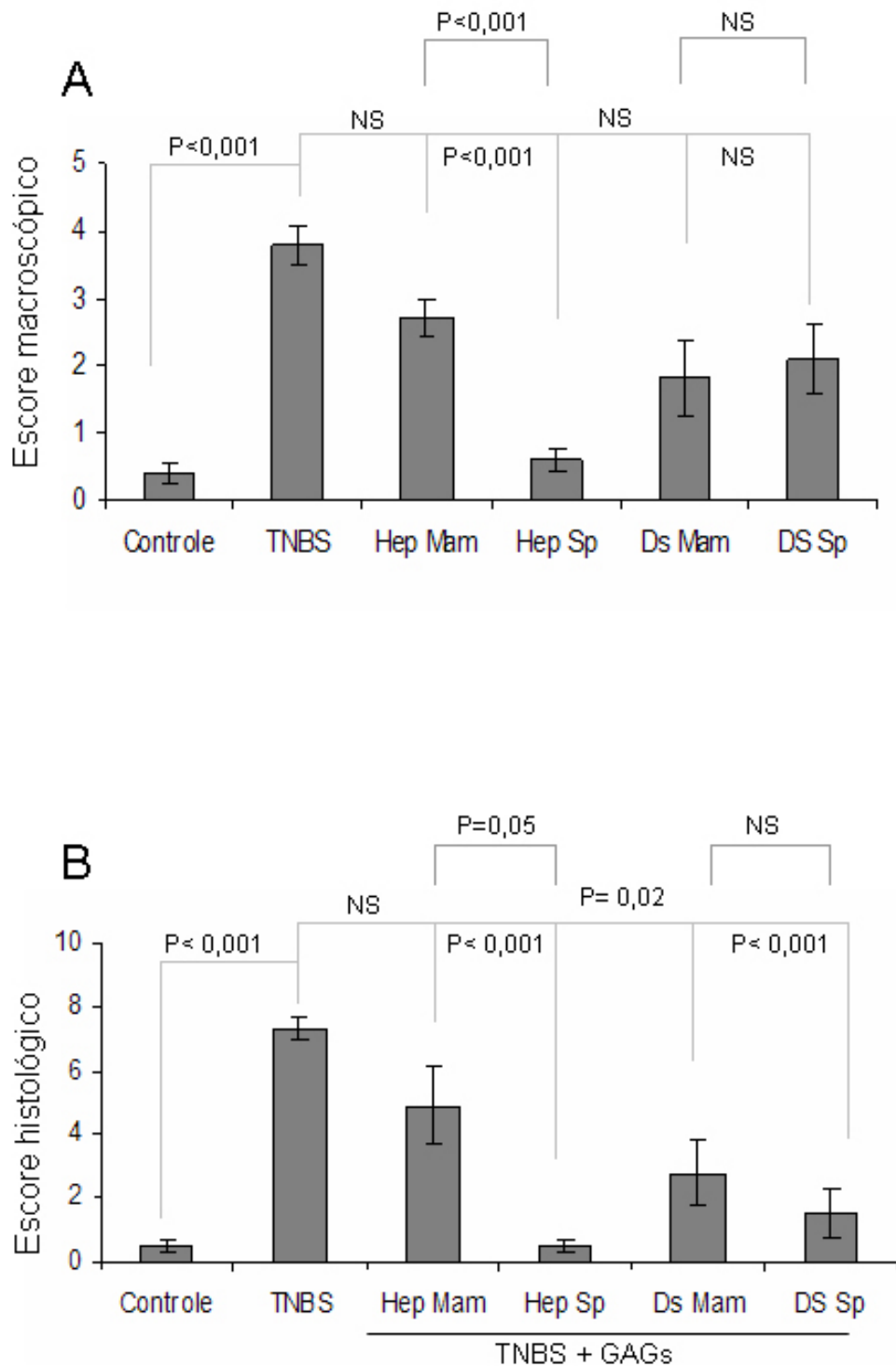


Figura 6: Escore total dos parâmetros macroscópico (A) e microscópico (B) do cólon do rato controle saudável, cólon de ratos com colite sem tratamento (TNBS) e cólon de ratos com colite, mas que receberam GAGs (TNBS+GAGs), respectivamente. As diferenças foram analisadas usando o ANOVA one-way com o teste Dunnett's para comparações múltiplas. As diferenças significativas estão apresentadas no gráfico de barras. NS: Não Significante.

5.2 Infiltrado celular no cólon inflamado

A colite induzida por TNBS é caracterizada por uma resposta imunológica mediada por linfócitos Th1, apresentando um intenso infiltrado de linfócitos e macrófagos (LAWRANCE^b, 2003; BUSSEROLLES, 2005). Dessa forma, nós avaliamos o padrão do infiltrado celular no tecido do cólon inflamado (Figuras 7 e 8). O número de linfócitos T-CD4⁺ (Figura 7) e macrófagos (Figura 8) aumentou significativamente na lâmina própria do cólon de todos os animais que receberam TNBS, quando comparado com o grupo controle que não recebeu TNBS. O tratamento com os glicosaminoglicanos de mamífero e de ascídia reduziu o número tanto de linfócitos (Figura 7) quanto o de macrófagos (Figura 8) nos animais que receberam TNBS. O tratamento com heparina, independentemente de sua origem (mamífero ou ascídia), foi mais efetivo na redução das células inflamatórias, quando comparado com o tratamento com o dermatam sulfato. Entretanto, a redução da infiltração de macrófagos pela heparina de ascídia foi maior que aquela de mamífero (Figura 8). Os dermatam sulfatos de mamífero e de ascídia reduziram a infiltração de macrófagos e linfócitos na mesma extensão.

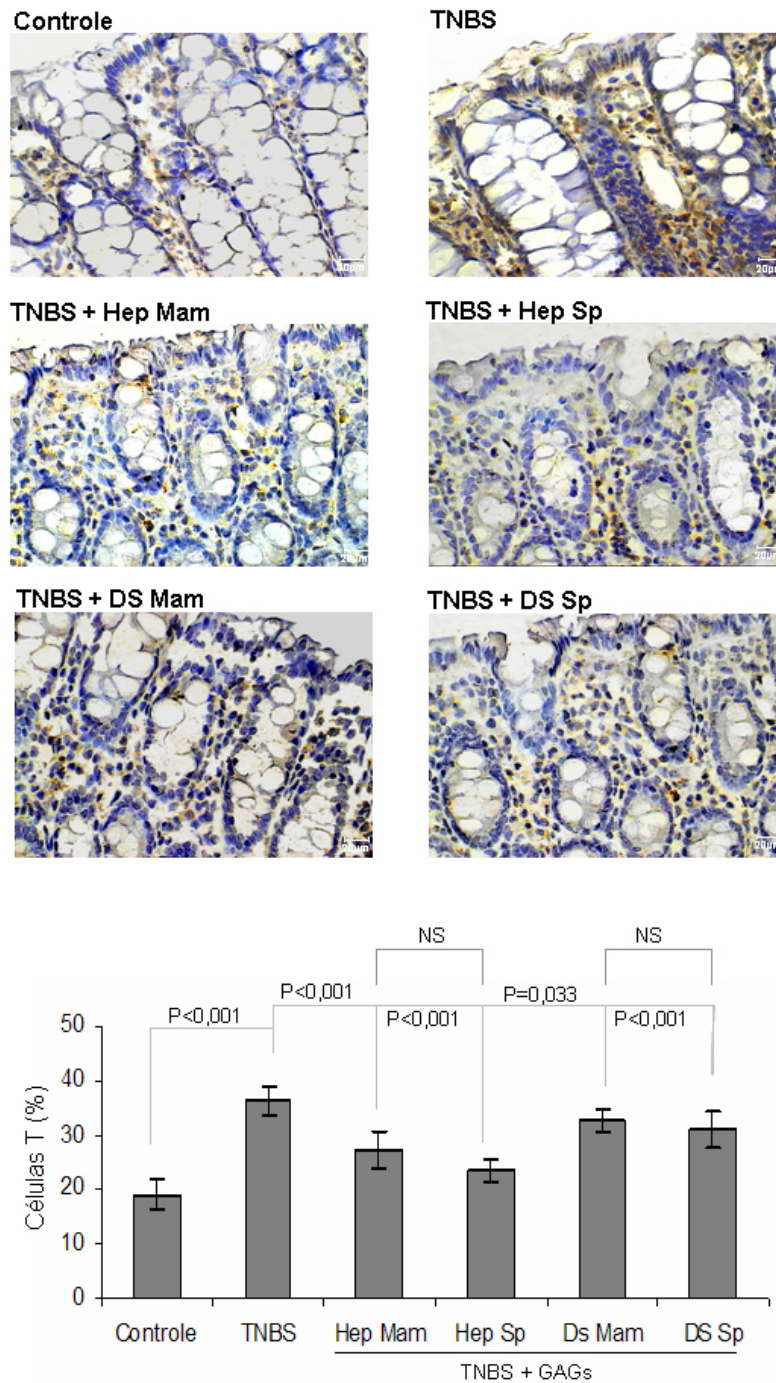


Figura 7: Estudo Imunohistoquímico das secções de tecido do cólon marcados com anticorpo monoclonal, anti-CD3, através da técnica de imunoperoxidase mostra a marcação para linfócitos na lâmina própria dos grupos::: rato controle saudável, ratos com colite sem tratamento (TNBS) e ratos com colite, mas que receberam GAGs (TNBS+GAGs), respectivamente. As diferenças foram analisadas usando o ANOVA one-way com o teste Dunnett's para comparações múltiplas. As diferenças significativas estão apresentadas no gráfico de barras (aumento original 400X). NS: Não Significante.

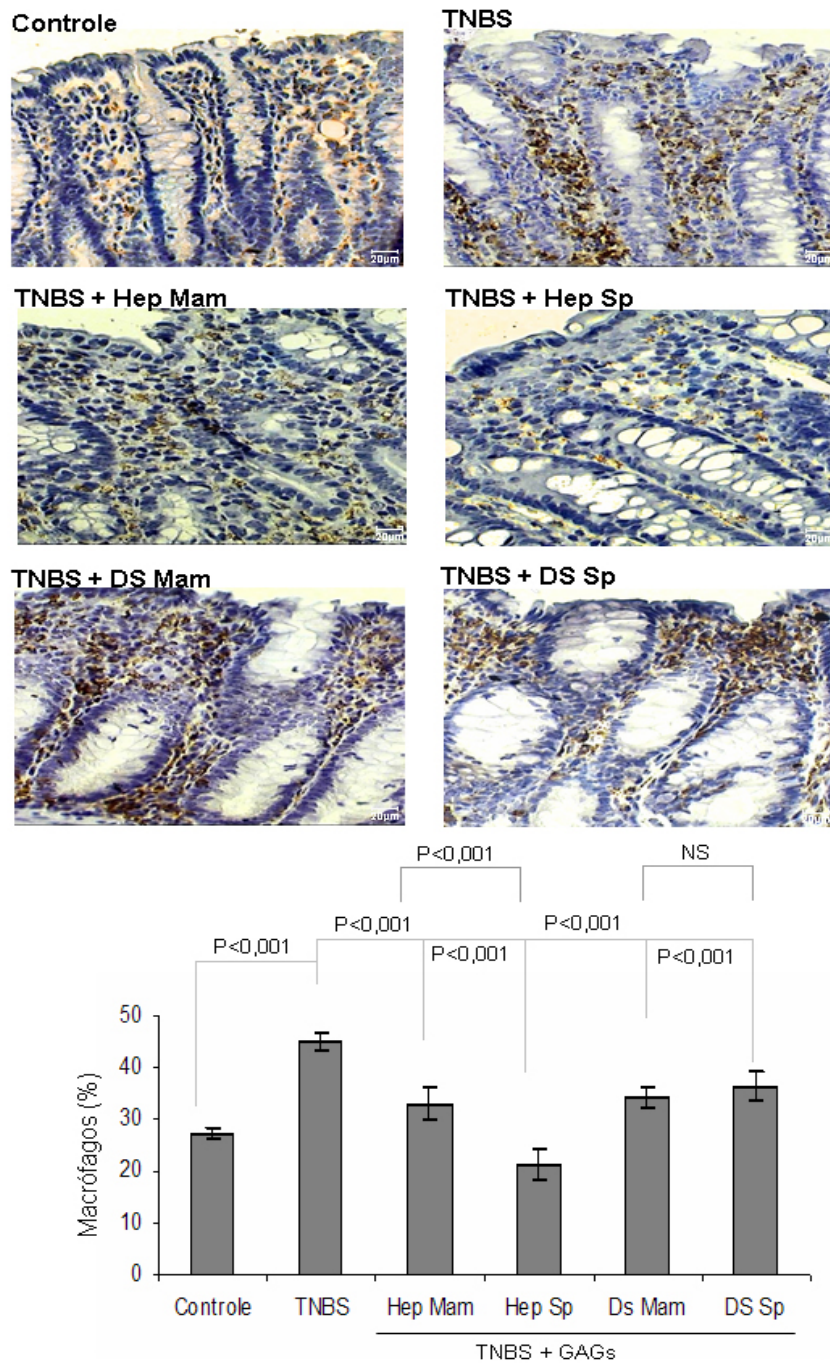


Figura 8: Estudo Imunohistoquímico das secções de tecido do cólon marcados com anticorpo monoclonal, anti-ED1, através da técnica de imunoperoxidase mostra a marcação para macrófagos na lâmina própria dos grupos: rato controle saudável, ratos com colite sem tratamento (TNBS) e ratos com colite, mas que receberam GAGs (TNBS+GAGs), respectivamente. As diferenças foram analisadas usando o ANOVA one-way com o teste Dunnett's para comparações múltiplas. As diferenças significativas estão apresentadas no gráfico de barras (aumento original 400X). NS: Não Significante.

5.3 Produção de citocinas e sinalização intracelular no tecido do cólon

Na DII, o aumento da produção de TNF- α está associado a danos teciduais mediados pela resposta imune do infiltrado celular (HOLLENBACH, 2005). O TNF- α induz a ativação da via do NF-Kappa B em uma variedade de tipos celulares. Portanto, decidimos investigar se o tratamento com os glicosaminoglicanos poderia reduzir a produção de TNF- α (Figura 9A) e a ativação de NF-Kappa B (Figura 10) no cólon inflamado por TNBS.

A administração retal de TNBS induziu um aumento dos níveis de TNF- α no cólon inflamado em aproximadamente 4 vezes (Figura 9A). O aumento da produção do TNF- α foi acompanhado por um drástico aumento da ativação da via do NF-Kappa B (Figura 10). A administração subcutânea de heparina ou dermatam sulfato, independentemente da origem, reduziu drasticamente a produção de TNF- α para níveis basais, semelhantes aos observados nos animais controle ($p < 0,001$) (Figura 9A). Não houve diferença entre os efeitos do tratamento do dermatam sulfato e da heparina, independente de sua origem (mamífero ou ascídia). De forma semelhante, o tratamento com glicosaminoglicanos reduziu drasticamente a ativação do NF-Kappa B no cólon inflamado (Figura 10). Não houve diferença entre o efeito do tratamento com dermatam sulfato e heparina de mamífero, assim como entre dermatam sulfato e heparina de ascídia, sendo que a heparina da ascídia mostrou-se ligeiramente mais eficaz do que a heparina de mamífero (Figura 10).

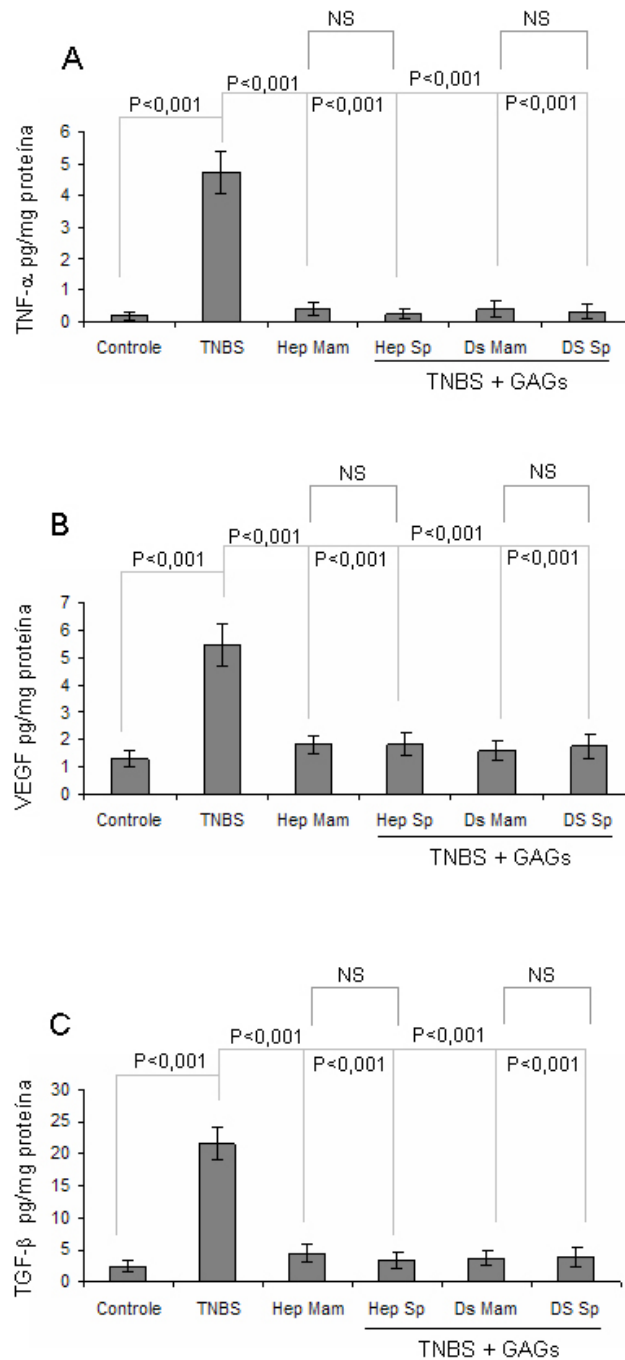


Figura 9: Os níveis das citocinas TNF- α (A), VEGF (B) e TGF- β (C), foram dosadas no sobrenadante das culturas de órgãos, através do ensaio de ELISA, e apresentados como pg/mg de proteína, nos grupos: rato controle saudável, cólon de ratos com colite sem tratamento (TNBS) e cólon de ratos com colite, mas que receberam GAGs (TNBS+GAGs), respectivamente. As diferenças foram analisadas usando o ANOVA one-way com o teste Dunnett's para comparações múltiplas. As diferenças significativas estão apresentadas no gráfico de barras. NS: Não Significante

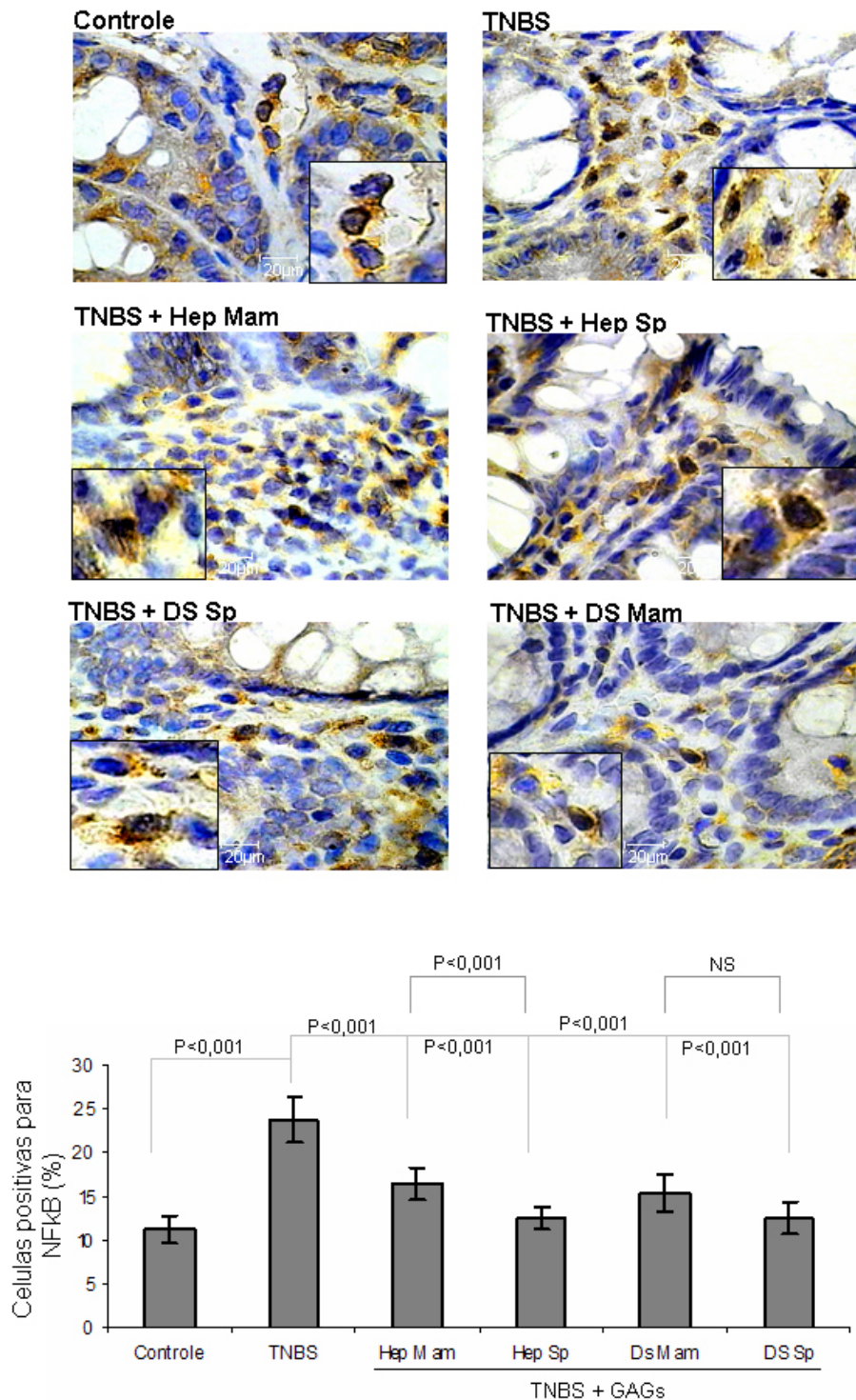


Figura 10: Estudo Imunohistoquímico das secções de tecido do cólon marcados com anticorpo monoclonal anti-NFKB p65, através da técnica de imunoperoxidase nos grupos: rato controle saudável, cólon de ratos com colite sem tratamento (TNBS) e cólon de ratos com colite, mas que receberam GAGs (TNBS+GAGs), respectivamente. As diferenças foram analisadas usando o ANOVA one-way com o teste Dunnett's para comparações múltiplas. As diferenças significativas estão apresentadas no gráfico de barras (aumento original 1000X).

A produção de TNF- α é também regulada por MAPK-cinases e inibidores destas enzimas podem, de maneira eficiente reduzir a síntese de TNF- α (ref 24 e 58 artigo 2). Portanto, avaliamos a atividade da MAPK-cinase, ERK1/2 no cólon inflamado, antes e após o tratamento com os glicosaminoglicanos (Figura 11). A administração de TNBS induziu um aumento de 10 vezes no número de células com ERK1/2 ativo no cólon dos animais sem tratamento com os glicosaminoglicanos (Figura 11). Após o tratamento com os GAGs, o número de células com ERK1/2 ativo diminuiu drasticamente. Os glicosaminoglicanos de mamífero reduziram o número de células com ERK ativo em cerca de 50%, enquanto que com os glicosaminoglicanos da ascídia a redução foi de 100% (Figura 11). Não foi observada diferença significativa no efeito do tratamento dos glicosaminoglicanos no que diz respeito a dermatam sulfato e heparina da ascídia, e dermatam sulfato e heparina de mamífero (Figura 11).

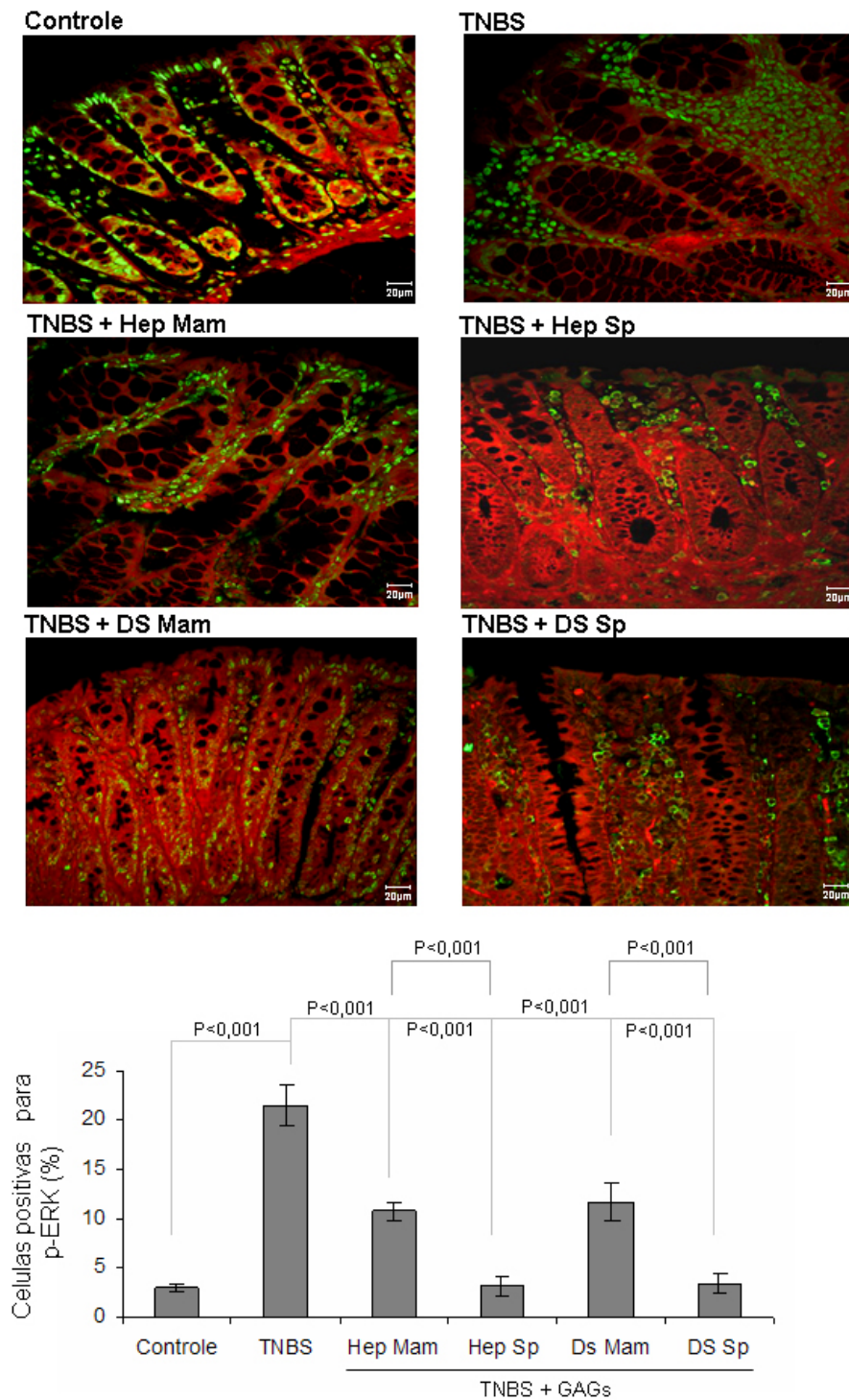


Figura 11: Estudo por Imunofluorescência das secções de tecido do marcados com anticorpo monoclonal anti-pERK 1/2, nos grupos: rato controle saudável, cólon de ratos com colite sem tratamento (TNBS) e cólon de ratos com colite, mas que receberam GAGs (TNBS+GAGs), respectivamente. As diferenças foram analisadas usando o ANOVA one-way com o teste Dunnett's para comparações múltiplas. As diferenças significativas estão apresentadas no gráfico de barras (aumento original 400X).

O TGF- β é uma citocina chave durante o período ativo da inflamação, atuando na restituição de células epiteliais e no remodelamento da matriz extracelular após a injúria intestinal (DIGNASS, 1996; BABYATSKY, 1996). Além disso, o aumento do TGF- β está associado com a deposição de colágeno que pode resultar em fibrose (LAWRANCE^a, 2001). Portanto, nós investigamos o efeito da administração dos glicosaminoglicanos na produção de TGF- β (Figura 9B) e na deposição de colágeno (Figura 12) no cólon inflamado. O tratamento com TNBS induziu um aumento de cerca de 4 vezes na produção de TGF- β no cólon inflamado (Figura 9B). O aumento do TGF- β foi acompanhado pelo aumento da deposição de colágeno na lâmina própria (Figura 12). A administração dos glicosaminoglicanos, independente de sua origem (mamífero ou ascídia) ou do tipo (dermatam sulfato ou heparina) reduziu drasticamente a produção de TGF- β (Figura 9B) e a deposição de colágeno no cólon (Figura 12) para os níveis observados nos animais controle.

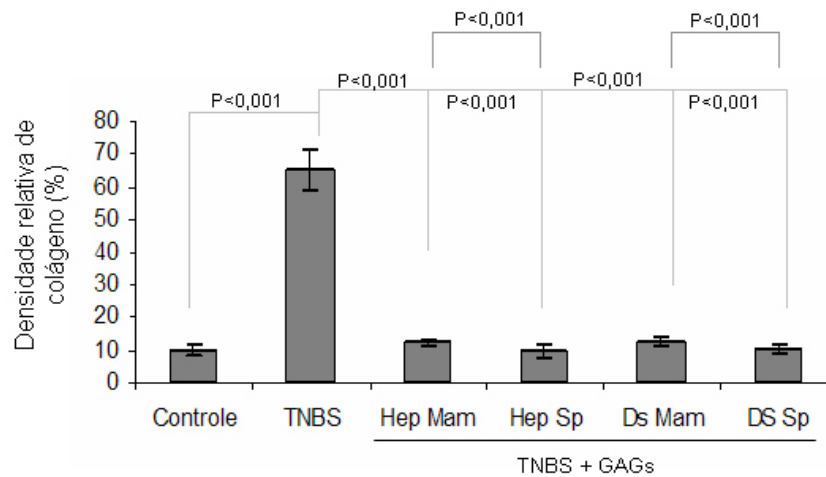
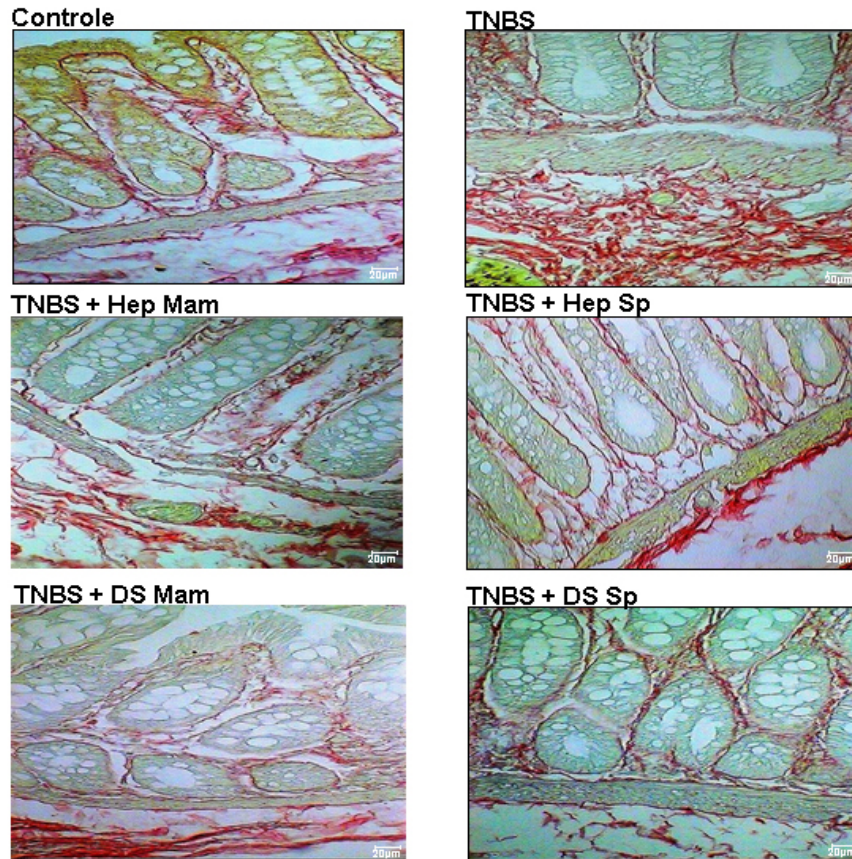


Figura 12: Quantidade de colágeno marcados por Sirius red, através da técnica de picrossirius, mostrado em secções do colón dos animais: rato controle saudável, ratos com colite sem tratamento (TNBS) e ratos com colite, mas que receberam GAGs (TNBS+GAGs), respectivamente. As diferenças foram analisadas usando o ANOVA one-way com o teste Dunnett's para comparações múltiplas. As diferenças significativas estão apresentadas no gráfico de barras (aumento original 400X).

O VEGF é uma citocina angiogênica que modula não apenas a proliferação celular (KEVIL, 1998), mas também a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (KIM, 2001). O VEGF encontra-se aumentado no soro e no tecido de pacientes com DII (BOUSVAROS 1999; KANAZAWA 2001). Recentemente, foi mostrado que a angiogênese é um componente integral da patogénia da DII (DANESE, 2006) e que a sua inibição atenua a inflamação (CHIDLOW, 2007; KOUTROUBAKIS, 2006). Portanto, nós investigamos se o tratamento com os glicosaminoglicanos afetava a produção de VEGF no colo inflamado (Figura 9C). O tratamento com TNBS induziu um aumento de cerca de 5,5 vezes a quantidade de VEGF no cólon inflamado (Figura 9C). Observamos uma relação direta entre o aumento do VEGF com atividade inflamatória, indicado pelo aumento dos parâmetros inflamatórios (Figuras 5–11). O tratamento com os glicosaminoglicanos, independente de sua origem (mamífero ou ascídia) ou tipo (dermatam sulfato ou heparina), reduziu os níveis de VEGF no cólon inflamado para aqueles observados nos animais controle (Figura 9C). A redução do VEGF está correlacionado com a atenuação da inflamação, como indicado pela diminuição dos parâmetros inflamatórios (Figuras 5-11).

5.4 Apoptose no tecido do cólon

A inflamação crônica do tecido leva à destruição do epitélio intestinal devido à ação de citocinas produzidas pelas células inflamatórias. Dados recentes demonstram que o ligante relacionado com a indução de apoptose (TRAIL) está relacionado com as lesões inflamatórias das células epiteliais (BEGUE, 2006). Além disso, tem sido mostrado que o TNF- α induz a apoptose nestas células através do aumento da expressão de receptores pró-apoptóticos (TRAIL-R2) (BEGUE, 2006).

Portanto, nós investigamos se a proteção epitelial observada após o tratamento com glicosaminoglicanos nos animais administrados com TNBS poderia estar relacionada com a atenuação do processo apoptótico nestas células (Figura 13A e B). A administração de TNBS induziu um aumento de cerca de 15 vezes no número de células epiteliais intestinais apoptóticas (Figura 13B). O tratamento com os glicosaminoglicanos, independente da origem (mamífero ou ascídia) ou do tipo (dermatam sulfato ou heparina), reduziu o número células epiteliais apoptóticas em relação o observado no grupo controle (Figura 13B). Nenhuma diferença significativa foi observada no número de células apoptóticas da lâmina própria (Figura 13A).

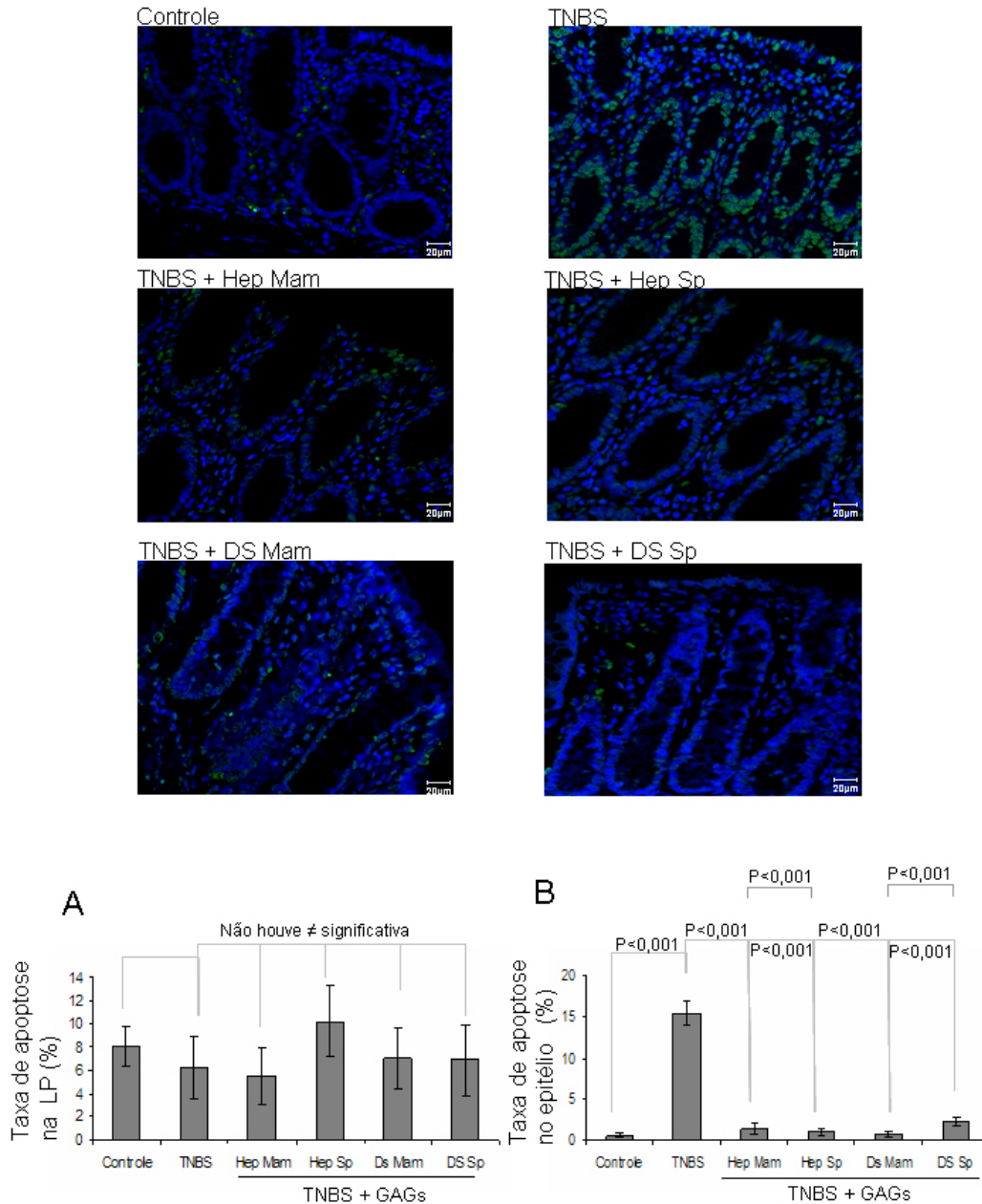


Figura 13: Estudo de Imunofluorescência das secções de tecido do cólon marcadas através do ensaio do TUNEL, mostra a presença de células apoptóticas na lâmina própria (LP)(A), no epitélio intestinal (B), nos grupos: rato controle saudável, cólon de ratos com colite sem tratamento (TNBS) e cólon de ratos com colite, mas que receberam GAGs (TNBS+GAGs), respectivamente. As diferenças foram analisadas usando o ANOVA one-way com o teste Dunnett's para comparações múltiplas. As diferenças significativas estão apresentadas no gráfico de barras (aumento original 400X).

5.5 Quantificação dos glicosaminoglicanos do cólon

Em um trabalho anterior, demonstramos que em áreas inflamadas do cólon de pacientes com doença de Crohn ativa, ocorre um aumento na quantidade total dos glicosaminoglicanos (Belmiro 2005). Para investigar se a administração de TNBS poderia produzir um efeito similar, os glicosaminoglicanos totais foram isolados do tecido do cólon inflamado, quantificados e submetidos a análises bioquímicas através de eletroforese em gel de agarose, antes e após a degradação com enzimas específicas. A administração de TNBS induziu um aumento de cerca de 2,2 vezes na quantidade de glicosaminoglicanos no tecido do cólon (Tabela 2). Este aumento foi devido a um aumento na quantidade relativa de heparam sulfato e condroitim sulfato, com uma diminuição paralela na quantidade de dermatam sulfato. O tratamento com glicosaminoglicanos, não apenas reduziu a quantidade total dos glicosaminoglicanos para aquelas observadas nos animais controle, mas também normalizou a quantidade de heparam sulfato, condroitim sulfato e dermatam sulfato (Tabela 2).

Tabela 2: Estudo comparativo da composição dos glicosaminoglicanos das amostras de tecido do cólon dos grupos: rato controle saudável, cólon de ratos com colite sem tratamento (TNBS) e cólon de ratos com colite, mas que receberam GAGs (TNBS+GAGs). As diferenças foram analisadas usando o ANOVA one-way com o teste Dunnett's para comparações múltiplas. As diferenças significativas estão apresentadas na tabela.

Grupos	Ác urônico µg/mg tecido	GAGs (%)		
		HS	DS	CS
Controle	1.21	26.5	45.4	28.1
TNBS	2.62*	33.4**	19.2***	47.4****
TNBS + Hep Mam	1.24	28.9	41.6	29.5
TNBS + Hep Sp	1.10	20.9	52.2	26.9
TNBS + DS Mam	1.19	26.6	42.8	30.6
TNBS + DS Sp	1.24	25.4	48.3	26.3

* $p < 0,001$ quando comparado com os grupos: controle, TNBS, TNBS+Hep Mam, TNBS+Hep Sp, TNBS+DS, TNBS+DS Sp.

** $p < 0,001$ quando comparado com os grupos: controle, TNBS, TNBS+Hep Mam, TNBS+Hep Sp, TNBS+DS, TNBS+DS Sp.

*** $p < 0,001$ quando comparado com os grupos: controle, TNBS, TNBS+Hep Mam, TNBS+Hep Sp, TNBS+DS, TNBS+DS Sp.

5.6 Efeitos do tratamento com glicosaminoglicanos na coagulação

A terapia com heparina pode levar ao desenvolvimento de eventos hemorrágicos (PAPA, 2000; PANES, 2000), devido a alterações na coagulação sanguínea e na quantidade de plaquetas. Portanto, decidimos investigar o efeito da administração subcutânea de glicosaminoglicanos nos animais tratados com TNBS. Após o período de tratamento com glicosaminoglicanos, o sangue dos animais foi coletado para a análise do tempo de coagulação, pela determinação do aPTT do plasma, e da quantidade de plaquetas (Figura 14). A administração subcutânea de glicosaminoglicanos por sete dias, independente do tipo ou da origem não produziu mudanças significativas no aPTT do plasma (Figura 14A) e na quantidade de plaquetas (Figura 14B).

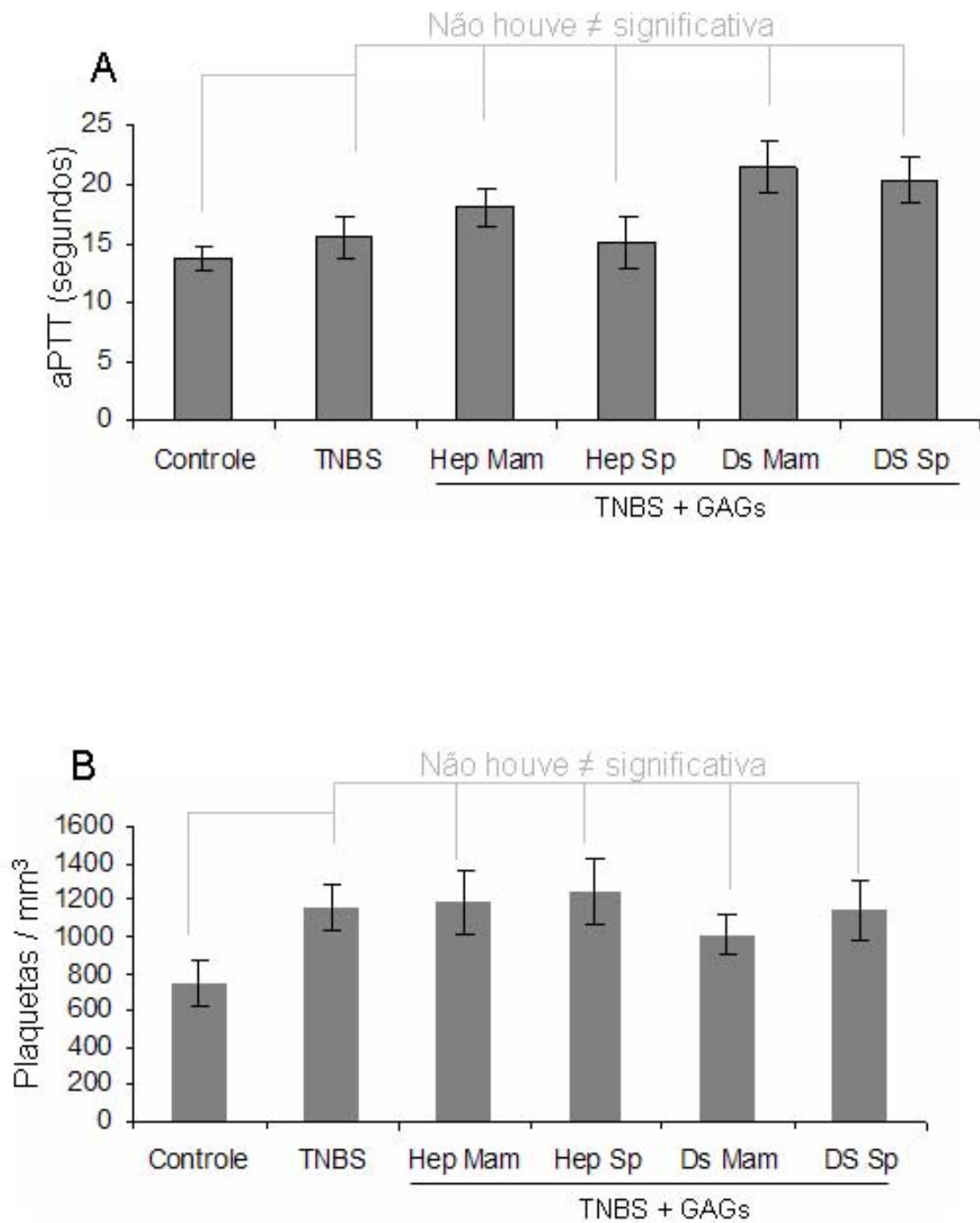


Figura 14: Amostras de plasma foram utilizadas para verificar o tempo de sangramento (A) através da técnica de aPTT e quantidade de plaquetas totais (B) do sangue do rato controle saudável, cólon de ratos com colite sem tratamento (TNBS) e cólon de ratos com colite, mas que receberam GAGs (TNBS+GAGs), respectivamente. As diferenças foram analisadas usando a ANOVA one-way com o teste Dunnett's para comparações múltiplas.

6 Discussão

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar o efeito da administração subcutânea da heparina de mamífero e de análogos da heparina obtidos da ascídia *Styela plicata* na evolução da inflamação do cólon de ratos induzida pela administração retal de TNBS.

Primeiramente, avaliamos a eficácia do modelo de colite com TNBS, onde observamos um quadro inflamatório característico ao encontrado em DII. A análise histológica apresentou escores inflamatórios elevados (macroscópico e microscópico) como reflexo de lesões inflamatórias irregulares, presença de úlceras e evidências de inflamação transmural no cólon distal, similares às lesões encontradas em DII. Interessantemente, pudemos observar que, após tratamento dos grupos TNBS com glicosaminoglicanos de mamífero houve, uma forte tendência remissiva nos escores macroscópico e microscópico, quando comparados ao grupo TNBS sem tratamento. Já o tratamento dos grupos TNBS com glicosaminoglicanos da ascídia *S. plicata* produziu um melhor efeito anti-inflamatório, com destaque para a heparina, que produziu a maior diminuição de ambos os escores.

Os efeitos antiinflamatórios dos glicosaminoglicanos também foram analisados através do infiltrado celular no tecido do cólon. Pode-se observar que o uso de glicosaminoglicanos de mamífero e da *S. plicata* tiveram efeito na redução do infiltrado celular para o tecido, quando comparados com o grupo TNBS, sendo a heparina da ascídia mais potente que a sua correspondente de mamífero.

Alguns aspectos clínicos foram analisados para verificar possíveis efeitos colaterais provocados pela administração subcutânea de heparina de mamífero e *S. plicata*, uma vez que a literatura descreve que pacientes que fazem o uso prolongado de heparina comercial podem apresentar quadro de hemorragia e

trombocitopenia (PAPA A, 2000; PANES, 2000; GAO, 2005). Observamos que após a administração subcutânea dos glicosaminoglicanos não foi encontrada nenhuma diferença significativa no aPTT, e na quantidade de plaquetas que pudesse comprometer a coagulação nos animais utilizados nos experimentos. Entretanto, dependendo da via de administração, a heparina de mamífero pode causar sangramento, o mesmo não observado para a heparina da ascídia. Em trabalhos prévios de nosso laboratório, foi mostrado em testes *in vivo*, que o tempo de sangramento observado após a administração intravenosa de doses equivalentes da heparina de mamífero e a da ascídia é diferente, sendo a heparina de mamífero muito mais hemorrágica que a sua correspondente de ascídia (GANDRA, 2000).

A avaliação de aspectos clínicos como diarreia e perda de peso, não indicou nenhuma diferença significativa entre os grupos TNBS tratados com os glicosaminoglicanos, independente de sua origem. Entretanto, observamos uma diminuição significativa de peso nos animais do grupo TNBS que não receberam os glicosaminoglicanos .

Em um trabalho prévio, observamos que áreas inflamadas do cólon de pacientes com doença de Crohn ativa, apresentam um aumento na quantidade total dos glicosaminoglicanos, e uma distribuição desorganizada destas moléculas em todo tecido inflamado (BELMIRO, 2005). No presente trabalho, os dados bioquímicos revelaram que o tratamento com TNBS também induz aumento dos glicosaminoglicanos totais, cerca de duas vezes mais que nos demais grupos. Este aumento está relacionado com uma maior expressão do condroitim sulfato, acompanhado por uma menor expressão do dermatam sulfato, sugerindo alterações do padrão de síntese dos glicosaminoglicanos durante o processo inflamatório induzido pelo TNBS.

Tiedemann (2005) observou mudanças na síntese de glicosaminoglicanos em culturas de fibroblastos incubadas com TGF- β . Este fator de crescimento modula o crescimento de fibroblastos e também aumenta a expressão de biglycam, um proteoglicano rico em cadeias de condroitim sulfato e dermatam sulfato. Este aumento é acompanhado por alterações nas cadeias dos glicosaminoglicanos, as quais passam a apresentar uma diminuição de cerca de 50% do conteúdo de ácido idurônico. Estes dados estão de acordo com nossos resultados, pois o tratamento dos animais com TNBS, sem a administração de glicosaminoglicanos, produziu um aumento no conteúdo de TGF- β que foi acompanhado pelo aumento do condroitim sulfato. Estes resultados são muito interessantes, uma vez que o condroitim sulfato está relacionado com a regulação de colóides e água e, devido a sua natureza hidrofílica ajuda a manter o turgor tecidual e a estrutura tridimensional da parede intestinal (HORI, 2001). Estas características são perdidas durante o processo inflamatório observado na DII, principalmente nas células epiteliais. Isto poderia explicar o aumento da síntese de condroitim sulfato no grupo TNBS, numa tentativa de restabelecer a integridade estrutural do intestino.

Liliana (2005) relatou que o biglycam, somente quando liberado da matriz extracelular por ação de enzimas proteolíticas durante a inflamação ou secretados por macrófagos teria ação pró-inflamatória, pois estaria agindo sob os macrófagos através de receptores TLR4 e TLR2 e mediando a imunidade inata. Como consequência, ocorreria uma ativação das vias das MAPK-cinases p38, ERK1/2 e do NF-kappa B, o que levaria ao agravamento de todo o processo inflamatório. No nosso trabalho, nós também observamos um aumento do conteúdo de condroitim sulfato após o tratamento com o TNBS. Este fato talvez possa estar relacionado com um possível efeito pró-inflamatório deste glicosaminoglicano.

Os macrófagos são fundamentais para a formação da fase inicial de defesa do organismo, iniciando uma série de reações inflamatórias, a partir da liberação de várias citocinas e quimiocinas (UHLIN-HANSEN, 1993). Numa fase posterior da resposta imunológica, os linfócitos T irão produzir uma série de quimiocinas e citocinas que irão comandar todo processo inflamatório característico da DII (BAUMGART^a, 2007; BROWN, 2007). Portanto, decidimos avaliar o perfil do infiltrado celular no tecido do cólon dos grupos estudados, utilizando marcadores específicos para macrófagos e linfócitos T. Pudemos observar que o tratamento com os glicosaminoglicanos inibiu a ativação e o recrutamento de macrófagos e linfócitos T para o local da inflamação. Entretanto, os grupos que receberam heparina, independente de sua origem foram mais eficazes em inibir o recrutamento de macrófagos. Uma possível explicação seria a inibição de P-selectina e L-selectina do endotélio e do leucócito, respectivamente. Desta maneira, os glicosaminoglicanos na corrente sanguínea poderiam estar competindo pela P-selectina e a L-selectina com seus ligantes naturais, PSGL-1 e heparam sulfato (KAWASHIMA, 2002; BISHOP, 2007), atenuando a interação dos leucócitos com o endotélio e a transmigração para o tecido inflamado.

Uma outra possibilidade poderia ser a de que os glicosaminoglicanos estariam seqüestrando inúmeras quimiocinas que se ligam naturalmente a cadeias de heparam sulfato e dermatam sulfato da superfície do endotélio vascular e dos leucócitos (MARSHALL, 2003), atenuando a sinalização celular durante o processo inflamatório. Por exemplo, a citocina IL-8 e seu transporte através das camadas de células endoteliais (transcitose) é dependente de cadeias de heparam sulfato. O heparam sulfato é responsável pela apresentação da quimiocina a seu receptor nos leucócitos, levando a ativação das integrinas e a forte ligação às moléculas de

adesão ICAM1 (PARISH, 2006). Esta etapa é fundamental para a adesão dos leucócitos ao endotélio vascular e subsequente migração para o local da injúria.

Na DII, o TNF- α , produto dos macrófagos e linfócitos, está associado com danos teciduais, sendo o principal responsável pelo prolongamento da inflamação, agindo através da ativação das vias do NF-Kappa B e das MAPK-cinases em vários tipos celulares (SALAS, 2000; MONTELEONE, 2006). A neutralização do TNF- α com o uso de anticorpos específicos tem se mostrado eficaz no controle do quadro inflamatório (MARINI, 2003). Dessa forma, decidimos investigar se o tratamento com os glicosaminoglicanos poderia estar reduzindo os níveis desta citocina no cólon dos grupos TNBS. Surpreendentemente, o tratamento com os glicosaminoglicanos, independente de sua origem, reduziu significativamente os níveis do TNF- α nos grupos avaliados. Isso fortalece a hipótese de que os glicosaminoglicanos podem estar bloqueando a migração de leucócitos para o local da inflamação, uma vez que a redução dos níveis de TNF- α foi acompanhado pela diminuição da migração de macrófagos e linfócitos. Um outro possível mecanismo envolvido na redução dos níveis de TNF- α , poderia ser através da inibição de sua secreção pelas células, uma vez que dados da literatura citam que cadeias de heparam sulfato têm a habilidade de se ligarem a macrófagos e inibirem a secreção de TNF- α (PARISH, 2006). Uma outra possibilidade seria a interação direta dos glicosaminoglicanos com a citocina TNF- α , uma vez que cadeias dermatam sulfato presentes nos proteoglicanos biglycam e decorina são capazes de interagir com TNF- α e imobilizá-los em diferentes meios (TUFVESSON, 2002). Desta forma, a administração de dermatam sulfato poderia estar competindo com as cadeias do dermatam sulfato endógeno e deslocando o TNF- α de seus ligantes.

Uma outra citocina importante na modulação do processo inflamatório é o VEGF, uma potente citocina angiogênica capaz de aumentar a proliferação, permeabilidade e mobilidade das células endoteliais (KEVIL, 1998). Recentemente, foi mostrado que a angiogênese é um componente integral na patogenia da DII e que seus níveis aumentam no soro e no tecido de pacientes acometidos com esta doença (BOUSVAROS, 1999; DANESE, 2006; CARVALHO, 2007). A inibição da angiogênese atenua a inflamação e vice-versa (CHIDLOW, 2007; KOUTROUBAKIS, 2006). Dados da literatura também relatam que o VEGF, para se ligar ao endotélio vascular e exercer o seu papel na angiogênese, necessita de cadeias de heparan sulfato (BRANDNER, 2006). Desta forma, poderíamos supor que a heparina poderia seqüestrar o VEGF de seus ligantes, deslocando-os para locais distantes da injúria e impedindo que ele se ligue ao endotélio vascular e inicie a formação de novos vasos sanguíneos.

Uma outra citocina também muito estudada em DII é o TGF- β . O TGF- β tem participação importante no controle da proliferação celular do epitélio intestinal e da matriz, não somente em condições patológicas, mas também fisiológicas na prevenção da destruição da mucosa intestinal (MAREK, 2002). O TGF- β participa ainda do controle da resposta imunológica controlando a diferenciação de linfócitos T (Th1 e Th2), (LAROUX, 2001; WAN, 2007) e através da ativação da via de sinalização intracelular ERK1/2 (LEE, 2007). Na DII, o quadro fibrótico é uma das mais sérias complicações que acometem os pacientes. O aumento da expressão do TGF- β estimula a proliferação de células mesenquimais as quais contribuem para aumento da deposição de fibras de colágeno na matriz. Isso contribui para a formação de um quadro fibrótico levando a constrição intestinal (LAWRANCE, 2001, 2003; BAUMGART, 2007). Dessa forma, decidimos investigar se o tratamento com

os glicosaminoglicanos poderia diminuir a quantidade do TGF- β e, conseqüentemente, a deposição de colágeno na matriz dos tecidos do cólon dos grupos TNBS. Interessantemente, após o tratamento dos grupos TNBS com glicosaminoglicanos, independente de sua origem, houve uma diminuição do TGF- β . Pode parecer contraditório o fato de uma citocina que controla o crescimento, diferenciação e renovação celular do epitélio intestinal esteja diminuída nos grupos TNBS tratados com os glicosaminoglicanos, uma vez que o TGF- β poderia estar participando do processo de recuperação da integridade estrutural da mucosa intestinal. De fato, este questionamento tem fundamento, porém esta ação seria esperada durante a fase crítica do processo inflamatório. Uma vez o quadro inflamatório retroceda, esta citocina tenderia a chegar a níveis fisiológicos, conforme observado em nossos resultados, a fim de restabelecer a homeostase tecidual do intestino. Estes resultados estão de acordo com achados da literatura que indicam que em pacientes com DII ativa ocorre um aumento do TGF- β na mucosa intestinal, ao passo que em pacientes que apresentem a remissão da doença os níveis da citocina estariam normalizados (BABYATSKY, 1996).

Os resultados obtidos com o TGF- β estão de acordo com a deposição de fibras de colágeno na matriz da mucosa intestinal, onde foi observado que a diminuição do TGF- β é acompanhada pela diminuição da deposição de fibras de colágeno nos grupos TNBS tratados com os glicosaminoglicanos. Uma hipótese para a participação dos glicosaminoglicanos na redução dos níveis do TGF- β na mucosa intestinal poderia ser a atuação direta destes compostos no bloqueio da migração dos leucócitos, conforme visto anteriormente, o que acarretaria a remissão da inflamação. Outra possibilidade seria o bloqueio da ligação do TGF- β ao seu ligante, conforme já descrito por Chen (2006). Uma terceira hipótese seria o bloqueio

da sinalização intracelular para a síntese do TGF- β , uma vez que já foi visto em um modelo de DII, que o tratamento da colite com bloqueadores de NF-Kappa B, reduz os níveis de TGF- β , assim como o quadro de fibrose (FICHTNER-FEIG, 2005).

Nos últimos anos uma série de pesquisas com inibidores da ativação do NF-Kappa B tem revelado resultados positivos no tratamento de DII em modelos experimentais. Porém, estes inibidores possuem ações sistêmicas e não estariam agindo apenas sob o NF-Kappa B, o que poderia causar uma série de efeitos colaterais (FICHTNER-FEIGL, 2005). Este fato tem estimulado a investigação de novos inibidores do NF-Kappa B. Dessa forma, decidimos verificar se nos grupos TNBS tratados com os glicosaminoglicanos poderiam estar havendo inibição do NF-Kappa B. O tratamento com os glicosaminoglicanos, principalmente a heparina de *S. plicata*, inibiu de forma significativa a ativação do NF-Kappa B, talvez como resultado da diminuição dos níveis de TNF- α , ou ainda, pelo simples bloqueio da migração de leucócitos para os sítios de inflamação, através da interação com as selectinas, o que também inibiria a produção do TNF- α e, conseqüentemente, a ativação do NF-Kappa B.

Continuando com a linha de raciocínio da sinalização intracelular, fomos investigar a participação da via de sinalização intracelular ERK1/2, uma vez que sua ativação é responsável pela regulação da proliferação, diferenciação e apoptose em muitas células (WAETZIG, 2003). Nossos resultados mostraram que o tratamento dos animais com o TNBS e com os glicosaminoglicanos inibiram a ativação da via de sinalização ERK1/2. É importante destacar que foi observado uma melhor resposta com a heparina e o dermatam sulfato da ascídia. Talvez esta diferença significativa se dê pelo fato destas moléculas possuírem padrões de sulfatação diferentes dos encontrados em mamíferos (SANTOS, 2007). Talvez os

glicosaminoglicanos estejam bloqueando a ligação do TGF- β com seus ligantes num possível mecanismo de competição (CHEN, 2006), seqüestrando estas moléculas e, conseqüentemente, impedindo a ativação da via ERK1/2. Seria também possível que os GAGs estivessem interagindo com outros fatores de crescimento que ativam a via ERK1/2, como por exemplo o FGF. O FGF é um fator de crescimento muito citado na literatura, o qual interage com moléculas de heparam sulfato e dermatam sulfato na superfície celular antes de se ligar ao seu ligante específico nas células (WU, 2003; TAYLOR, 2006).

A apoptose é um processo fundamental e essencial não somente no desenvolvimento e na homeostasia tecidual, mas também no estabelecimento de diversos processos patológicos (WINN, 2005). Dados da literatura citam que em pacientes com DII ativa há um aumento da atividade apoptótica nas células epiteliais e um aumento da resistência à apoptose nas células da lâmina própria (STURM 2004; SOUZA, 2005). Diante destas informações, fomos investigar se o tratamento com glicosaminoglicanos poderia estar modulando a atividade apoptótica das células do epitélio intestinal e da lâmina própria. Interessantemente, observamos que o tratamento com os glicosaminoglicanos reduziu a atividade apoptótica das células epiteliais da mucosa intestinal e das criptas. Entretanto, na lâmina própria nenhuma alteração da atividade apoptótica foi observada para todos os grupos. A diminuição da atividade apoptótica do epitélio intestinal pode ser conseqüência da diminuição dos níveis do NF-Kappa B e do TNF- α (SHISHODIA; 2002 PERKINS, 2007). Desta maneira, o tratamento com os glicosaminoglicanos foi extremamente positivo, controlando a atividade apoptótica do epitélio intestinal, o que poderia prevenir ou atenuar a entrada de agentes patogênicos através da mucosa intestinal.

Estes resultados são muito promissores e trazem novas expectativas para o tratamento de DII, uma vez que muitas pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de descobrir novas drogas capazes de inibir a inflamação. Neste contexto, até a heparina de mamífero, frequentemente utilizada para controlar eventos trombóticos associados com doenças inflamatórias crônicas, poderia ser utilizada por via subcutânea como um agente anti-inflamatório sem o risco de produzir sangramento. Este trabalho traz ainda a possibilidade do uso de uma nova heparina extraída da ascídia *S.plicata* como um potente agente anti-inflamatório, que apresenta também menor risco de contaminação com possíveis agentes patológicos por ser extraída de um grupo filogeneticamente distante dos mamíferos.

Finalmente, nós mostramos aqui que o tratamento com glicosaminoglicanos, independente de sua origem, apresentaram um potente efeito anti-inflamatório em um modelo de DII. Pudemos observar que em cerca de 60 % de todos os experimentos realizados, o tratamento com a heparina da ascídia *S.plicata* teve um efeito anti-inflamatório melhor, quando comparado com a heparina de mamífero. A principal hipótese para a ação antiinflamatória dos glicosaminoglicanos seria sua participação no bloqueio da migração de leucócitos, através da inibição das selectinas resultando na diminuição de citocinas e quimiocinas, assim como a redução da sinalização das vias intracelulares NF-Kappa B e a ERK1/2. O resultado final seria a remissão do quadro inflamatório, devolvendo o equilíbrio homeostática celular para o tecido local.

7 Conclusões

Com bases em nossos resultados pudemos concluir que os glicosaminoglicanos obtidos de mamífero e ascídia tiveram um potente efeito anti-inflamatório em modelo de doença inflamatória intestinal induzida com TNB, em rato, com total remissão de diversos mediadores inflamatórios, extracelulares e intracelulares, a níveis fisiológicos. Porém, chamamos a atenção para os resultados obtidos com os glicosaminoglicanos da ascídia *Styela plicata*, que foram 60% mais eficientes que os de mamífero.

Outro aspecto surpreendente observado em nossos resultados foi que o tratamento dos animais com dose subcutânea de ambos glicosaminoglicanos de mamífero ou da *Styela plicata*, não demonstraram ter o principal efeito colateral descrito pela literatura, o comprometimento da cascata da coagulação.

Pudemos observar também um padrão diferente na síntese de glicosaminoglicanos nos animais que tiveram a colite induzida e não receberam tratamento com glicosaminoglicanos, enquanto que os animais que receberam tratamento com glicosaminoglicanos apresentam um padrão de síntese semelhantes ao grupo controle.

8 Referências

ANDOH, A.; TSUJIKAWA, T.; HATA, K.; ARAKI, Y.; KITO, K.; SASAKI, M.; YOSHIDA, T.; FUJIYAMA, Y. (2005). Elevated circulating platelet-derived microparticles in patients with active inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 100: 2042-2048.

ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. (1991). *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia: WB Saunders Company, cap. 2: 14-31.

BAUMGART^a, D. C.; CARDING, S. R. (2007). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Gastroenterology* 1. 369: 1627-1640. Series.

BAUMGART^b, D. C.; SANDBORN, W. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Gastroenterology* 2. 369: 1641-1657. Series.

BLOOM, S.; KIILLERICH, S.; LASSEN, M. R.; FORBESS, A.; LEIPER, K.; LANGHOLZ, E.; IRVINE, E. J.; O`MORAIN, C.; LOWSONSS, D.; ORM, S. (2004). Low molecular weight heparin (tizaparin) vs. placebo in the treatment of mild to moderately active ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 19: 871-878.

BEINKE SÖREN.; LEY, S. C. (2004). Functions of NFκB1 and NFκB2 in immune cell biology. *Biochem J.* 382: 393-409. REVIEW.

BEDDY, D.; WATSON, W. R.; FITZPATRICK, J. M.; O`CONNELL, P. R. (2004). BITTER, T.; MUIR, H. M. (1962). A modified uronic acid carbasole reaction. *Anal Biochem.* 4: 330-334.

BELMIRO, C. L. R.; SOUZA, H. S. P.; ELIA, C. C. S.; CASTELO-BRANCO, M. T. L.; SILVA, F. R.; MACHADO, R. L.; PAVÃO, M. S. G. (2005). Biochemical and immunohistochemical analysis of glycosaminoglycans in inflamed and non-inflamed intestinal mucosa of patients with Crohn`s disease. *Int. J. Colorectal Dis.* 20: 295-304.

BERSCHNEIDER, H. M.; POWEL, D. W. (1992). Fibroblasts modulate intestinal secretory responses to inflammatory mediators. *J. Clin. Invest.* 89:484-489.

BINION, D. G.; WEST, G. A.; VOLK, E. E.; DRAZBA, J. A.; ZIATS, N. P.; PETRAS, R. E.; FIOCCHI, C. (1998). Acquired increase in leucocyte binding by intestinal microvascular endothelium in inflammatory bowel disease. *Lancet.* 352 (9142): 1742-6.

BISHOP, J. R.; SCHUKSZ, ESKO, J. D. (2007). Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature.* 446: 1030-1037.

BRAND, S.; OLSZAK, T.; BEIGEL, F.; DIEBOLD, J.; OTTE, J. M.; EICHHORST, S. T.; GÖKE, B.; DAMBACHER, J. (2006). Cell differentiation dependent expressed CCR6 mediates ERK-1/2,

SAPK/JNK, and Akt signaling resulting in proliferation and migration of colorectal cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 97(4): 709-723.

BOUSVAROS, A.; LEICHTNER, A.; ZURAKOWSKI, D.; KWON, J.; LAW, T.; KEOUGH, K.; FISHMAN, S. (1999). Elevated serum vascular endothelial growth factor in children and young adults with Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 44: 424-430.

BROWN, S. J.; MAYER, L. (2007). The immune response in inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology.* 102: 2058-2069.

BUSSEROLLES, J.; PAYÁ, M.; D'AURIA, M. V.; GOMEZ-PALOMA, L.; ALCARAZ, M. J. (2005). Protection against 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colonic inflammation in mice by the marine products bolinaquinone and petrosaspongiolide M. *Biochem Pharmacol.* 69:1433-1440.

BU, P.; KESHAVARZIAN, A.; STONE, D. D.; LIU, J.; LE, P. T.; FISHER, S.; QIAO, L. (2001). Apoptosis: one of the mechanisms that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system. *J. Immunol.* 166: 6399-63403.

CARMELIET, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9: 653-660.

CARVALHO, J. F.; BLANK, M.; SHOENFELD, Y. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in Autoimmune Disease. *Journal of Clinical Immunology.* 27: 246-256.

CAVALCANTE, M. C.; ALLODI, S.; VALENTE, A. P.; STRAUS, A. H.; TAKAHASHI, H. K.; MOURAO, P. A. (2000). Occurrence of heparin in the invertebrate *Styela plicata* (Tunicata) is restricted to cell layers facing the outside environment. An ancient role in defense? *J. Biol. Chem.* 275: 36189-86.

CHEN, C. L. (2006). Cellular heparan sulfate negatively modulates transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) responsiveness in epithelial cells. *J. BIOL. Chem.* 281: 11506-11514.

CHAMBARD, J. C.; LEFLOCH, R.; POUYSSÉGUR, J.; LENORMAND P. (2006). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et Biophysica Acta.* Xx: xx-xx. REVIEW.

COMPER, W. D.; LAURENT, T. C. (1978). Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol. Rev.* 58: 255-315.

COMPER, W. D.; ZAMPARO, O. (1990). Hydrodynamic properties of connective tissue polysaccharides. *Biochem. J.* 269: 561-564.

CREAMER, D.; ALLEN, M. H.; SOUSA, A.; POSTON, R.; BARKER, J. N. (1997). Localization of endothelial proliferation and microvascular expansion in active plaque psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 136: 859-865.

CRIPPS, J. G.; CRESPO, F. A.; ROMANOVSKIS, P.; SPATOLA, A. F.; FERNÁNDEZ-BOTRÁNS, R. (2005). Modulation of acute inflammation by targeting glycosaminoglycans-citokina interactions. *International Immunopharmacology*. 5: 1622-1632.

DEMIR, M.; IQBA, I. O.; DIETRICH, C. P.; Hoppensteadt, D. A.; Ahmad, S.; Daud, A. N. (2001). Anticoagulant and antiprotease effects of a novel eparinlike compound from shrimp (*Penaeus brasiliensis*) and its neutralization by heparinase I. *Clin Appl Thromb Hemost*. 7: 44-52.

DIETRICH, C. P.; DIETICH, S. M. C. (1976). Eletrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem*. 70: 645-647.

DIETRICH, C. P.; PAIVA, J. F.; CASTRO, R. A.; CHAVANTE, S. F. JESKE, W.; FARED, J. (1999). Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. *Biochim Biophys Acta*. 1428: 273-283.

DIETRICH, C. P.; DE PAIVA, J. F.; MORAES, C. T.; TAKAHASHI, H. K.; PORCIONATTO, M. A.; NADER, H. B. (1985). Isolation and characterization of a heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliensis*. *Biochim Biophys Acta*. 843: 1-7.

DI SABATINO, A.; CICCOCIOPPO, R.; CINQUE, B.; MILLIMAGGI, D.; MORERA, R.; RICEVUTI, L.; CIFONE, M. G.; CORAZZA, G. R. (2004). Defective mucosal T cell death is sustainably reverted by infliximab in a caspase dependent pathway in Crohn's disease. *Gut*. 53: 70-77.

DOLBER, P. C. ; SPACH, M. S. (1987). Picrossirius red staining of cardiac muscle following phosphomolybic acid treatment. *Stain Technol*. 62 : 23-62.

DOLBER, P. C. ; SPACH, M. S. (1993). Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. *J. Histochem Cytochem*. 41 : 465-469.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med*. 9: 669-676.

FICHTNER-FEIGL, S.; FUSS, I. J.; PREISS, J. C.; STROBER, W.; KITANI, A. (2005). Treatment of murine Th1- and Th2- mediated inflammatory bowel disease with NF- κ B decoy oligonucleotides. *The Journal of Clinical Investigation*. 15: 3057-3071.

FIOCCHI, C. (1997). Intestinal inflammation: a complex interplay of immune –non-immune cell interactions. *Am. J. Physiol*. 273: G769-G775.

FOLWACZNY, C.; WIEBECKE, B.; LOESCHKE, K. (1999). Unfractionated heparin in the therapy of patients with highly active inflammatory bowel disease. *The American Journal of Gastroenterology*. 94: 1551-1554.

GAO, Y.; NA LI.; FEI, R.; CHEN, Z.; ZHENG, C.; ZENG, X. (2005). P-selectin-mediated acute inflammation can be blocked by chemically modified heparin, RO-Heparin. *Molecules and Cells*. 19: 350-355.

GAULDIE, J.; JORDANA, M.; COX, G.; OHTOSHI, T.; DOLOVICH, J.; DENBURG, J. (1992). Fibroblasts and other structural cells in airway inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis*. 145: S14-S17.

GRIGA,T.; WERNER, S.; Köller, M.; MAY,B. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in Crohn's disease: increased production by peripheral blood mononuclear cells and decreased VEGF165 labeling of peripheral CD14+ monocytes.*Dig Dis Sci*. 44 (6):1196-201.

GORDON, J. N.; DI SABATINO, A.; MACDONALD, T. T. (2005). The pathophysiologic rationale for biological therapies in inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol*. 21: 431-437.

GANDRA, M.; CAVALCANTE, M.; PAVAO, M. (2000). Anticoagulant sulfated lycosaminoglycans in the tissues of the primitive chordate *Styela plicata* (Tunicata). *Glycobiology*. 10:1333-40.

Habuchi, O.; Sugiura, K.; Kawai, N. (1977).Glucose branches in chondroitin sulfates from squid cartilage. *J. Biol. Chem*. 252 (13): 4570-6.

HASSELL, J. R.; KIMURA, J. H.; HASCALL, V. C. (1986). Proteoglycan core protein families. *Ann. Rev. Biochem*. 55: 539-567.

HALDEN, Y.; REK, A.; ATZENHOFER, W.; SZILAK, L.; WABNING, A.; KUNGEL, A. J. (2004). Inteleukin-8 binds to syndecan-2 on human endothelial cells. *Biochem. J*. 377: 533-538.

HAHM, K. B.; IM, Y. H.; PARKS, T. W.; PARK, S. H.; MARKOWITZ, S.; JUNG, H, Y.; GREEN, J.; KIM, S. J. (2001). Loss of transforming growth factor beta signaling in the intestine contributes to tissue injury in Inflammatory Bowel disease. *Gut*. 49: 190-198.

HILDEBRAND, A.; ROMARÍS, M.; RASMUSSEN, L. R.; HEINEGARD, D.; TWARDZIK, D. R.; BORDERS, W. A.; RUOSLAHTI, E. (1994). Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor β . *Biochem. J*. 302: 527-534.

HOVINGH, P.; LINKER, A. (1982). An unusual heparan sulfate isolated from lobsters (*Homarus americanus*). *J Biol Chem*. 257: 9840-9844.

HORI, Y.; HOSHINO, J.; YAMAZAKI, C.; SEKIGUCHI, T.; MIYAUCHI, S.; HORIE,.K. (2001). Effects of chondroitin sulfate on colitis induced by Dextran Sulfate Sodium in rats. *J. Pharmacol*. 85: 155-160.

HOMMES, D.; VAN DEN BLINK, B.; PLASSE, T.; BARTELSMAN, J.; XU, C.; MACPHERSON, B.; TYTGAT, G.; PEPPELENBOSCH, M.; VAN DEVENTER, S. (2002). Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 122: 7-14.

HOLLENBACH, E.; VIETH, M.; ROESSNER, A.; NEUMANN, M.; MALFERTHEINER, P.; NAUMANN, M. (2005). Inhibition of RICK/Nuclear Factor- κ B and p38 signaling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn Disease. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(15): 14981-14988.

HUANG, C.; JACOBSON, K.; SCHALLER, M. D. (2004). MAP kinases and cell migration. *Journal of Cell Science*. 177: 4619-4628. COMMENTARY.

INOHARA, N.; NUÑEZ, G. (2003). NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* 3 (5): 371-382.

JACKSON, J. R.; SEED, M. P.; KIRCHER, C. H.; WILLOUGHBY, D.A.; WINKLER, J. D. (1997). The co-dependency of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J.* 11: 457-465.

JANEWAY, C. A. Jr. (2001). How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect.* 3(13):1167-71. REVIEW.

JAVERZAT, S.; AUGUSTE, P.; BIKFALVI, A. The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol. Med.* 8: 483-489.

JEANLOZ, R. W. (1960). The nomenclature of mucopolysaccharides. *Arthritis Rheum.* 3: 233-237.

JI, S.; DU, H.; CHI, Y.; CUI, H.; CAO, J.; GENG, M.; GUAN, H. (2004). Effects of dermatan sulfate derivatives on platelet surface P-selectin expression and protein C activity in blood of inflammatory bowel disease patients. *World J. Gastroenterol.* 10: 3485-3489.

KANAZAWA, S.; TSUNODA, T.; ONUMA, E.; MAJIMA, T.; KAGIYAMA, M.; KIKUCHI, K. (2001). VEGF, basic-FGF, and TGF- β in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am. J. Gastroenterol.* 96: 822-828.

KAWASHIMA^a, H.; ATARASHI, K.; HIROSE, M.; HIROSE, J.; YAMADA, S.; SUGAHARA, K.; MIYASAKA, M. (2002). Oversulfated chondroitin/dermatan sulfates containing GlcA β 1/IdoA α 1-3GalNAc(4,6-O-dissulfate) interact with L- and P- selectin and chemokines. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 12921-12930.

KAWASHIMA^b, H.; HIROSE, M.; HIROSE, J.; NAGAKUBO, D.; PLAAS, A. H. K.; MIYASAKA, M. (2000). Binding of a large chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycans, versican, to L-selectin, P-selectin, and CD44. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 35448-35456.

KEVIL, C. G.; PAYNE, D. K.; MIRE, E.; ALEXANDER, J. S. (1998). Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junction proteins. *J. Biol. Chem.* 273: 15099-15103.

KIM, I.; MOON SO.; KIM, S. H.; KIM, H. J.; KOH, Y. S.; KOH, G. Y. (2001). Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276: 7614-7620.

KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. (1991). Proteoglycans: Strutura e interactions. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 443-475.

KUSCHERT, G. S. V.; COULIN, F.; POWER, C. A.; PROUDFOOT, A. E. I.; HUBBARD, R. E.; HOOGEWERF, A. J.; WELLS, T. N. C. (1999). Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry.* 38: 12959-12968.

LAMARI, F. N.; KARAMANOS, N. K. (2006). Structure of Chondroitin Sulfate. Em Nicola Volpe, Chondroitin Sulfate: structure, role and pharmacological activity. 1^a. ed. Editora: Academic press, University of Modena & Reggio Emilia Modena, Italy, pg. 33-43.

LAWRANCE^a, I.C.; MAXWELL, L.; DOE, W. (2001) Altered response of intestinal mucosal fibroblasts to profibrogenic cytokines in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 7: 226-236.

LAWRANCE^b, I. C.; WU, F.; LEITE, A. Z. A.; WILLIS, J.; WEST, G. A.; FIOCCHI, C.; CHAKRAVARTI. (2003). A murine model of chronic inflammation-induced intestinal fibrosis down-regulated by antisense NF- κ B. *Gastroenterology.* 125: 1750-1761.

LEE, M. K.; PARDOUX, C.; HALL, M. C.; LEE, P. S.; WARBURTON, D.; QING, J.; SMITH, S. M.; DERYNCK, R. (2007). TGF- β activates ERK MAP kinase signaling through direct phosphorylation of ShcA. *The EMBO journal.* 26: 39557-3967.

LAROUX, F. S.; PAVLICK, K. P.; WOLF, R. E.; GRISHAM, M. B. (2001). Dysregulation of intestinal mucosal immunity: implications in inflammatory bowel disease. *News Physiol. Sci.* 16:272-277.

LINDAHL, U.; HÖÖK, M. (1978) Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Annu. Rev. Biochem.* 47: 385-417.

LIU, Y.; SHEPHERD, E. G.; NELIN, L. D. (2007). MAPK phosphatases - regulating the immune response. *Nature.* 7: 202-211. REVIEW.

MANGAN, P. R.; HARRINGTON, L. E.; O'QUINN, D. B.; HELMS, W. S.; BULLARD, D. C.; ELSON, C. O.; HATTON, R. D.; WAHI, S. M.; SCHOEB, T. R.; WEAVER, C. T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature.* 441: 166-168.

MADI, K.; ZALTMAN, C.; TAKIYA, C. M. (2001) Arquitetura da Mucosa Intestinal e sua Plasticidade. Em Helia. C. C. S. e Souza. H. S. P., Imunologia da Mucosa Intestinal; da bancada ao leito. 1^a ed. Editora: Ateneu, São Paulo, cap. 2: 11-37.

MACDONALD^a, T. T.; SPENCER, J. (1990). Gut immunology. Clin. Gastroenterol. 4: 291-313.

MACDONALD^b, T. T.; MONTELEONE, G. (2005). Immunity, inflammation, and allergy in the gut. Science. 307:1920-1925.

MALIK, A. B.; Lynen, J. L.; Cooper, J. A. (1989). Endothelial barrier function. J. Invest. Dermatol. 93: 62S-67S.

MARSHALL, L. I.; RAMDIN, L. S. P.; BROOKS, T.; DPHIL, P. C.; SHUTE, J. K. (2003). Plasminogen activator inhibitor-1 supports IL-8-mediated neutrophil transendothelial migration by inhibition of the constitutive shedding of endothelial IL-8/heparan sulfate/syndecan-1 complexes. The Journal of Immunology. 22: 2057-2065.

MAREK, A.; BRODZICKI, J.; LIBEREK, A.; KORZON M. (2002). TGF- β (transforming growth factor- β) in chronic inflammatory conditions – a new diagnostic and prognostic marker? Med. Sci. Monit. 8: 145-151.

MATTHEW, S.; GHOSH, S. (2004). Signaling to NF- κ B. Genes & Development. 18: 2195-2224. REVIEW.

PERKINS, N. D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. Nature. 8: 49-62.

MONTELEONE, G.; FINA, D.; CARUSO, R.; PALLONE, F. (2006). New mediadores of immunity and inflammation in inflammatory bowel disease. Currente Opinion in Gastroenterology. 22: 361-364.

MONTFRANS, C.; PEPPELENBOSCH, M.; VELDE, A. A.; DEVENTER, S. (2002). Inflammatory signal transduction in Crohn Disease and novel therapeutic approaches. Biochemical Pharmacology. 4: 789-795.

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

MULSOW, J. J.; WATSON, R. W.; FITZPATRICK, J. M.; O'CONNELL, P. R.; (2005). Transforming growth factor-beta promotes pro-fibrotic behavior by serosal fibroblasts via PKC and ERK1/2 mitogen activated protein kinase cell signaling. Ann. Surg. 242(6): 880-887.

OSCARSSON, L. G.; PEJLER, G.; LINDAHL, U.; (1989). Localisation of the antitrombin-binding sequence in the heparin chain. *J. Biol. Chem.* 264: 296-304.

OUYANG, Q.; TANDON, R.; GOH, K. L.; OOI, C. J.; OGATA, H.; FIOCCHI, C. (2005). The emergence of inflammatory bowel disease in the Asian Pacific region. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 21: 408-413.

PANÉS, J.; ESTEVE, M.; CABRÉ, E.; HINOJOSA, J.; ANDREU, M.; SANS, M.; FERNANDEZ-BAÑARES, F.; FEU, F.; GASSULL, M. A. (2000). Comparison of heparin and steroids in the treatment of moderate and severe ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 119: 903-908.

PAPA, A.; DANESE, S.; GASBARRINI, A.; GASBARRINI, G. (2000). Review article: potential therapeutic applications and mechanisms of action of heparin in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14: 1403-1409.

PARISH^a, C. R. (2005). Heparan sulfate and inflammation. *Nature Immunology.* 6: 861-862.

PARISH^b, C. R. (2006). The role of heparan sulphate in inflammation. *Nature Immunology.* 6: 633-643. Review.

PAVAO, M. S.; MOURAO, P. A.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D. M. (1995). A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycan from ascidian. Its structure and the effect of its unusual sulfation pattern on anticoagulant activity. *J. Biol. Chem.* 270: 31027-36.

PAVAO, M. S.; AIELLO, K. R.; WERNECK, C. C.; SILVA, L. C.; VALENTE, A. P.; MULLOY, B. (1998) Highly sulfated dermatan sulfates from Ascidiaceans. Structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. *J. BIOL. CHEM.* 273: 27848-57.

PAVAO, M. S. (2002). Structure and anticoagulant properties of sulfated glycosaminoglycans from primitive Chordates. *An. Acad. Bras. Cienc.* 74:105-12.

PREHM, P. (1983). Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells: mechanism of chain growth. *Biochem. J.* 211: 191-198.

PERKINS, N. D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nature.* 8: 49-62.

PODOLSKY, D. K. (2002). Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 347: 417-429.

POWELL, D. W.; MIFFLIN, R. C.; VALENTICH, J. D.; CROWE, S. E.; SAADA, J. I.; WEST, A. B. (1999). Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am. J. Physiol.* 277: 183-201.

POWERS, M. R.; BLUMENSTOCK, F. A.; COOPER, J. A. (1989). Role of albumin arginyl sites in albumin-induced reduction of endothelial hydraulic conductivity. *J. Cell Physiol.* 141: 558-564.

RAMAN, R.; SASISEKHARAN, V. (2005). Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions. *Chemistry & Biology*. 12: 267-277.

RODRIGUEZ, M.L.; JANN, B.; JANN, K. (1988). Structure and serological characteristics of the capsular K4 antigen of *Escherichia coli* O5:K4:H4, a fructose-containing polysaccharide with a chondroitin backbone. *Eur J Biochem*. 177(1):117-24.

ROSENZWEIG, L. J.; Kanwar, Y. S. (1982). Removal of sulfated (heparan sulphate) or non-sulfated (hialuronic acid) glycosaminoglycans results in increased permeability of glomerular basement membrane to ¹²⁵I-bovine serum albumin. *Lab. Invest*. 47: 177-184.

ROSS, M. H., ROMRELL, L. J. (1993) *Sistema Digestivo II: Esôfago, Estômago e Intestino. Histologia Texto e Atlas*. 2ª ed. São Paulo: Editora Panamericana, p. 431.

ROUX, P. P.; BLENIS, J (2004). ERK and p38 MAPK- activated protein kinase: a family of protein kinase with diverse biological functions. *Microbiology and Molecular Biology*. 68(2): 320-344. REVIEW.

RUTHRUFF, B. (2007). Clinical review of Crohn`s disease. *American Academy of Nurse Practitioners*. 19: 392-397.

SALAS, A.; SANS, M.; SORIANO, A.; REVERTER, J. C.; ANDERSON, D. C.; PIQUÉ, J. M.; PANÉS, J. (2000). Heparin attenuates TNF- α induced inflammatory response through a CD11b dependent mechanism. *Gut*. 47: 88-96.

SANTOS, J. C.; MESQUITA, J. M. F.; BELMIRO, C. L. R.; SILVEIRA, C. B. M; VISKOV, C.; MOURIER, P. A.; PAVÃO, M. S. (2007). Isolation and characterization of a heparin with low antithrombin activity from the body of *Styela plicata* (Chordata-Tunicata). Distinct effects on venous and arterial models of thrombosis. *Thromb. Res*. 121(2): 213-223.

SCHUPPAN, D. (2000). Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology*. 119: 234-242.

SCHREIBER, S.; NIKOLAUS, S.; HAMPE, J. (1998). Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut*. 42(4): 477-484.

Schürmann, G. M.; Bishop. A. E.; Facer, P.; Vecchio, M.; Lee, J. C.; Rampton, D. S.; POLAK, J. M. (1999). Increased expression of cell adhesion molecule P-selectin in active inflammatory bowel disease. *Gut*. 36: 411-418.

SHIVELY, J. E.; CONRAD, H. E. (1989). Formation of anhydrosugars in the chemical depolymerization of heparin. *Biochemistry*. 15: 3932-3942.

SHISHODIA, S.; AGGARWAL, B. B. (2002). Nuclear Factor- κ B Activation: A question of life or death. *Biochemistry and Molecular Biology*. 35: 28-40.

SOUZA, H. S. P. (2001). Imunorregulação e Mediadores Inflamatórios. Em Elia, C. C. S. e Souza, H. S. P., *Imunologia da Mucosa Intestinal; da bancada ao leito*. 1^a. ed. Editora: Ateneu, São Paulo, cap. 4: 95-105.

SOUZA, H. S.; TORTORI, C. J. A.; CASTELO-BRANCO, M. T. L.; CARVALHO, A. T. P.; DELGADO, C. F. S.; MARGALLO, V. S., DINES, I.; ELIA, C. C. S. (2005). Apoptosis in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease: evidence for altered expression of FasL and perforin cytotoxic pathways. *Int. J. Colorectal Dis.* 20: 277-286.

STORGARD, C. M.; STUPACK, D. G.; JONCZYK, A.; GOODMAN, S. L.; FOX, R. I.; CHERESH, D. A. (1999). Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an α 3 integrin antagonist. *J. Clin. Invest.* 103: 47-54.

STURM, A.; LEITE, A. Z.; DANESE, S.; KRIVACIC, K. A.; WEST, G. A.; MOHR, S.; JACOBBERGER, J. W.; FIOCCHI, C. (2004). Divergent cell cycle kinetics underlie the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*. 53: 1624-1631.

SUGAHARA, K.; MIKAMI, T.; UYAMA, T.; MIZUGUCHI, S.; NOMURA, K.; KITAGAWA, H. (2003). Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13(5): 612-20. Review.

SUNERGRÉN, K. P.; Fairman, R. P.; deBlois, G. G. (1987). Effects of protamine, heparanase and hyaluronidase on endothelial permeability and surface charge. *J. Appl. Physiol.* 63: 1987-1992.

TAYLOR K, R.; RUDISILL, J. A.; GALLO, R. L. (2005). Structural and sequence motifs in dermatan sulfate for promoting Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) and FGF-7 activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 280: 5300-5306.

TAYLOR, K. R.; GALLO, R. L. (2006). Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *The FASEB Journal*. 20: 9-21.

THEISS, A. L.; SIMMONS, J. G.; JOBIN, C.; LUND, P. K. (2005). Tumor Necrosis Factor (TNF) α increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *The Journal of Biological Chemistry*. 280: 36099-36109.

TIEDEMANN, K.; OLANDER, B.; EKLUND, E.; TODOROVA, L.; BENGTSSON, M.; MACCARANA, M.; THORSSON, G. W.; MALMSTRÖM, A. (2005). Regulation of the chondroitin/dermatan fine structure by transforming growth factor- β 1 through effects on polymer-modifying enzymes. *Glycobiology*. 15: 1277-1285.

- TOLLEFSEN, D.M.; MAJERUS, D. M.; BLANK, M. K. (1982). Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J. Biol. Chem.* 257(5): 2162-2169.
- TOLLEFSEN, D.M.; PESTKA, C. A.; MONAFO, W.J. (1983). Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate. *J. Biol. Chem.* 258(11): 6713-6.
- TORII, S.; NAKAYAMA, K.; YAMAMOTO, T.; NISHIDA, E. (2004). Regulatory mechanisms and function of ERK MAP Kinases. *J. Biochem.* 136(5): 557-51. MINIREVIEW.
- THUNBERG, L.; BACKSTROM, G.; LINDAHL, U. (1982). Further characterization of the antitransferrin-binding sequence in heparin. *Carbohydr. Res.* 100: 393-410.
- WAETZIG^a, G. H.; SEEGERT, D.; ROSENSTIEL, P.; NIKOLAUS, S.; SCHREIBER, S. (2002). p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *J. Immunol.* 168: 5342-5351.
- WAETZING^b, G. H.; SCHREIBER, S. (2003). Mitogen-activated protein kinase in chronic intestinal inflammation: targeting ancient pathways to treat modern disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18: 17-32.
- WANG, L.; BROWN, J. R.; VARKI, A.; ESKO, J. D. (2002). Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. *The Journal of Clinical Investigation.* 110: 127-136.
- WANG, L.; FUSTER, M.; SRIRAMARAO, P.; ESKO, J. D. (2005). Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nature immunology.* 6: 902-910.
- WINN, R. K.; HARLAN, M. (2005). The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 3: 1815-1824. Review.
- WU, Z. L.; ZHANG, L.; YABE, T.; KUBERAN, B.; BEELER, D. L.; LOVE, A.; ROSENBERG, R. D. (2003). The involvement of heparan sulfate (HS) in FGF1/HS/FGFR1 signaling complex. *The Journal of Biological Chemistry.* 278: 17121-17129.
- VARKI, A.; CUMMINGS, R.; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART, G.; MARTH, J. (1999). Proteoglycans and glycosaminoglycans. *Em Essentials of Glycobiology.* 1^a. ed. Editora: CSHL PRESS, São Paulo, cap. 11: 153-156.
- VELDHOEN, M.; STOCKINGER, B. (2006). TGFbeta1, a "jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends Immunol.* 27: 358-361.

VELDHOEN, M.; HOCKING R. J.; ATKINS, C. J.; LOCKSLEY, R. M.; STOCKINGER, B. (2007). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 24: 179-189.

VIEIRA, R. P.; MULLOY, B.; MOURÃO, P. A. (1991). Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo-beta-D-glucuronosyl residues. *J. Biol. Chem.* 266(21):13530-6.

VIEIRA, R. P.; MOURÃO, P. A. (1988). Occurrence of a unique fucose-branched chondroitin sulfate in the body wall of a sea cucumber. *J. Biol. Chem.* 263(34):18176-83.

XIA BING.; HAN, H.; ZHANG, K.; LI, J.; GUO, G.; GONG, L.; ZENG, X.; LIU, J. (2004). Effect of low molecular weight heparin on platelet surface P-selectin expression and serum interleukin-8 production in rats with trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *World J. Gastroenterol.* 10: 729-732.

9 Anexo

Artigo em fase final de revisão:

UNFRACTIONATED HEPARIN AND NEW HEPARIN ANALOGS FROM
ASCIDIANS (CHORDATE-TUNICATE) AMELIORATES COLITIS IN RATS.

Celso L. R. Belmiro, Morgana T. L. Castelo-Branco, Leandra M. C. Melim, Celeste
Elia, Kalil Madiç, Mauro S.G. Pavão, Heitor S. P. de Souza

Journal of Biological Chemistry

UNFRACTIONATED HEPARIN AND NEW HEPARIN ANALOGUES FROM ASCIDIANS (CHORDATE-TUNICATE) AMELIORATES COLITIS IN RATS*.

Celso L. R. Belmiro¹, Morgana T. L. Castelo-Branco², Leandra M. C. Melim¹, Alberto Schanaider³, Celeste Elia⁴, Kalil Madi⁴, Mauro S.G. Pavão¹, Heitor S. P. de Souza⁴

¹Laboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), and Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratório de Imunologia Celular, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

³Departamento de Cirurgia Experimental, HUCFF, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Departamento de Clínica Médica, HUCFF, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

Running head: Effect of new heparin analogues on colitis

Address correspondence to: Heitor S. P. de Souza

Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa (sub-solo), Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ, Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco 255, Ilha do Fundão, 21941-913, Rio de Janeiro, RJ, Brazil,

Email: hsouza@hucff.ufrj.br Telephone: +55-21-2562266

The anti-inflammatory effect of mammalian heparin analogues, named dermatan sulfate and heparin, isolated from the ascidian *Styela plicata* was accessed in a TNBS-induced colitis model in rats. Sub-cutaneous administration of the invertebrate compounds during a 7-day period, drastically reduced inflammation as observed by the normalization of the macroscopic and histological characteristics of the colon. At the molecular level a decrease in the production of TNF-alpha, TGF-beta and VEGF was observed, as well as a reduction of NF-kappa-B and MAPK-kinase activation. At the cellular level, the heparin analogues attenuated lymphocyte and macrophage recruitment and epithelial cell apoptosis. A drastic reduction in collagen-mediated fibrosis was also observed. No hemorrhagic events were observed after glycan treatment. These results strongly indicate the potential therapeutic use of these compounds for the treatment of colonic inflammation with a lower risk of hemorrhage when compared with mammalian heparin.

Inflammatory bowel diseases (IBD) comprise basically Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis and are characterized by chronic inflammation of the gastrointestinal tract. The etiology of IBD is complex and multifactorial, involving genetic predisposition and environmental triggers, as well as microbial and immune factors (1). In CD, the chronic inflammatory process is a consequence of an imbalance in the production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines, which results in a T helper cell type 1 (Th1) phenotype (2,3).

Th1-type response is characterized by the production of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-12, IL-18, interferon (IFN)- γ , among other proinflammatory cytokines, and also involves the production of growth factors such as transforming growth factor (TGF)- β , and vascular endothelial growth factor (VEGF) (4-6). In this context, the nuclear transcription factor kappaB (NF-kappaB) was identified as a key regulator of the expression of proinflammatory genes, determining the course of mucosal inflammation in IBD (7). The increased secretion of proinflammatory cytokines in IBD intestinal mucosa is accompanied by the over expression of adhesion molecules, including the selectins (8, 9).

Heparin is a sulfated glycosaminoglycan (GAG) largely utilized in the clinical practice for anticoagulation and prevention and treatment of vascular thromboembolism (10,11). Apart from its well-established anticoagulant and antithrombotic effects, heparin has anti-inflammatory properties such as inhibition of leukocyte adhesion and migration (12), and modulation of cytokine production (13). Based on these activities, and the suggested efficacy observed in several open clinical studies (14-16), heparin has been proposed as an alternative for the treatment of IBD. However, heparin therapy may cause hemorrhage and other adverse side effects (17).

Our laboratory has isolated and characterized several heparin analogues from marine invertebrate (18-23). The study of the anticoagulant properties of the marine invertebrate glycans indicated that although they are capable of inhibiting venous and arterial thrombosis, they are less anticoagulant and have

no bleeding effect after intravenous administration to experimental animals. Therefore, in the present work we investigate the anti-inflammatory effect of heparin analogues obtained from the ascidian *Styela plicata* in a rat model of colon inflammation.

Experimental Procedures

Animals

Male Wistar rats (each weighting between 250 and 300g) obtained from local supplier were maintained on a 12-h/12-h light and dark cycle in a temperature-controlled room (24°C). Animals were housed in a rack-mounted, wire cages with 3 animals per cage. Standard laboratory pelleted formula and tap water were provided *ad libitum*. The care and use of animals, as well as procedures reported in this study were approved by the institutional care committee of the Federal University of Rio de Janeiro and are in accordance with the guidelines of the International Care and Use Committee of the National Institutes of Health, and Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (24).

Induction of colitis

On day (d) 0, rats were anesthetized with subcutaneously with ketamine (35mg/kg) and xylazine (5mg/kg), and colitis was induced by intracolonic instillation of 0.8ml of a solution containing 20mg of 2,4,6-TNBS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in 17.5% ethanol (Merck, Darmstadt, Germany) using a rubber cannula (8cm long) inserted through the rectum. Thereafter, animals were allowed to access to standard chow and water *ad libitum*. Clinical manifestations such as diarrhea, bleeding and weight loss were observed during this period.

Experimental design

After an initial acclimation period of 1 week, animals were assigned randomly to one of five groups of 10 animals each, and followed during 1 week. The colitis group (TNBS) was submitted to colitis-induction but did not receive any treatment and animals were sacrificed on experimental d 7. There were 4 GAG-treated groups: mammalian Hep (mam Hep), mammalian DS (mam DS), *S.plicata* Hep and *S.plicata* DS. These groups were submitted to colitis-induction followed by treatment with the indicated GAG (4 or 8 mg/Kg per day) by subcutaneous route during 7 days. Normal rats not submitted to any intervention constituted the control group, being sacrificed after the acclimation period.

For the surgical procedure, animals were anesthetized as described in previous paragraph

and submitted to a mild-laparotomy under sterile technique. The distal colon was removed, opened longitudinally and rinsed with sterile saline. The colon was scored. After scoring, three tissue samples were excised from the colon for histological assessment. A quick death procedure by cervical dislocation was uniformly performed in all animals.

Histological inflammatory scores of the colon

Specimens were fixed in 40g/l formaldehyde saline, embedded in paraffin, cut into 5 µm sections, stained with hematoxylin-eosin stain, and examined microscopically by two independent observers. The following histological parameters were studied: ulceration, hyperplasia and inflammatory infiltrate. For both inflammatory infiltrate and hyperplasia, grading was considered: 3, severe; 2, moderate; 1, mild; 0, absent. For ulcers, grading was: 4, diffuse glandular disruption or extensive deep ulceration; 3, glandular disruption or focal deep ulceration; 2, diffuse superficial ulceration; 1, focal superficial ulceration; and 0, absent (25).

Immunohistochemical analysis of the colon

Tissue samples were immediately embedded in Tissue-Tek O.C.T. compound (Miles Scientific Laboratories Ltd, Naperville, IL) and snap-frozen in isopentane in a liquid nitrogen bath. Samples were then stored at -80°C until processing, and cut into 6-µm section in a cryostat maintained at -20°C. Tissue sections were air-dried and fixed for 10 min in a 1:1 solution of chloroform-acetone. Immunologic assessment of the intestinal mucosa was made using indirect immunoperoxidase technique using the following antibodies: mouse monoclonal anti-rat ED1 (Serotec Ltd., Oxford, UK) to macrophages; mouse monoclonal anti-rat CD3 (PC3/188) (Santa Cruz Biotechnology Inc.) to lymphocytes; mouse monoclonal anti-rat p65 (F-6) (Santa Cruz Biotechnology Inc.) to NF-Kappa-B. Briefly, frozen sections were immersed in 3% hydrogen peroxide in methanol for 10 min to block endogenous peroxidase activity. After being rinsed in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5% Tween 20 for 10 min, tissue sections were incubated with nonimmune horse serum for 30 min and, subsequently, with the respective monoclonal antibody in a humidified chamber overnight, at room temperature. Two sections from each sample were incubated with either PBS alone or mouse monoclonal IgG1 (concentration-matched) (Dako A/S, Glostrup, Denmark) and served as negative controls. After being rinsed in

PBS for 10 min, all tissue sections were incubated for 30 min with a goat anti-mouse peroxidase conjugate (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA). Additional rinsing was followed by development with a solution containing hydrogen peroxide and diaminobenzidine, dehydrated and mounted in histological mounting medium.

Immunofluorescence and confocal microscopy

In a single indirect immunofluorescence study, the frozen sections were incubated at room temperature with 2.5% BSA + 2.0% fat less milk + 8.0% FCS blocking buffer under shaking for 30 min. The sections were then incubated with appropriately diluted primary antibodies in PBS solution + 1.0% FCS for one hour in wet atmosphere at 37°C. The primary antibody used was the monoclonal mouse anti-rat P-ERK1/2 (1:50) (Santa Cruz, Biotechnology, INC.). After rinsing three times in PBS for 5 min each, tissue sections were incubated for 1 h with a FITC-conjugated Fab fraction of goat anti-mouse IgG antibody (Dako A/S, Glostrup, Denmark). Slides were counter-stained with Evan's blue diluted 0.01% in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated at 37°C for 15 min, mounted in an anti-fading medium containing buffered glycerol and *p*-phenylenediamine (Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA), and then observed with a Zeiss LSM 510 confocal laser scanning microscope. At least four representative images from each slide were captured. Two sections from each sample were incubated with either PBS alone or FITC-conjugated anti-mouse IgG antibody and served as negative controls.

Assessment of collagen deposition in the colon

Specimens were fixed in 40g/l formaldehyde saline, embedded in paraffin, and cut into 5- μ m sections. The phosphomolibidic acid-picro-sirius red dye was used to stain collagen fibers in tissue (26,27). At least 15 different areas per tissue section were analyzed under light microscopy.

Detection of apoptosis using TUNEL assay

Paraffin-embedded colon samples were de-waxed in xylene twice for 5 min each time and then rehydrated in graded ethanol (100-70%) three times, followed by rehydration in PBS for 30 min. Apoptotic cells were detected by the terminal deoxynucleotidyltransferase (*TdT*)-mediated dUDP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay, using the in situ apoptosis detection kit ApopTag Fluorescein (Chemicon

International, Inc. Temecula, CA, USA), according to the instructions of the manufacturer. Sections were analyzed in a confocal microscope.

Quantitative assessment of colon sections

Quantitative analysis of tissue sections (under light microscopy) and captured immunofluorescence images (under confocal laser scanning microscope) was carried out using a computer-assisted image analyser (Image-Pro Plus Version 4.1 for Windows, Media Cybernetics, LP, Silver Spring, MD, USA). Any epithelial and lamina propria cells exhibiting identifiable reactivity distinct from background were regarded as positive.

In the immunoperoxidase and immunofluorescence studies, the densities of the different cell subsets were defined by the number of immunoreactive cells in the lamina propria per millimetre squared (counted in at least 10 different areas). In the epithelium, the density of apoptotic cells was defined as the percentage of immunoreactive cells within at least 500 epithelial cells in the crypts and in the surface epithelium of longitudinally sectioned colonic pits.

The density of collagen fibers was defined by the area positively stained for collagen in relation to total intestinal tissue per millimetre squared using an imaging analysis system. Two independent observers who were unaware of the experimental animals' data examined all tissue sections and captured images.

Organ culture and cytokine measurements

Colonic mucosal explants were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (Life Technologies, USA), 2mM L-glutamine (Sigma, USA, 50 μ M 2-mercaptoethanol (Sigma, USA, 10mM HEPES (Promega, USA), penicillin (100 KU/L) and streptomycin (100 mg/L) (Sigma, USA) for 24 hours at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. After incubation for 24 h, the supernatant was collected and stocked at -20°C. Samples were centrifuged and the supernatants used for measurement of the concentration of cytokines TNF- α , TGF- β and VEGF by a commercial sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method (R&D System, MN, USA). The total protein content of the biopsy specimens was estimated by the Lowry's method. In our data, biopsy specimens' wet weight was shown to correlate closely with protein content of tissue homogenates. The minimum detectable

concentration of rat TNF- α , TGF- β and VEGF was typically less than 5.0 ng/L.

Isolation and quantification of GAGs

The dried intestinal samples (~ 0.5 g) were individually suspended in 10 ml of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.5), containing 50 mg papain, 5 mM EDTA and 5 mM cysteine, and incubated at 60°C for 24 hours. The mixtures were centrifuged (2000g for 10 min at room temperature). Another 50 mg of papain in 10 ml of the same buffer, containing 5mM EDTA and 5mM cysteine, was added to the precipitate. The mixture was then incubated for another 24 hours. The clear supernatants from the two extractions were combined, and the GAGs precipitated with a solution of cetylpyridinium chloride (0.5% final concentration), followed by 2 vol. of 95% ethanol and maintained at 4°C for 24 h. The precipitate formed was collected by centrifugation (2000g for 10 min at room temperature), freeze-dried and dissolved in 2 ml of distilled water. The amount of GAGs in the renal samples was estimated by the content of hexuronic acid, using the carbazole reaction (28).

Agarose gel electrophoresis

The intact or enzyme-degraded GAGs from the different intestinal samples were analyzed by agarose gel electrophoresis, as described previously (22). Briefly, about 1.5 μ g (as uronic acid) of the glycans, and a mixture of standard GAGs, containing chondroitin sulfate, dermatan sulfate and heparan sulfate (1.5 μ g as uronic acid of each) were applied to a 0.5% agarose gel in 0.05 M 1,3-diaminopropane/acetate (pH 9.0), and run for 1 h at 110 mV. After electrophoresis the GAGs were fixed with aqueous 0.1% cetylmethylammonium bromide solution and stained with 0.1% toluidine blue in acetic acid/ethanol/water (0.1:5:5, v/v/v). The relative proportions of the GAGs were estimated by densitometry of the metachromatic bands on a Bio-Rad densitometer, following agarose gel electrophoresis.

The identity of GAGs was determined by agarose gel electrophoresis before and after incubation with specific GAG-lyases (Chondroitin AC-lyase, Chondroitin ABC-lyase) or deaminative cleavage with nitrous acid as described previously (22).

Ex-vivo anticoagulant action measured by aPTT (activated Partial Thromboplastin Time)

At experimental day 7, animals from the different groups were anaesthetized with an intramuscular injection of 100 mg/Kg of ketamine (Cristália, São Paulo, Brazil) and 16 mg/Kg of xylazine (Bayer AS, São Paulo, Brazil), supplemented as needed. The right carotid artery was isolated and cannulated with a 22-gauge catheter (Jelco, Johnson & Johnson Medical Inc., USA) for blood collection. Blood samples (~ 500 μ l) were collected into 2.8% sodium citrate (9:1, v/v) for analysis of aPTT (*Activated Partial Thromboplastin Time*). At least 5 animals were used per group. aPTT was carried out as following: rat plasma (100 μ l) was incubated with 100 μ l of aPTT reagent (Celite – Biolab) at 37°C. After 2 min of incubation 100 μ l of 0.25 M CaCl₂ were added to the mixtures and the clotting time recorded in a coagulometer (Amelung KC4A).

Platelet counts

Blood samples were carefully drawn on heparin from the portal vein during surgery just prior to colon removal. The platelet count in the whole blood was measured on an automatic hematology analyzer. Results are expressed as number of cells per cubic millimeter.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the statistical software SPSS for Windows (Version 10.1, SPSS Inc., 1989-1999, USA). Statistical differences among the experimental groups were evaluated with the one-way ANOVA test in which pair wise multiple comparisons were carried out using the Dunnett's T3 test. Correlations between inflammatory scores, the densities of positive cells measured by immunohistochemistry, and the cytokines levels were assessed using the Spearman rank correlation coefficient. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Histomorphological changes in the colonic tissue

We found that animals subjected to TNBS treatment developed colitis accompanied by a significant weight loss. Evident morphological changes were observed predominantly in the distal colon of the animals. Inflammatory lesions in the colon included mucosal edema, ulceration and evidence of transmural inflammation. Therapeutic approach consisted of subcutaneous administration of ascidian or mammalian heparin and dermatan sulfate (DS), initiated 2 h after TNBS treatment and continued for 7 days. A drastic attenuation

of the inflammatory lesions was observed macroscopically in the animals after subcutaneous administration of mammalian or ascidian glycosaminoglycans (GAGs) at the dose of 8mg/kg. No significant changes were observed at the dose of 4mg/kg (not shown).

Histological analysis of formalin-fixed HE-stained intestinal sections revealed an increase in the microscopic damage score in all TNBS-treated animals, when compared to the normal mucosa of control animals (Figure 1A and B). Administration of mammalian or ascidian GAGS (8mg/kg) significantly reduced the inflammatory scores in the TNBS-treated group. However, the scores obtained by ascidian heparin and DS were significantly ($p<0.001$) lower than those obtained by mammalian heparin and DS.

Cellular infiltration in the colonic tissue

TNBS colitis is characterized by a Th1-mediated immune response with intense infiltration of lymphocytes and macrophages (2,3,4,5). Therefore, we evaluated the infiltrating cell profile in inflamed colonic tissue. The number of macrophages and T-cells significantly increased in the colonic lamina propria of all TNBS-treated animals, when compared to that of the control group (Figure 2 and B). Subcutaneous administration of mammalian or ascidian GAGS reduced the number of both macrophages (Figure 2) and T-cells (Figure 3) in TNBS-treated animals. Heparin administration, regardless of its source, was more effective in reducing infiltrating cells, when compared to DS (Figure 2 and 3). However, ascidian heparin was more efficient in reducing macrophages than the mammalian counterpart (Figure 2). Mammalian or ascidian DS reduced macrophages and CD4⁺ T-cells at the same extent (Figure 2 and 3).

Cytokine production and intracellular signaling in the colonic tissue

In IBD, increasing TNF- α production is associated with immunologically mediated tissue damage (29), and induces the activation of the NF- κ B pathway in a variety cell types. Therefore, we investigated whether the administration of mammalian or ascidian GAG could reduce TNF- α production and NF- κ B activation in the inflamed colon.

TNBS-treatment induced a \sim 4-fold increase in the levels of TNF- α in the colonic tissue (Figure 4 A). The increase of the cytokine was accompanied by a clear increase in NF- κ B activation (Figure 5 A and B). Subcutaneous administration of GAGS, regardless of its

source, drastically reduced TNF- α production to values observed in the basal level ($p<0.001$) (Figure 4 A), and no significant different was observed on the effect of DS or heparin. Similarly, NF- κ B activation drastically reduced in inflamed colon after GAG administration (Figure 5 A and B). No significant difference was observed in the effect of mammalian or ascidian DS and heparin. However, ascidian heparin induced the highest reduction in NF- κ B activation.

TNF- α production is also regulated by MAPK-kinases and inhibitors of these enzymes can reduce TNF- α synthesis (30). Therefore, we evaluated the activity of the MAPK-kinase, ERK in the inflamed colonic tissue after GAG administration. TNBS treatment induced a \sim 10-fold increase of ERK-active cells in the colonic tissue (Figure 6 A and B). GAG administration, markedly reduced the number of ERK-active cells ($p<0.001$) (Figure 6 A and B). Mammalian GAGS reduced ERK-active cells in \sim 50%, whereas ascidian DS and heparin reduced the number of ERK-active cells in \sim 100%, reaching that of the basal level. No significant difference was observed on the effect of mammalian DS and heparin administration, as well as on that of ascidian DS and heparin.

TGF- β is a key cytokine during periods of active inflammation, modulating epithelial cell restitution and extracellular matrix remodeling after intestinal injury (31,32). In addition, TGF- β increase is associated with collagen deposition that may result in fibrosis (33,34). We investigated the effect of mammalian or ascidian GAG administration in TGF- β production and collagen deposition in the inflamed colon. TNBS induced a 4-fold increase in TGF- β production in the colon (Figure 4 B). The increase in TGF- β is correlated with increased collagen deposition in the lamina propria (Figure 7 A and B). Administration of mammalian or ascidian GAGS regardless of the origin (mammalian or ascidian) and type (DS or heparin) reduced TGF- β production and collagen deposition to the levels observed in control animals (Figures 4B and 7, A and B).

VEGF is an angiogenic cytokine, which modulates not only proliferation (35) but also the expression of cellular adhesion molecules in endothelial cells (36). In patients with IBD, VEGF is over-expressed both in the serum and in the intestinal mucosa (37). Recently, it has been shown that angiogenesis is an integral

component of IBD pathogenesis and that inhibition of angiogenesis attenuates inflammation and vice-versa (38). Therefore, we sought to determine whether GAG treatment would affect VEGF production in the inflamed colon. TNBS induced a 5.5-fold increase in VEGF production (Figure 4 C). The increase in VEGF correlated directly with active inflammation as denoted by the increased inflammatory parameters. Administration of mammalian or ascidian GAGs regardless of the origin (mammalian or ascidian) and type (DS or heparin) reduced VEGF production to levels observed in control animals (Figure 4C). VEGF reduction correlated with the attenuation of inflammation, as indicated by the inflammatory parameters.

Apoptosis in the colonic tissue

Chronic inflammation of the intestine leads to epithelial destruction due to the action of cytokines produced by inflammatory cells. Therefore, we investigated if the epithelial protection observed after GAG administration in TNBS-treated animals could be related to an attenuation of the apoptotic process. TNBS treatment induced a 15-fold increase in the number of apoptotic intestinal epithelial cells. Administration of mammalian or ascidian GAGs regardless of the origin (mammalian or ascidian) and type (DS or heparin) reduced the number of apoptotic epithelial cells to those observed in controls (Figure 8 A and B).

GAGs content in the colonic tissue

We have previously shown that in inflamed areas of the colon of patients with active Crohn's disease there is an increase in the total amount of GAGs and a disorganized distribution of these molecules throughout the inflamed tissue (39). To investigate whether TNBS administration would produce a similar effect, total GAGs were isolated from rat normal or inflamed colonic tissues, quantified and subjected to biochemical analysis by agarose gel electrophoresis before and after degradation with specific GAG-lyases. TNBS treatment induced a ~2.2-fold increase in the content of GAGs (Table 1). This increment was due to an increase in the relative amounts on heparan sulfate (HS) and chondroitin sulfate (CS) and a parallel decrease in the amount of DS. Therapeutic administration of GAGs not only reduced the amount of total intestinal GAGs to that observed in control animals, but normalized the amounts of HS, CS and DS.

Effect of GAG treatment on coagulation

Heparin therapy can lead to the development of hemorrhagic events (17) due to alterations in blood coagulation and platelet counts. Therefore, we investigated the effect of subcutaneous administration of GAGs in TNBS-treated animals. After GAG administration, blood was collected for time clotting analysis by determining the plasma aPTT and platelet count. Administration of GAGs for 7 days did not produce any significant changes in plasma aPTT or in platelet counts (Figure 9 A and B).

Discussion

Although great advances have been made in the field of etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases, currently approved therapies have limited efficacy and safety issues are still a matter of concern regarding the new agents. In fact, the two main anti-inflammatory drugs used to treat acute relapses of Crohn's disease continue to be 5-acetyl-salicylic acid and corticosteroids (reviewed in 40). Despite these drugs can ameliorate intestinal inflammation they have important side effects, what encourages the search for new anti-inflammatory agents. Here, we tested the therapeutic effect of heparin and heparin-analogues in an animal model of inflammatory bowel disease (IBD).

Similar to human Crohn's disease (CD), the resulting pathologic process of TNBS-induced colitis consisted of patchy inflammatory lesions and evidence of transmural inflammation in the distal colon. In regard to efficacy, both mammalian and marine invertebrate heparin and dermatan sulfate consistently reduced the intestinal inflammation after one week of treatment, lowering the macroscopic and histologic scores in the experimental model compared with colitic animals. In particular, we demonstrated that the treatment with GAGs reduces the accumulation of inflammatory cells in the colonic lamina propria, the rate of epithelial apoptosis, the amount of collagen deposition, and the local production of TNF- α , VEGF, and TGF- β .

In this study, colitic animals showed elevated percentages of T-cells and macrophages in the intestinal lamina propria, and the numbers were significantly reduced by heparin and heparin analogues. Therefore, colitis attenuation observed after GAGs could be probably attributed to the reduction in the number of inflammatory cells in the colon. Since the rate of apoptosis in the lamina propria remained relatively unchanged after treatment with GAGs,

it seems unlikely that apoptosis-induction would constitute a primary mechanism of action of GAGs in TNBS-induced colitis. Hence, we hypothesize that the lower number of cells infiltrating the lamina propria actually reflects the inhibition of cell migration into the intestine. In fact, it has been demonstrated that heparin and heparin analogues inhibit inflammation by blocking P-selectin-mediated leukocyte immigration (41). As a result, a reduction in the production of inflammatory mediators, including cytokines such as TNF- α , would be expected to occur.

TNF- α is a crucial player for the establishment of the inflammatory process of CD as suggested by the increased levels of the cytokine observed in the plasma and stools of patients with active disease (42,43). TNF- α induces activation of the NF-kappa-B and MAP-kinase signaling pathways, leading to an increase in the expression of endothelial adhesion molecules, and an augment in lymphocyte and macrophage recruitment. In addition, TNF- α stimulates the production of metalloproteinases and collagen by myofibroblasts and fibroblasts in the intestinal mucosa, contributing to matrix degradation and fibrosis (44). Clinical studies have shown that TNF- α blockage constitutes a beneficial therapy for refractory luminal and fistulizing Crohn's disease, and recently for refractory ulcerative colitis as well (45-48). Moreover, inhibitors of the NF-kappa-B and p38 MAP-kinase signaling pathways were shown to attenuate the inflammatory response in a murine model of CD (49).

In the present work, administration of GAGs dramatically reduced TNF- α as well as NF-kappa-B and MAP-kinase signaling pathways. In addition, a drastic reduction of epithelial cells apoptosis in TNBS-treated animals was also observed. These results corroborate literature data, indicating that TNF- α induces apoptosis of intestinal epithelial cells (50) and strongly suggest that these glycans target directly or indirectly important effectors involved in colon inflammation.

TGF- β is a multifunctional cytokine capable of regulating the proliferation, differentiation and function of immune and non-immune cells (51). In CD, this cytokine induces the proliferation of fibroblasts and miofibroblasts and an increase in the synthesis of matrix components such as collagen and GAGs (52,53) that have been shown to accumulate in

the colonic tissue of patients with active CD. Although TGF- β is regarded as an anti-inflammatory cytokine, its abundant expression in IBD tissue is incapable of down regulating the immune response (54), probably because TGF- β fails to suppress NF-kappa B activation in gut inflammation (55). Here, we showed that treatment of TNBS-induced colitis with GAGs significantly reduced collagen deposition, probably as a consequence of TGF- β reduction.

It is also interesting to notice that GAGs administration restored the quantity and composition of endogenous colonic GAGs in TNBS-treated animals, which may reflect normalization of the extracellular matrix. A possible explanation for this effect could be attributed to GAGs blockage of heparanase. Heparanase is an endoglycosidase that degrades heparan sulfate proteoglycans, major components of the extracellular matrix and cell surfaces (56). Taking together the upregulation of heparanase found in the colonic epithelium of IBD, and our previous observation of increased distribution of heparan sulfate within the inflamed colon of patients with CD (39), we speculate that anti-inflammatory effect of GAGs could also be mediated by their interaction with heparanase.

The expansion of the microvascular bed favors inflammation by allowing the influx of inflammatory cells, increase of nutrient supply and production of cytokines, chemokines and metalloproteinases by activated endothelium (57,43). Recent studies provided evidence that angiogenesis is involved in the pathogenesis of IBD. In fact, expression of the proangiogenic factor VEGF is augmented in intestinal mucosa of patients with active CD (38). In agreement with literature data, here we showed that exposure to TNBS resulted in a marked increase of VEGF production in the inflamed colon. Administration of GAGs reduced the growth factor levels to that of control animals, corroborating the idea that among the anti-inflammatory actions of heparins, an important role should be attributed to the interference with angiogenesis (58; 59).

Finally, interestingly, unfractionated mammalian heparin given subcutaneously produced a very effective anti-inflammatory effect in the model studied without causing any significant changes in the coagulation parameters and platelet counts. In addition, non-hemorrhagic heparin and DS obtained from the invertebrate *Styela plicata* inhibited colon

inflammation more efficiently than mammalian heparin, indicating that these compounds could be a potential alternative to heparin in the treatment of IBD.

References

1. Xavier, R. J., and Podolsky, D. K. (2007) *Nature* **448**, 427-434
2. Papadakis, K., and Targan, S. (2000) *Inflamm Bowel Dis* **6**, 303 – 313
3. Reinecker, H., Steffen, M., Witthoef, T., Pflueger, I., Schreiber, S., MacDermott, R., and Raedler, A. (1993) *Clin Exp Immunol* **94**, 174-181
4. Fiocchi, C. (1998) *Gastroenterology* **115**, 182-205
5. Podolsky, D. (2002) *N Engl J Med* **347**, 417-429
6. Macdonald, T. T., and Monteleone, G. (2005) *Science* **307**(5717), 1920-1925
7. Atreya, I., Atreya, R., and Neurath, M. F. (2008) *J Intern Med* **263**(6), 591-596
8. Schurmann, G. M., Bishop, A. E., Facer, P., Vecchio, M., Lee, J. C., Rampton, D. S., and Polak, J. M. (1995) *Gut* **36**(3), 411-418
9. Andoh, A., Tsujikawa, T., Hata, K., Araki, Y., Kitoh, K., Sasaki, M., Yoshida, T., and Fujiyama, Y. (2005) *Am J Gastroenterol* **100**(9), 2042-2048
10. Roden, L., Ananth, S., Campbell, P., Curenton, T., Ekborg, G., Manzella, S., Pillion, D., and Meezan, E. (1992) *Adv Exp Med Biol* **313**, 1-20
11. Hirsh, J., Warkentin, T. E., Shaughnessy, S. G., Anand, S. S., Halperin, J. L., Raschke, R., Granger, C., Ohman, E. M., and Dalen, J. E. (2001) *Chest* **119**(1 Suppl), 64S-94S
12. Papa, A., Danese, S., Gasbarrini, A., and Gasbarrini, G. (2000) *Aliment Pharmacol Ther* **14**(11), 1403-1409
13. Elsayed, E., and Becker, R. C. (2003) *J Thromb Thrombolysis* **15**(1), 11-18
14. Gaffney, P. R., Doyle, C. T., Gaffney, A., Hogan, J., Hayes, D. P., and Annis, P. (1995) *Am J Gastroenterol* **90**(2), 220-223
15. Folwaczny, C., Wiebecke, B., and Loeschke, K. (1999) *Am J Gastroenterol* **94**(6), 1551-1555
16. Ang, Y. S., Mahmud, N., White, B., Byrne, M., Kelly, A., Lawler, M., McDonald, G. S., Smith, O. P., and Keeling, P. W. (2000) *Aliment Pharmacol Ther* **14**(8), 1015-1022
17. Schulman, S., Beyth, R., Kearon, C., and Levine, M. (2008) *Chest* **133**, 257S-298S
18. Santos, J., Mesquita, J., Belmiro, C., da Silveira, C., Viskov, C., Mourier, P., and Pavao, M. (2007) *Thromb Res* **121**, 213-223
19. Cardilo-Reis L, C. M., Silveira CB and Pavao MS. (2006) *Braz J Med Biol Res* **39**, 1409-1415
20. Pavao, M. (2002) *An Acad Bras Cienc* **74**, 105-112
21. Vicente, C., Zancan, P., Peixoto, L., Alves-Sa, R., Araujo, F., Mourao, P., and MS, P. (2001) *Thromb Haemost* **86**, 1215-1220
22. Pavao, M., Aiello, K., Werneck, C., Silva, L., Valente, A., Mulloy, B., Colwell, N., Tollefsen, D., and Mourao, P. (1998) *J Biol Chem* **273**, 27848-27857
23. Pavao, M., Mourao, P., Mulloy, B., and Tollefsen, D. (1995) *J Biol Chem* **270**, 31027-31036
24. *Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Live Sciences, National Research Council.* (1996), National Academic Press, Washington, DC.
25. Hahm, K., Im, Y., Parks, T., Park, S., Markowitz, S., Jung, H., Green, J., and Kim, S. (2001) *Gut* **49**, 190-198
26. Dolber, P., and Spach, M. (1987) *Stain Technol* **62**, 23-26
27. Dolber, P., and Spach, M. (1993) *J Histochem Cytochem* **41**, 465-469
28. Bitter, T., and Muir, H.M. (1962) *Anal Biochem* **4**, 330-334.
29. Schreiber, S., Nikolaus, S., Hampe, J., Hamling, J., Koop, I., Groessner, B., Lochs, H., and Raedler, A. (1999) *Lancet* **353**, 459-461
30. Kyriakis, J.M., and Auruch, J. (2001) *J Physiol Rev* **81**, 807-869.
31. Dignass, A., and Podolsky, D. (1996) *Exp Cell Res* **225**, 422-429
32. Dignass, A.V., Stow, J.L., and Babyatsky, M.W. (1996) *Gut* **38**, 687-693.
33. Lawrance, I., Maxwell, L., and Doe, W. (2001) *Inflamm Bowel Dis* **7**, 226-236
34. Lawrance, I., Maxwell, L., and Doe, W. (2001) *Inflamm Bowel Dis* **7**, 16-26
35. Kevil, C., Payne, D., Mire, E., and Alexander, J. (1998) *J Biol Chem* **273**, 15099-15103

36. Kim, I., Moon, S., Kim, S., Kim, H., Koh, Y., and Koh, G. (2001) *J Biol Chem* **276**, 7614-7620
37. Tsiolakidou, G., Koutroubakis, I., Tzardi, M., and Kouroumalis, E. (2008) *Dig Liver Dis* **40**, 673-679
38. Koutroubakis, I., Tsiolakidou, G., Karmiris, K., and Kouroumalis, E. (2006) *Inflamm Bowel Dis* **12**(515-523)
39. Belmiro, C., Souza, H., Elia, C., Castelo-Branco, M., FR, S., Machado, R., and MS, P. (2005) *Int J Colorectal Dis* **20**, 295-304
40. Baumgart, D.C., and Sandborn, W.J. (2007) *Lancet* **369**, 1641- 1657
41. Wang, L., Brown, J., Varki, A., and Esko, J. (2002) *J Clin Invest* (110), 127-136
42. Murch, S., Lamkin, V., Savage, M., Walker-Smith, J., and MacDonald, T. (1991) *Gut* **32**, 913-917
43. Braegger, C., Nicholls, S., Murch, S., Stephens, S., and MacDonald, T. (1992) *Lancet* **339**, 89-91
44. Di Sabatino, A., Pender, S., Jackson, C., Prothero, J., Gordon, J., Picariello, L., Rovedatti, L., Docena, G., Monteleone, G., Rampton, D., and al, e. (2007) *Gastroenterology* **133**, 137-149
45. van Dullemen HM, v. D. S., Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN and Woody J. (1995) *Gastroenterology* **109**, 129-135
46. Targan, S., Hanauer, S., van Deventer, S., Mayer, L., Present, D., Braakman, T., DeWoody, K., Schaible, T., and Rutgeerts, P. (1997) *N Engl J Med* **337**, 1029-1035
47. Sands, B. E., Anderson, F. H., Bernstein, C. N., Chey, W. Y., Feagan, B. G., Fedorak, R. N., Kamm, M. A., Korzenik, J. R., Lashner, B. A., Onken, J. E., Rachmilewitz, D., Rutgeerts, P., Wild, G., Wolf, D. C., Marsters, P. A., Travers, S. B., Blank, M. A., and van Deventer, S. J. (2004) *N Engl J Med* **350**(9), 876-885
48. Rutgeerts, P., Sandborn, W. J., Feagan, B. G., Reinisch, W., Olson, A., Johanns, J., Travers, S., Rachmilewitz, D., Hanauer, S. B., Lichtenstein, G. R., de Villiers, W. J., Present, D., Sands, B. E., and Colombel, J. F. (2005) *N Engl J Med* **353**(23), 2462-2476
49. Hollenbach, E., Vieth, M., Roessner, A., Neumann, M., Malfertheiner, P., and Naumann, M. (2005) *J Biol Chem.* **280**, 14981-14988
50. Begue, B., Wajant, H., Bambou, J., Dubuquoy, L., Siegmund, D., Beaulieu, J., Canioni, D., Berrebi, D., Brousse, N., Desreumaux, P., and al, e. (2006) *Gastroenterology* **130**, 1962-1974
51. Letterio, J., and Roberts, A. (1998) *Annu Rev Immunol* **16**, 137-161
52. Beddy, D., Watson, W., Fitzpatrick, J., and O'Connell, P. (2004) *J Am Coll Surg* **199**, 234-242
53. Theiss, A., Simmons, J., Jobin, C., and PK, L. (2005) *J Biol Chem* **280**, 36099-36109
54. Babyatsky, M. W., Rossiter, G., and Podolsky, D. K. (1996) *Gastroenterology* **110**(4), 975-984
55. Monteleone, G., Pallone, F., and MacDonald, T. T. (2004) *Trends Immunol* **25**(10), 513-517
56. Dempsey, L. A., Brunn, G. J., and Platt, J. L. (2000) *Trends Biochem Sci* **25**(8), 349-351
57. Firestein, G. (1999) *J Clin Invest* **103**, 3-4
58. Khorana, A. A., Sahni, A., Altland, O. D., and Francis, C. W. (2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(11), 2110-2115
59. Marchetti, M., Vignoli, A., Russo, L., Balducci, D., Pagnoncelli, M., Barbui, T., and Falanga, A. (2008) *Thromb Res* **121**(5), 637-645

*Footnotes: The work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação José Bonifácio (FUJB), Mizutani Foundation for Glycoscience (to MSGP), MSGP and HSPS are research fellows from FAPERJ and CNPq. MSGP and HSPS contributed equally to the work and should be considered senior authors.

Figure Legends

Figure 1: Effect of heparin analogues on histological parameters of inflamed colon. Colonic samples from Wistar rats after TNBS-induced colitis without or with heparin or ascidian heparin analogues administration were fixed in 40g/l formaldehyde saline and stained with HE. Unfractionated mammalian heparin (porcine intestinal mucosa) or ascidian heparin analogues (dermatan sulfate and heparin from *Styela plicata*) (8mg/kg/day) were administered to the animals subcutaneously for 7 days. The colonic samples were scored according to the following histological parameters: ulceration, hyperplasia and inflammatory infiltrate. For both inflammatory infiltrate and hyperplasia, grading was considered: 3, severe; 2, moderate; 1, mild; 0, absent. For ulcers, grading was: 4, diffuse glandular disruption or extensive deep ulceration; 3, glandular disruption or focal deep ulceration; 2, diffuse

superficial ulceration; 1, focal superficial ulceration; and 0, absent. Values are mean \pm SEM of 10 animals/group. Statistical differences among the experimental groups were evaluated with the one-way ANOVA test. The level of significance was set at $P < 0.05$. Mam (mammalian); GAGs, glycosaminoglycans. Magnification, 100 X. Scale bar, 20 μ m.

Figure 2: *Effect of heparin analogues on macrophage infiltration into the inflamed colon.* Colonic samples from Wistar rats after TNBS-induced colitis without or with heparin or ascidian heparin analogues administration were immediately embedded in Tissue-Tek O.C.T. compound, snap-frozen in isopentane in a liquid nitrogen bath and submitted to immunohistochemical analysis using mouse monoclonal anti-rat ED1. Heparin and heparin analogues were administered to the animals as described in the legend of Figure 1. The number of immunoreactive cells per millimetre squared was counted in at least 10 different areas. Quantitative analysis of tissue sections were carried out under light microscopy at $\times 400$ magnification. Values are mean \pm SEM. of 10 animals/group. Statistical differences among the experimental groups were evaluated with the one-way ANOVA test. The level of significance was set at $P < 0.05$. Mam (mammalian); GAGs, glycosaminoglycans. Scale bar, 20 μ m.

Figure 3: *Effect of heparin analogues on lymphocyte infiltration into the inflamed colon.* Colonic samples from Wistar rats after TNBS-induced colitis without or with heparin or ascidian heparin analogues administration were immediately embedded in Tissue-Tek O.C.T. compound, snap-frozen in isopentane in a liquid nitrogen bath and submitted to immunohistochemical analysis using mouse monoclonal anti-rat CD3. Heparin and heparin analogues were administered to the animals as described in the legend of Figure 1. The number of immunoreactive cells per millimetre squared was counted in at least 10 different areas. Quantitative analysis of tissue sections were carried out under light microscopy at $\times 400$ magnification. Values are mean \pm SEM. of 10 animals/group. Statistical differences among the experimental groups were evaluated with the one-way ANOVA test. The level of significance was set at $P < 0.05$. Mam (mammalian); GAGs, glycosaminoglycans. Scale bar, 20 μ m.

Figure 4: *Effect of heparin analogues on cytokine production in the inflamed colon.* Colonic mucosal explants from Wistar rats after TNBS-induced colitis without or with heparin or ascidian heparin analogues administration were cultured for 24 h at 37°C. After centrifugation the supernatants were used for measurement of the concentration of cytokines by a commercial sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for rat TNF- α , TGF- β and VEGF, as described in Experimental Procedures. Heparin and heparin analogues were administered to the animals as described in the legend of Figure 1. Quantitative analysis of tissue sections were carried out under light microscopy at $\times 400$ magnification. Values were expressed as picogram of cytokine/mg protein and represent the mean \pm SEM. of 10 animals/group. Statistical differences among the experimental groups were evaluated with the one-way ANOVA test. The level of significance was set at $P < 0.05$. Mam (mammalian); GAGs, glycosaminoglycans. Scale bar, 20 μ m.

Figure 5: *Effect of heparin analogues on NF-Kappa-B activation in the inflamed colon.* Colonic samples from Wistar rats after TNBS-induced colitis without or with heparin or ascidian heparin analogues administration were immediately embedded in Tissue-Tek O.C.T. compound, snap-frozen and submitted to immunohistochemical analysis using mouse monoclonal anti-rat p65. Heparin and heparin analogues were administered to the animals as described in the legend of Figure 1. Quantitative analysis of tissue sections were carried out under light microscopy at $\times 800$ magnification. The number of cells with nuclear NF-Kappa-B-staining (NF-Kappa-B positive cells) per millimetre squared was counted in at least 10 different areas. Values are mean \pm SEM. of 10 animals/group. Statistical differences among the experimental groups were evaluated with the one-way ANOVA test. The level of significance was set at $P < 0.05$. Mam (mammalian); GAGs, glycosaminoglycans. Scale bar, 20 μ m.

Figure 6: *Effect of heparin analogues on ERK activation in the inflamed colon.* Colonic samples from Wistar rats after TNBS-induced colitis without or with heparin or ascidian heparin analogues administration were immediately embedded in Tissue-Tek O.C.T. compound, snap-frozen in isopentane in a liquid nitrogen bath and submitted to immunohistochemical analysis using mouse monoclonal anti-rat P-ERK1/2 and FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody. Heparin and heparin analogues were administered to the animals as described in the legend of Figure 1. The tissues were observed with a Zeiss LSM 510 confocal laser scanning microscope. The number of

immunoreactive cells in the lamina propria per millimetre squared was counted in at least 10 different areas. Values are mean \pm SEM. of 10 animals/group. Statistical differences among the experimental groups were evaluated with the one-way ANOVA test. The level of significance was set at $P < 0.05$. Mam (mammalian); GAGs, glycosaminoglycans. Scale bar, 20 μ m.

Figure 7: *Effect of heparin analogues on collagen deposition in the inflamed colon.* Colonic samples from Wistar rats after TNBS-induced colitis without or with heparin or ascidian heparin analogues administration were fixed in 40g/l formaldehyde saline and the collagen fibers stained with phosphomolibidic acid-picro-sirius red dye. Heparin and heparin analogues were administered to the animals as described in the legend of Figure 1. Density of collagen fibers was defined by the area positively stained for collagen in relation to total intestinal tissue per millimetre squared using an imaging analysis system. At least 15 different areas per tissue section were analyzed under light microscopy at $\times 400$ magnification. Values are mean \pm SEM. The level of significance was set at $P < 0.05$. Mam (mammalian); GAGs, glycosaminoglycans. Scale bar, 20 μ m.

Figure 8: *Effect of heparin analogues on epithelial cell apoptosis in the inflamed colon.* Colonic samples from Wistar rats after TNBS-induced colitis without or with heparin or ascidian heparin analogues administration were embedded in paraffin and apoptotic cells were determined by the terminal deoxynucleotidyltransferase (*TdT*)-mediated dUDP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay, as described in Experimental Procedures. Heparin and heparin analogues were administered to the animals as described in the legend of Figure 1 and sections were analyzed in a confocal microscope. The density of apoptotic cells was defined as the percentage of immunoreactive cells within at least 500 epithelial cells in the crypts and in the surface epithelium of longitudinally sectioned colonic pits. Values are mean \pm SEM. The level of significance was set at $P < 0.05$. Mam (mammalian); GAGs, glycosaminoglycans. Magnification 400 X. Scale bar, 20 μ m.

Figure 9: *Effect of heparin analogues on coagulation and platelet counts ex vivo.* At experimental day 7, animals from the different groups were anaesthetized and blood samples were collected. (A) Activated partial thromboplastin time (aPTT) was carried out in rat plasma using a coagulometer (Amelung KC4A) and expressed in seconds, as described in Experimental Procedures. (B) Platelet count in the whole blood was measured on an automatic hematology analyzer. Results are expressed as number of cells per cubic millimeter. Values are mean \pm SEM. The level of significance was set at $P < 0.05$. Mam (mammalian); GAGs, glycosaminoglycans.

Table 1: Content and type of glycosaminoglycans present in Colonic samples from Wistar rats after TNBS-induced colitis without or with heparin or ascidian heparin analogues administration.

Group	Uronic acid ^a ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	GAGs (%) ^b		
		HS	DS	CS
Control	1.20 ± 0.039	26.4 ± 0.245	45.2 ± 0.408	28.4 ± 0.159
TNBS	2.61 ± 0.077	33.7 ± 0.365	18.7 ± 0.195	47.6 ± 0.204
TNBS+Hep Mam	1.23 ± 0.059	28.56 ± 0.439	41.58 ± 0.444	29.86 ± 0.333
TNBS+Hep <i>Sp</i>	1.18 ± 0.033	20.88 ± 0.201	52.58 ± 0.367	26.86 ± 0.155
TNBS+DS Mam	1.17 ± 0.070	26.23 ± 0.284	43.44 ± 0.466	30.33 ± 0.395
TNBS+DS <i>Sp</i>	1.34 ± 0.115	25.33 ± 0.288	48.34 ± 0.326	26.33 ± 0.449

^a The content of glycosaminoglycan in each group was estimated by uronic acid after isolation of the glycans from the colon, as described in Experimental Procedures.

^b The type of glycosaminoglycan was determined by agarose gel electrophoresis of the isolated glycans from each group before and after treatment with specific GAG lyases, as described in Experimental Procedures. Hep, heparin; HS, heparan sulfate; DS, dermatan sulfate; CS, chondroitin sulfate; Mam, mammal; *Sp*, *Styela plicata*.
Values are median \pm SEM, n=7

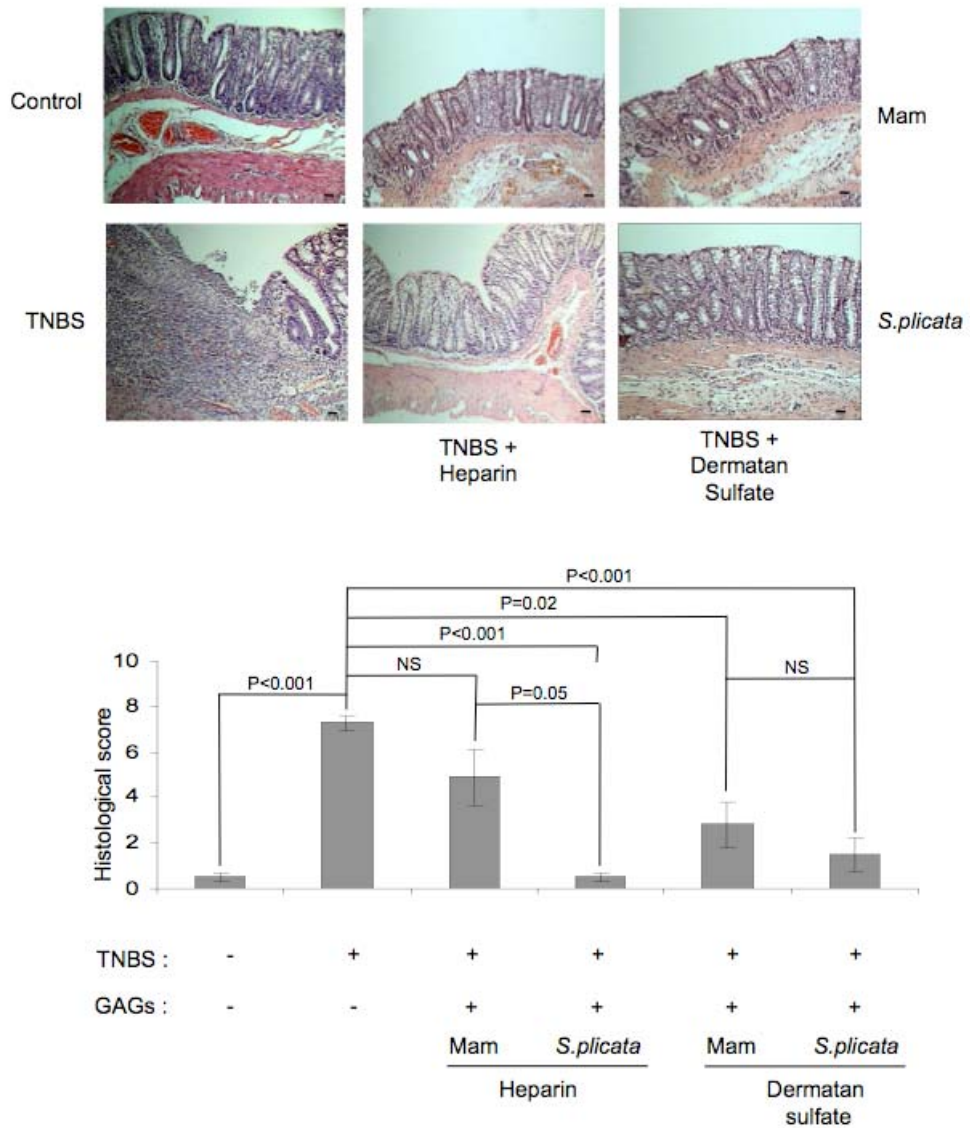


Figure 1, Belmiro *et al.*

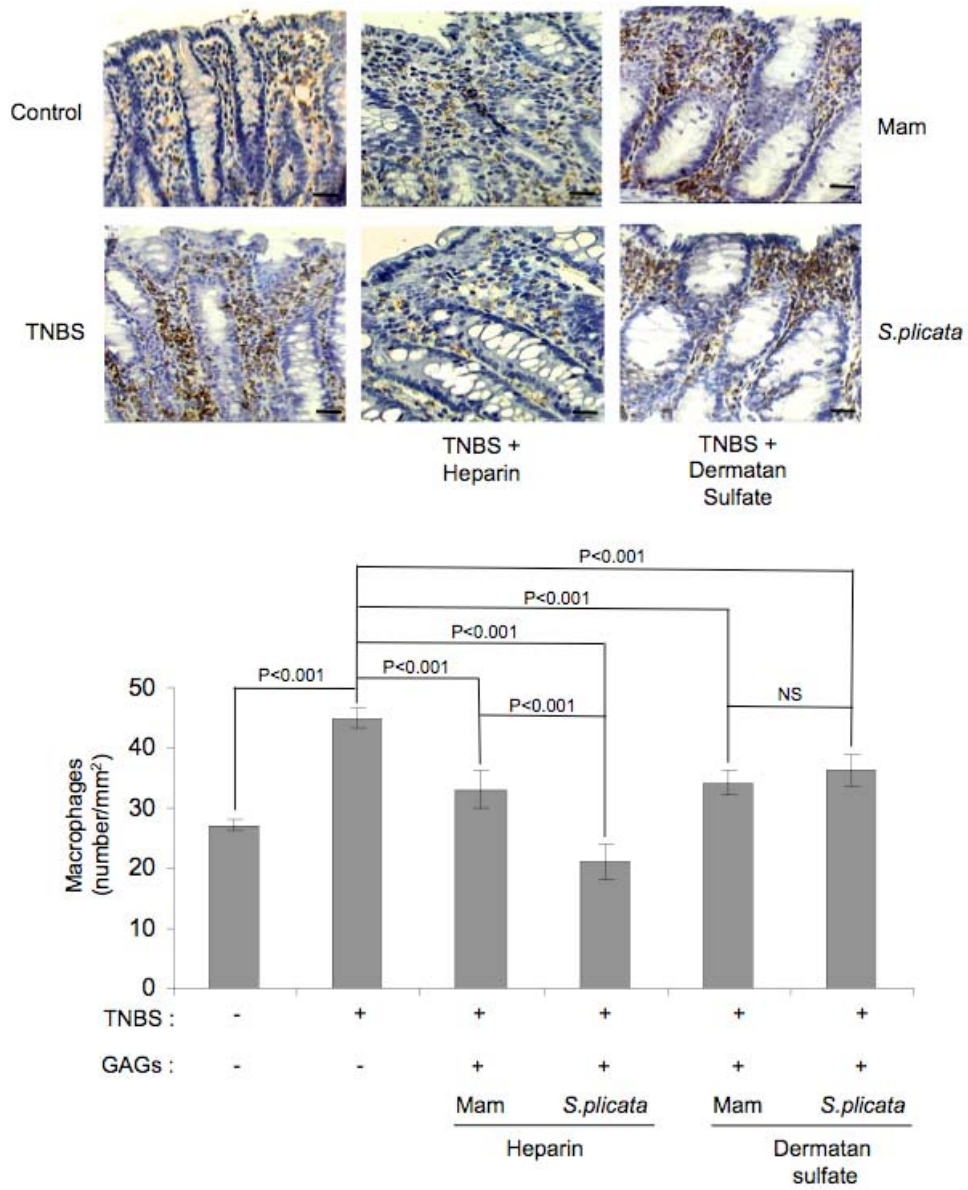


Figure 2, Belmiro *et al.*

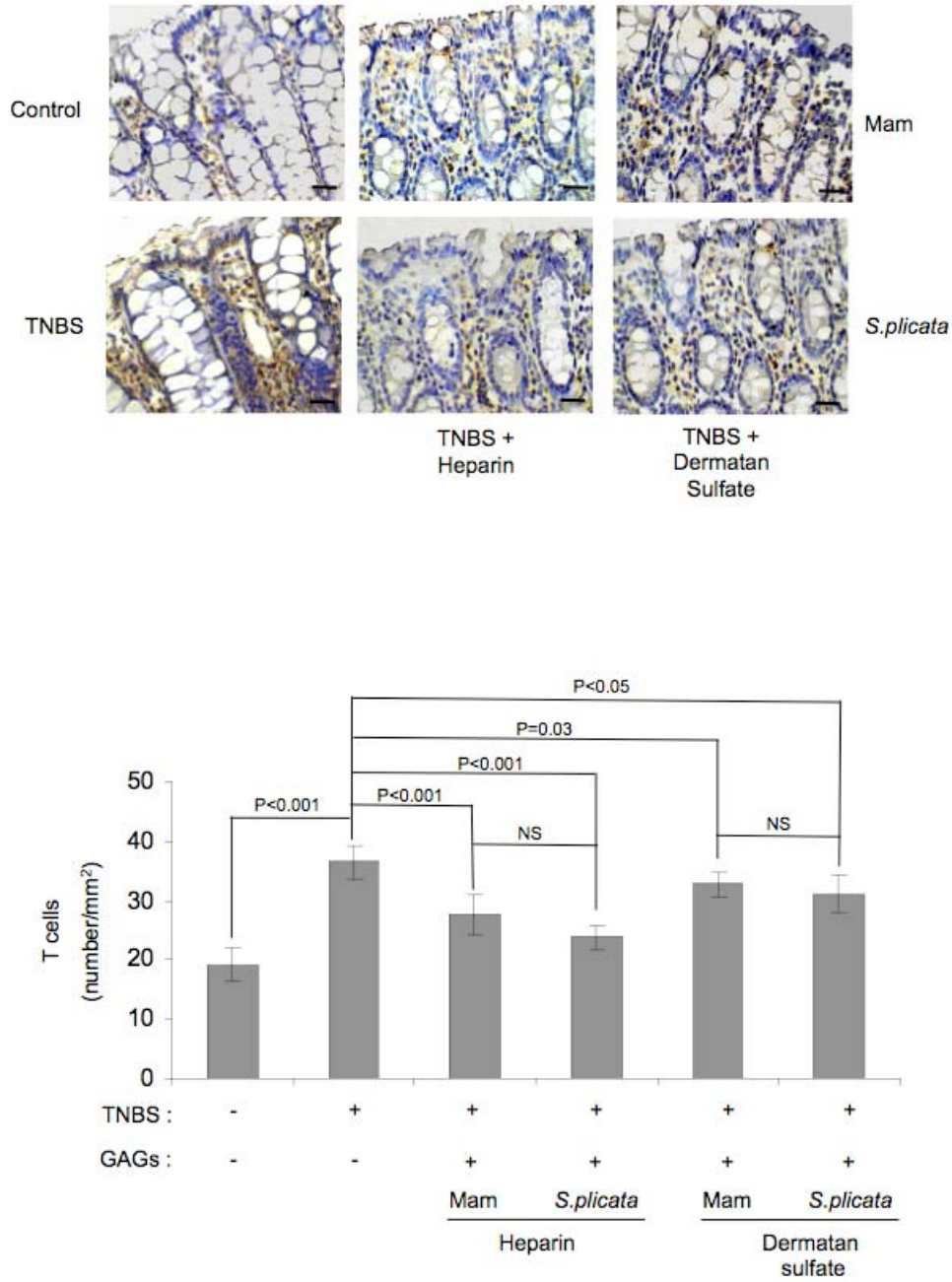


Figure 3, Belmiro *et al.*

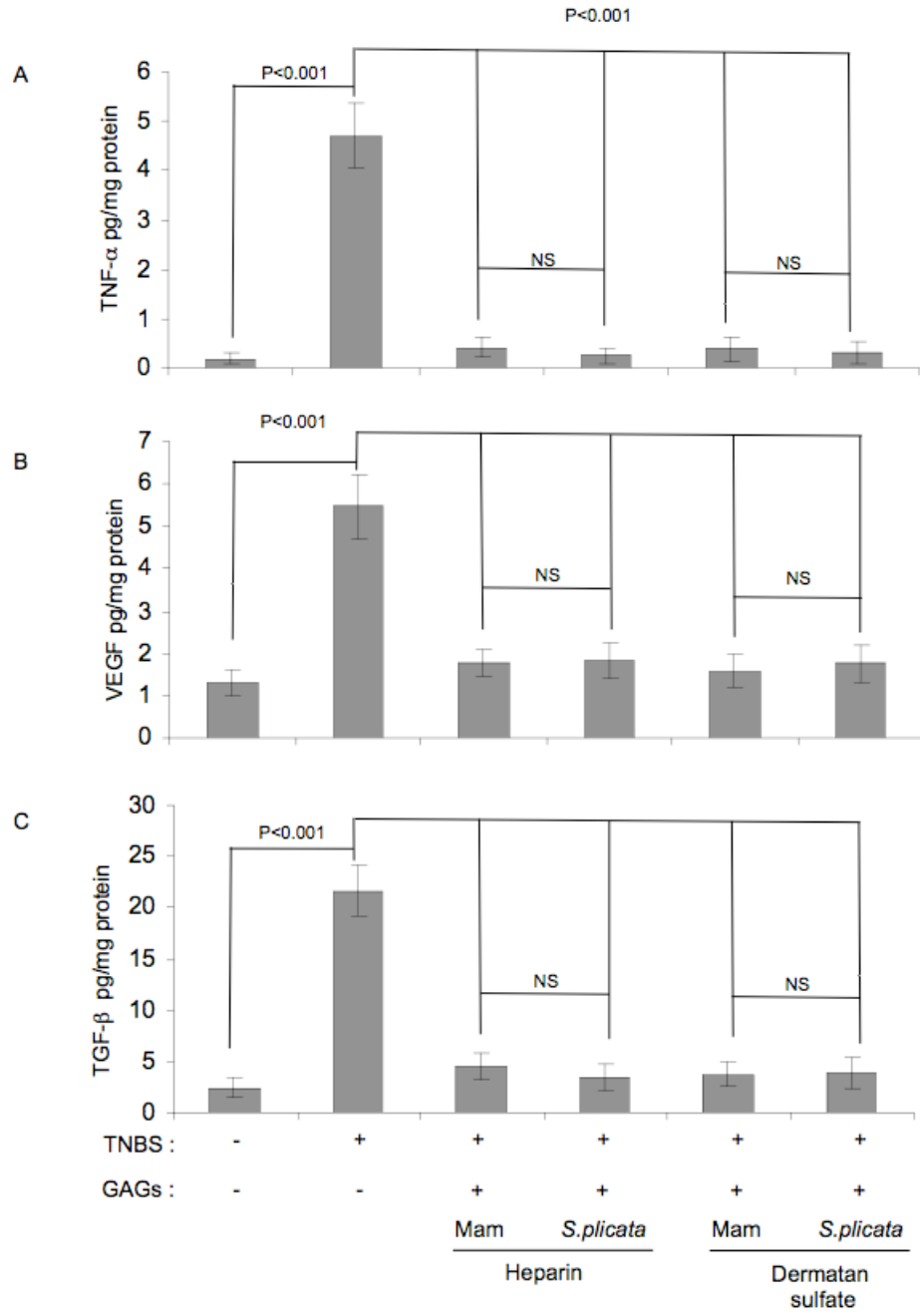


Figure 4, Belmiro et al.

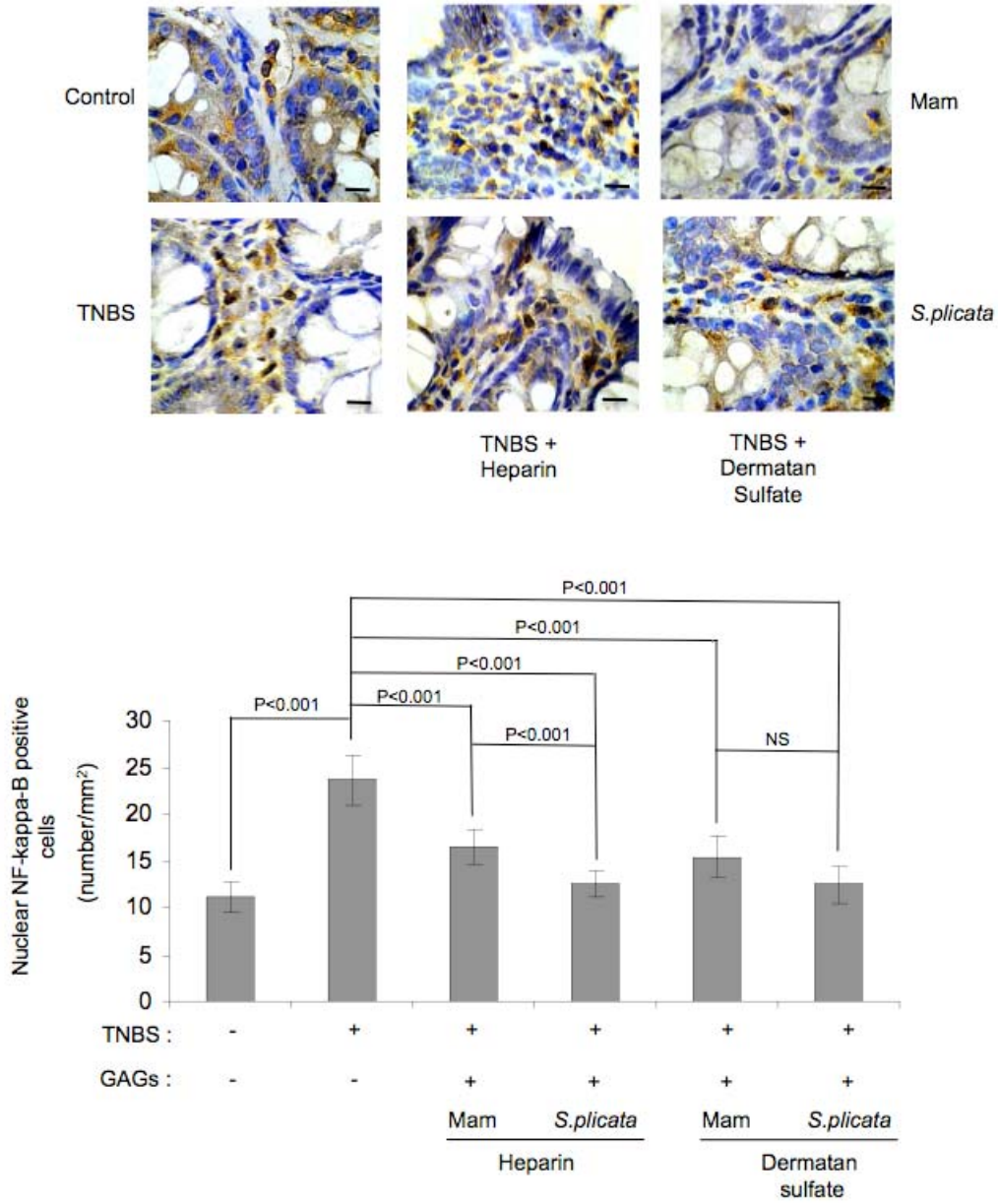


Figure 5, Belmiro *et al.*

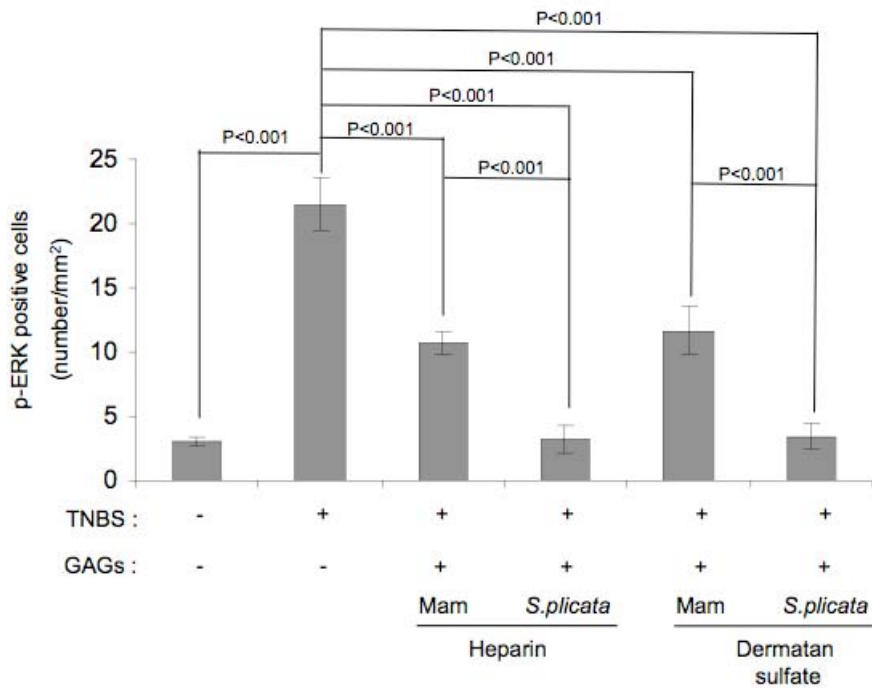
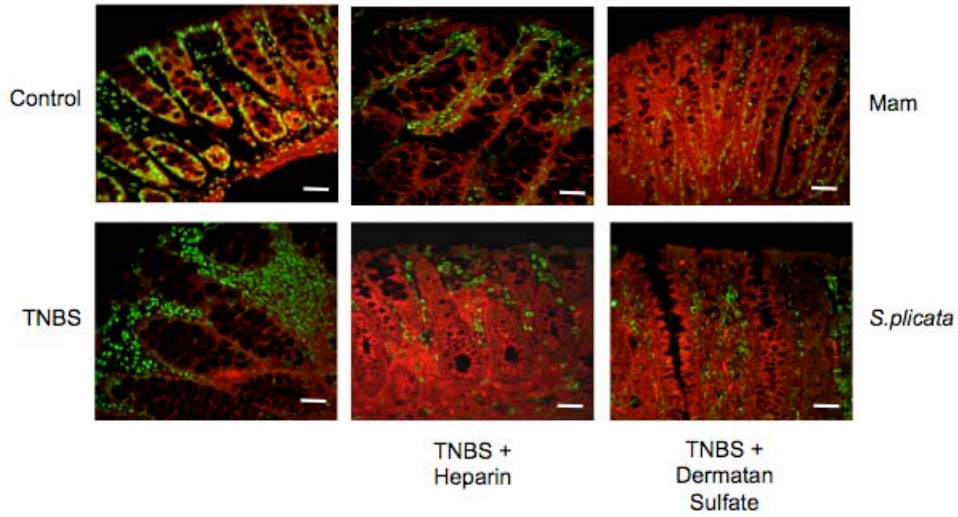


Figure 6, Belmiro *et al.*

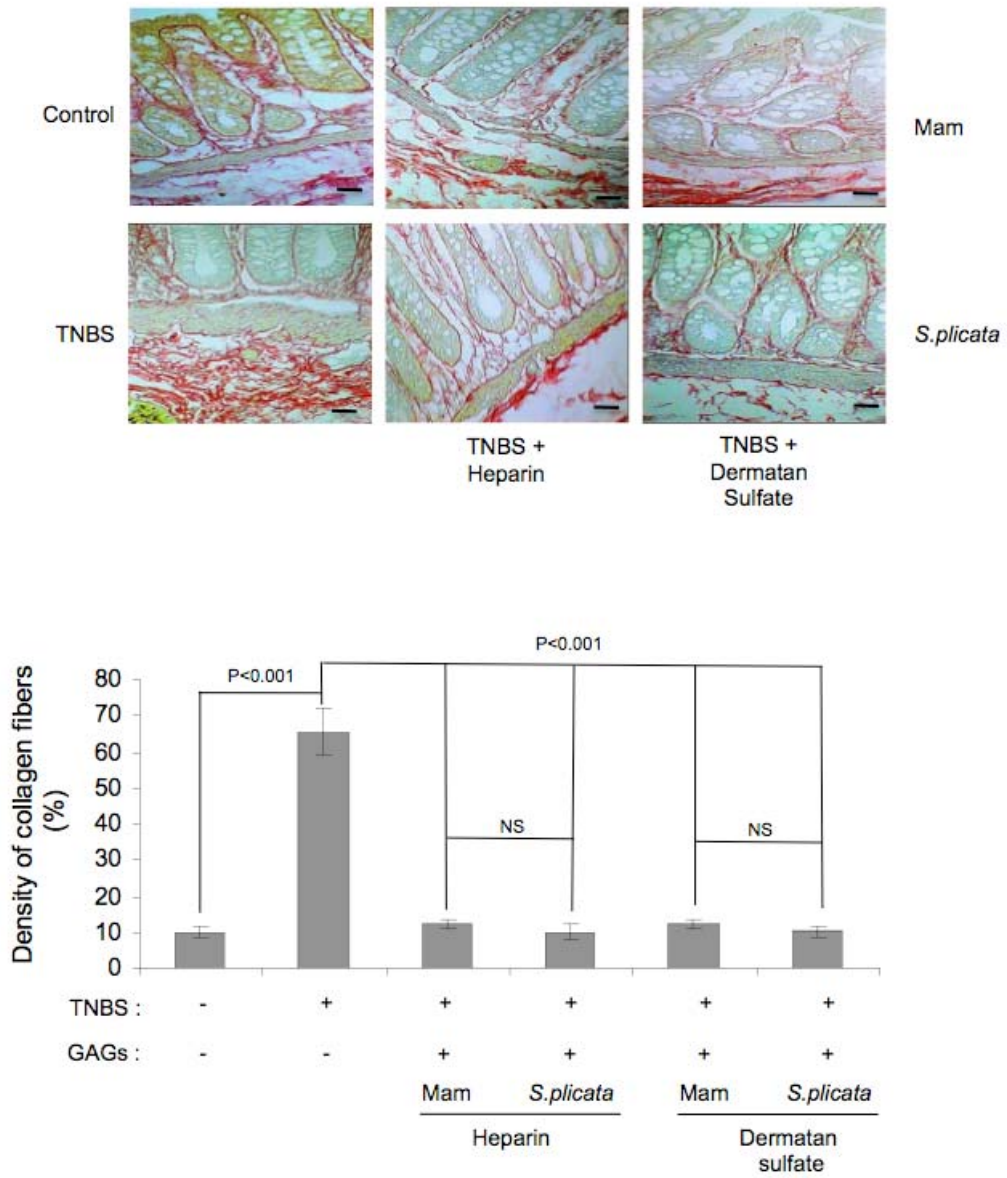


Figure 7, Belmiro *et al.*

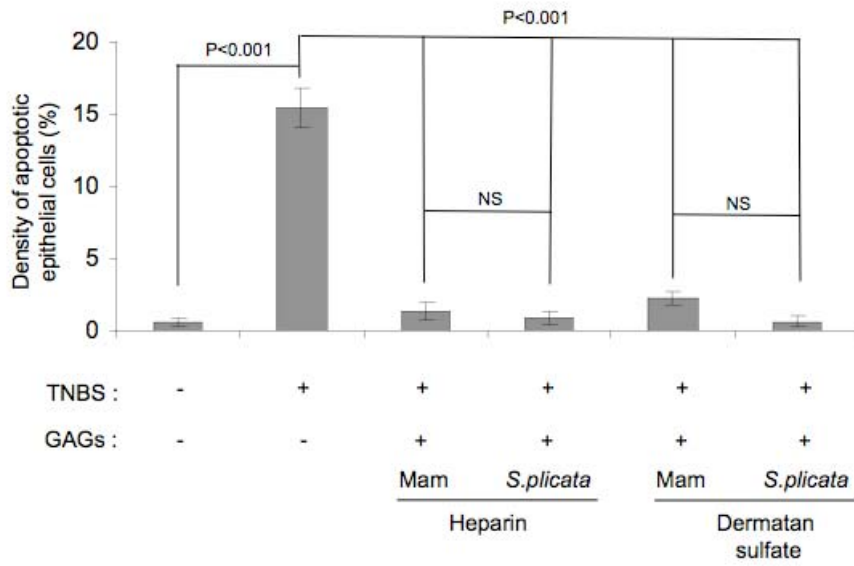
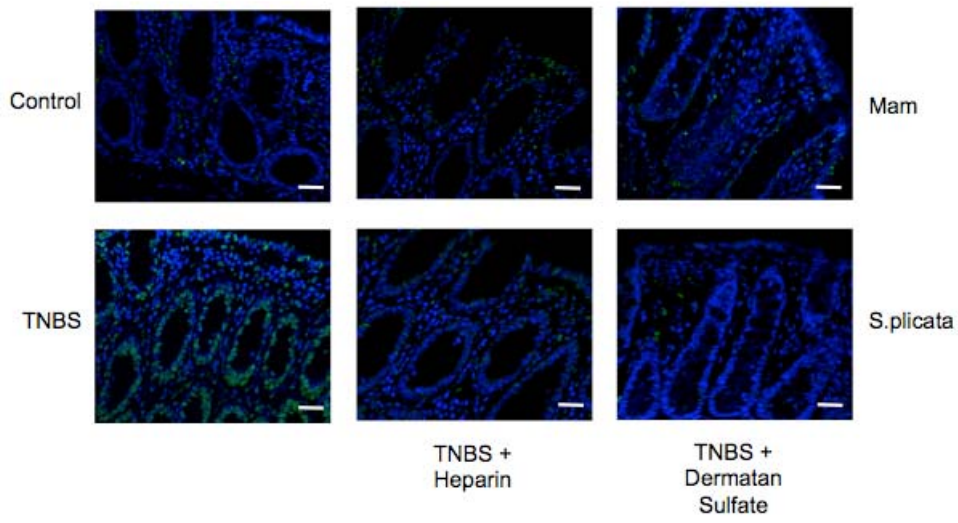


Figure 8, Belmiro *et al.*

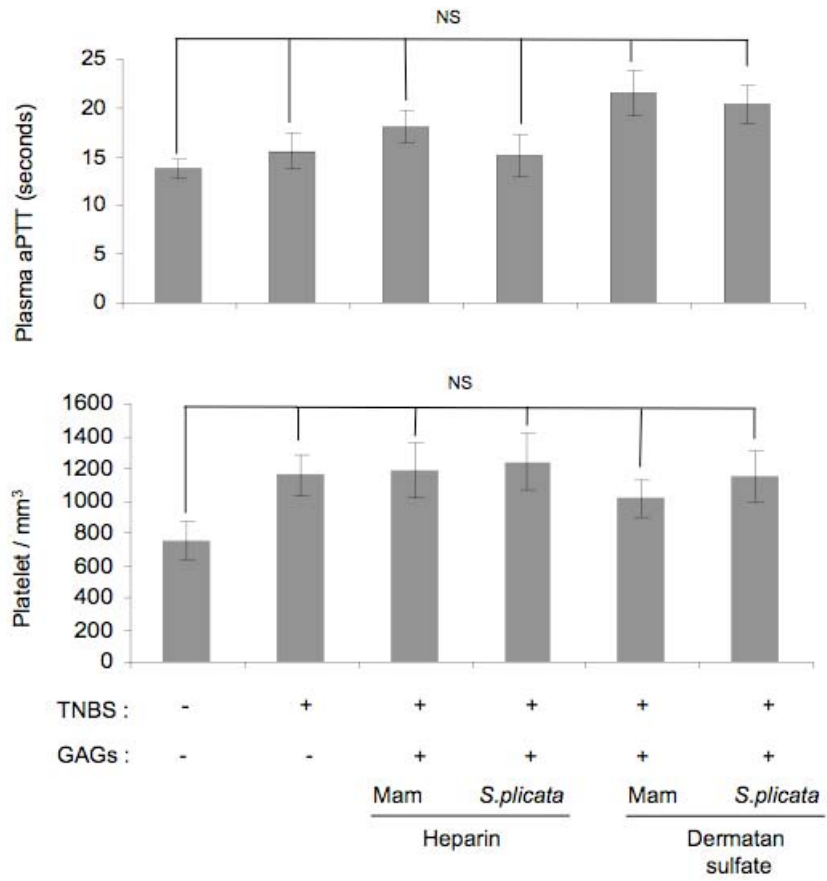


Figure 9, Belmiro *et al.*

CURRICULUM VITAE

Nome: Celso Luis Ribeiro Belmiro

Nascimento: 28/04/71

Naturalidade: Cabo Frio - RJ

Formação Acadêmica

Faculdade de Biologia – Modalidade Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Faculdade da Região dos Lagos, dezembro de fevereiro de 1997 a dezembro de 2000.

Doutorado em Química Biológica pelo Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientação de Estudantes

1. Flavia Ramos da Silva – Iniciação Científica de abril de 2001 a dezembro de 2004. Atualmente exercendo Medicina.

2. Leandra Melim - Iniciação Científica de abril de 2004 a setembro de 2007. Atualmente fazendo Mestrado em Educação na FIOCRUZ.

Comunicação em Congresso

4 comunicações em congressos nacionais

3 comunicações em congressos internacionais

Publicações

Santos JC, Mesquita JM, Belmiro CL, da Silveira CB, Viskov C, Mourier PA, Pavão MS. (2007) Isolation and characterization of a heparin with low antithrombin activity from the body of *Styela plicata* (Chordata-Tunicata). Distinct effects on venous and arterial models of thrombosis. *Thromb Res.* 121(2):213-23.

Belmiro CL, Souza HS, Elia CC, Castelo-Branco MT, Silva FR, Machado RL, Pavão MS. (2005) Biochemical and immunohistochemical analysis of glycosaminoglycans in inflamed and non-inflamed intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis.* 20(4):295-304.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)