

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

FRANCIELLE VEIGA RAMALHO

**EFEITOS DO ALFA-BISABOLOL SOBRE A
INFLAMAÇÃO DO CÓLON DISTAL E
MANIFESTAÇÕES HEPÁTICAS EM RATOS COM
COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO 2,4,6-
TRINITROBENZENOSULFÔNICO (TNBS)**

Maringá
2022

FRANCIELLE VEIGA RAMALHO

**EFEITOS DO ALFA-BISABOLOL SOBRE A INFLAMAÇÃO
DO CÓLON DISTAL E MANIFESTAÇÕES HEPÁTICAS EM
RATOS COM COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO 2,4,6-
TRINITROBENZENOSULFÔNICO (TNBS)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração - Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Jurandir Fernando Comar
Co-orientadora: Maria Raquel Marçal
Natali

Maringá
2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

R165e	<p>Ramalho, Francielle Veiga, 1990-</p> <p>Efeitos do alfa-bisabolol sobre a inflamação do cólon distal e manifestações hepáticas em ratos com colite induzida por ácido 2,4,6-Trinitrobenzenosulfônico (TNBS) / Francielle Veiga, 1990- Ramalho. -- Maringá, PR, 2022. 103 f.: il. color., figs., tabs.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Jurandir Fernando Comar. Coorientadora: Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2022.</p> <p>1. Doença inflamatória intestinal (DII). 2. Colite experimental. 3. Metabolismo hepático. 4. Estresse oxidativo. 5. Histologia. I. Comar, Jurandir Fernando, orient. II. Natali, Maria Raquel Marçal, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). IV. Título.</p> <p>CDD 23.ed. 571.57</p>
-------	---

FRANCIELLE VEIGA RAMALHO

**EFEITOS DO ALFA-BISABOLOL SOBRE A INFLAMAÇÃO DO
CÓLON DISTAL E MANIFESTAÇÕES HEPÁTICAS EM RATOS COM
COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO 2,4,6-
TRINITROBENZENOSULFÔNICO (TNBS)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração - Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 31/08/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr^o Jurandir Fernando Comar (orientador)
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a Dr^a Maria Raquel Marçal Natali (Presidente)
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a Dr^a Fernanda Losi Alves de Almeida
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a Dr^a Lívia Bracht
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a Dr^a Helenton Crhistian Barrena
Centro Universitário Ingá

BIOGRAFIA

Francielle Veiga Ramalho nasceu em Maringá em 19/02/1990. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (2015). Em 2016, ingressou no curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular), em nível de mestrado, na Universidade Estadual de Maringá, concluindo em 2018. No mesmo ano ingressou no doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração em Biologia Celular e Molecular) na Universidade Estadual de Maringá, desenvolvendo seu trabalho no Laboratório de Metabolismo Hepático do Departamento de Bioquímica e no Laboratório de Histologia Animal do Departamento de Ciências Morfológicas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por me dar saúde, força, sabedoria e discernimento.

Agradeço a minha família. Ao meu pai que com sua calma, apenas me abraçou e me apoiou nos momentos que mais precisei. A minha mãe, que com sua fé imensurável, rezou por mim e ficou sozinha enquanto eu estava estudando no quarto. A minha madrasta, que ao lado do meu pai, foi suporte para nós, em oração e perseverança! Ao meu irmão, tão carinhoso e cuidadoso, esteve sempre presente em todos os momentos. A minha cunhada Fabiana, sobrinha Yasmin, Maicon, Fernanda, Odair, Dora. É por vocês que quero alcançar grandes vitórias!

Ao meu namorado Vinicius, que está comigo desde o mestrado, celebrando minhas conquistas e sendo meu ombro amigo nos momentos de necessidade, inclusive na hora de tratar os ratos aos domingos e feriados, rs. Te amo!

Agradeço aos meus amigos, Juliana, Mariana M., Bruna, Flávia, Camila, Janaina, Marcelo, Stefanie, Mayra, Maria Eugênia, Felipe, Mariana B., que por muitas vezes acreditarem mais em mim do que eu mesmo.

Ao meu orientador prof^o Dr Jurandir Fernando Comar, com sua praticidade e inteligência, me deu autonomia e liberdade para trabalhar em seu laboratório e confiou a mim este projeto de doutorado. Serei eternamente grata pela oportunidade professor. Minha gratidão e todo meu respeito a você!

As professoras que direta ou indiretamente me auxiliaram neste trabalho, prof^a Dr^a Livia Bracht, com sua calma e delicadeza faz tudo ficar mais leve, prof^a Dr^a Anacharis Babeto de Sá Nakanishi que tem uma calculadora no cérebro e passa isso com uma simplicidade para nós alunos e prof^a Dr^a Maria Raquel Marçal Natali, com seus olhos clínicos e com toda paciência me ensinou observar as nuances de cada processo. Vocês são exemplo de mulheres fortes e profissionais exemplares que me espelho! Meu carinho é imenso por vocês!

Aos meus amigos do Laboratório de Metabolismo Hepático e do Laboratório de Histologia Animal, pela troca de conhecimento e ensinamentos. Vocês sem dúvida fizeram meus dias mais leves e meu trabalho mais prazeroso.

Agradeço também ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade e a Universidade Estadual de Maringá por tornar possível a conclusão deste trabalho.

Obrigada a todos que fizeram deste momento real e concreto.

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPQ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Foi realizado no laboratório de Metabolismo Hepático do Departamento de Bioquímica e no Laboratório de Histologia Animal do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá, apresentado na forma dois artigos científicos originais, em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas.

Artigo 1:

Ramalho, F.V.; Silva, M.T.; Sá-Nakanishi, A.B; Bracht, A.; Comar, J.F.
Tratamento com alfa-bisabolol reduz a inflamação do cólon distal em ratos com colite induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico TNBS (será submetido para Digestive Diseases and Sciences)

Artigo 2:

Ramalho, F.V.; Silva, M.T.; Sá-Nakanishi, A.B; Bracht, A.; Comar, J.F.
Modificações metabólicas no fígado de ratos com colite induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS): efeitos do tratamento com alfa-bisabolol (será submetido para Cell Biochemistry and Function)

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS: A colite ulcerativa e a doença de Crohn são os dois tipos principais de doença inflamatória intestinal (DII). A colite ulcerativa afeta primariamente a mucosa do cólon, enquanto a doença de Crohn pode afetar a parede intestinal todo o trato intestinal. O estresse oxidativo está aumentado nos sítios de inflamação intestinal em modelos de colite em animais. Além disso, as DII podem afetar populações de neurônios e células gliais do trato gastrointestinal e também acometem alterações extraintestinais, principalmente no fígado, como manifestações hepatobiliares, colelitíase e esteatose. Entretanto, ainda não se sabe se estas alterações modificam o metabolismo energético hepático, o que poderia afetar a homeostase metabólica corporal e contribuir para a disfunção nutricional. A colite induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos, desenvolve uma intensa inflamação da mucosa colônica com infiltração celular transmural. Entretanto, pouco se sabe sobre as manifestações extraintestinais similares às daquelas de pacientes com DII, sendo este modelo portanto, útil para avaliar o efeito de drogas sobre as manifestações hepáticas da doença. O alfa-bisabolol é o principal constituinte do óleo essencial de camomila-vulgar (*Matricaria chamomilla*) e apresenta atividade anti-inflamatória. Desta forma, este estudo avaliou: 1) se o alfa-bisabolol, oralmente administrado, modifica a inflamação, a morfologia e o estado oxidativo do cólon distal de ratos com colite induzida pelo TNBS; 2) se o estresse oxidativo, a morfometria de hepatócitos e a gliconeogênese estão modificados no fígado dos ratos colíticos; e 3) se o alfa-bisabolol modifica estas manifestações hepáticas da colite.

MÉTODOS: ratos Wistar com 90 dias de idade (340-360g) foram distribuídos nos seguintes grupos: ratos controles (C), controles tratados com alfa-bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/kg (CB50 e CB200), ratos colíticos (Col), e colíticos tratados com alfa-bisabolol nas mesmas doses (ColB50 e ColB200). O alfa-bisabolol ou veículo (3% de tween 80 em salina) foram oralmente administrados por sete dias após a indução da colite. No oitavo dia, após laparotomia, o sangue foi colhido da veia cava inferior e o fígado e o cólon removidos e divididos para o processamento histológico e para a preparação do homogenato. Para o processamento histológico, cortes semi-seriados com 5 µm foram montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina. Para

a imuno-histoquímica, amostras de membrana total da túnica muscular foram obtidos por microdissecção do cólon distal e submetidos a técnica de imunofluorescência com dupla marcação, utilizando anticorpo HuC/D⁺, para população geral neuronal, e anticorpo S100⁺ para população de células gliais. O estresse oxidativo hepático e colônico foi avaliado pela determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutathione reduzida nos homogenatos e conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a atividade da catalase e superóxido dismutase (SOD) nos sobrenadantes dos homogenatos. No plasma, o estresse oxidativo foi avaliado pelos níveis de proteínas carboniladas, capacidade antioxidante total (TAC), capacidade redutora de ferro (FRAP) e grupos tióis. A atividade da mieloperoxidase (MPO) no plasma, cólon e fígado e atividade das enzimas AST e ALT no plasma foram utilizadas para avaliar inflamação e dano hepático. A análise morfológica e morfométrica do fígado foi realizada através de imagens da região próxima à veia central do parênquima hepático, e do cólon através de imagens da parede colônica. A gliconeogênese a partir do lactato foi avaliada utilizando os fígados em perfusão isolada não-recirculante. **RESULTADOS:** os ratos colíticos apresentaram danos macroscópicos colônicos evidentes e aumento no índice de atividade da doença (IAD), assim como redução de 20% do peso corporal comparado ao controle. Em relação ao estresse oxidativo de ratos colíticos, os níveis de TBARS, foram 252% maior no cólon e não alterado no fígado; os níveis de ROS foram 109% maiores no cólon e 71% no fígado; a atividade da catalase e os níveis de GSH, foram diminuídos em 40% e 34% no fígado e 37% e 40% no cólon respectivamente. A atividade da MPO de ratos colíticos foi cerca de 100% maior no cólon, fígado e plasma, enquanto os níveis de proteínas carboniladas, um marcador pró-oxidante, foram 70% maiores no plasma. Os animais colíticos apresentaram menor capacidade antioxidante plasmática, conforme observado pela reduzida TAC (37%), FRAP (26%) e tióis (30%) comparados ao controle. O cólon distal nos ratos colíticos apresentou aumento na espessura da túnica mucosa em 20%, da túnica submucosa em 136% e da parede total em 21%. Os hepatócitos dos ratos colíticos reduziram em 20% quanto a área e aumentaram 7% quanto ao número/mm². Ratos colíticos não apresentaram alteração nos neurônios e células da glia do plexo mioentérico. Todavia, a gliconeogênese foi diminuída em 40% no fígado. Em animais colíticos, o alfa-bisabolol na dose de 50 mg/Kg diminuiu o peso do

cólon distal (36%), o índice de atividade da doença (45%), o escore macroscópico (50%), mas não impediu a perda de peso corporal. Também diminuiu os níveis de TBARS colônico (35%), ROS hepático (35%) e atividade da MPO no fígado (76%), plasma (47%) e cólon (45%), enquanto aumentou a atividade SOD em 92% e catalase em 170% no fígado. No plasma de ratos colíticos, o alfa-bisabolol 50 mg/Kg aumentou os níveis de tióis em 22% e TAC em 50%, enquanto no cólon, aumentou a densidade das células gliais em 85% e no fígado a área dos hepatócitos em 13%. O alfa-bisabolol nas duas doses aumentou a gliconeogênese hepática dos animais colíticos para os níveis controles, mas a dose de 200 mg/Kg diminuiu esta via nos animais controles. Da mesma forma, o alfa-bisabolol 200 mg/Kg aumentou o estresse oxidativo no fígado e plasma de animais saudáveis, o que indica a não ausência de toxicidade para esta dose, mesmo apresentando atividade anti-inflamatória no cólon e fígado. As enzimas AST e ALT plasmáticas praticamente não foram modificadas nem pela colite, nem pelo tratamento com alfa-bisabolol.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO: Os ratos colíticos apresentaram, aos sete dias após a indução, aumento de infiltrado inflamatório no cólon e fígado, aumentado estresse oxidativo no cólon e fígado, alterada morfometria de hepatócitos e parede do cólon e reduzida gliconeogênese no fígado. Esta última deve ser o resultado do aumentado estresse oxidativo e inflamação que ocorrem no órgão. As manifestações hepáticas da doença ocorreram sem que os marcadores plasmáticos de dano hepático estivessem alterados e o modelo experimental, portanto, foi utilizado ao menos em parte para investigar as manifestações hepáticas da colite em quadros de DII. O alfa-bisabolol oralmente administrado em ratos com colite induzida por TNBS durante sete dias na dose de 50 mg/Kg diminuiu consideravelmente a inflamação sistêmica, colônica e hepática. Em adição, diminuiu o estresse oxidativo sistêmico, colônico e hepático, da mesma forma que aumentou a gliconeogênese para os valores encontrados nos ratos controles saudáveis. Na dose de 200 mg/Kg, o alfa-bisabolol modificou negativamente o metabolismo e estresse oxidativo hepático, o que mostra a não ausência de toxicidade para esta dose. Diante disso, o alfa-bisabolol em doses próximas à 50 mg/Kg pode ser um bom candidato como adjuvante no tratamento das manifestações intestinais e hepáticas das DII.

PALAVRA CHAVE: metabolismo hepático, estresse oxidativo, colón distal, colite experimental, alfa-bisabolol.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: Ulcerative colitis and Crohn's disease are the two main types of inflammatory bowel disease (IBD). Ulcerative colitis primarily affects the lining of the colon, while Crohn's disease can affect the intestinal wall throughout the intestinal tract. Oxidative stress is increased at sites of intestinal inflammation in animal models of colitis. In addition, IBD can affect populations of neurons and glial cells in the gastrointestinal tract and also affect extraintestinal changes, mainly in the liver, such as hepatobiliary manifestations, cholelithiasis and steatosis. However, it is still unknown whether these alterations modify hepatic energy metabolism, which could affect the body's metabolic homeostasis and contribute to nutritional dysfunction. Colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) in rats develops an intense inflammation of the colonic mucosa with transmural cellular infiltration. However, little is known about extraintestinal manifestations similar to those of patients with IBD, and this model is therefore useful to assess the effect of drugs on the hepatic manifestations of the disease. Alpha-bisabolol is the main constituent of common chamomile essential oil (*Matricaria chamomilla*) and has anti-inflammatory activity. Thus, this study evaluated: 1) whether orally administered alpha-bisabolol modifies the inflammation, morphology and oxidative state of the distal colon of rats with TNBS-induced colitis; 2) if oxidative stress, hepatocyte morphometry and gluconeogenesis are modified in the liver of colitic rats; and 3) whether alpha-bisabolol modifies these hepatic manifestations of colitis. **METHODS:** 90-day-old Wistar rats (340-360g) were divided into the following groups: healthy control rats (C), controls treated with alpha-bisabolol at doses of 50 and 200 mg/kg (CB50 and CB200), colitic rats (Col), and colitis treated with alpha-bisabolol at the same doses (ColB50 and ColB200). Alpha-bisabolol or vehicle (3% tween 80 in saline) was orally administered for seven days after colitis induction. On the eighth day, the peritoneal cavity of the previously anesthetized rats was exposed, blood collected from the vena cava and the liver and colon removed and divided into two parts: one used for histological processing and the other for the preparation of the homogenate. For histological processing, semi-serial sections measuring 5 μ m were mounted on slides and stained with hematoxylin and eosin. For immunohistochemistry,

total membrane preparations of the muscularis were obtained by microdissection of the distal colon and submitted to a double-label immunofluorescence technique, using HuC/D+ antibody for evidence of the general neuronal population, and S100+ antibody for the glial cell population. . Hepatic and colonic oxidative stress was evaluated by determining the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and reduced glutathione in the homogenates and the content of reactive oxygen species (ROS) and catalase and superoxide dismutase (SOD) activity in the supernatants of homogenates. In plasma, oxidative stress was evaluated by the levels of carbonyl proteins, total antioxidant capacity (TAC), iron reducing capacity (FRAP) and thiol groups. Myeloperoxidase (MPO) activity in plasma, colon and liver was determined to assess inflammation and plasma AST and ALT enzyme activity to assess liver damage. The morphological and morphometric analysis of the liver was performed through images of the region close to the central vein of the hepatic parenchyma, and of the colon through images of the colonic wall. Gluconeogenesis from lactate was evaluated using perfused livers.

RESULTS: Colitic rats showed evident macroscopic colonic damage and an increase in disease activity index (DIA), as well as a 20% reduction in body weight compared to the control. Regarding the oxidative stress of colitic rats, the levels of TBARS, a pro-oxidant marker, were 252% higher in the colon and not altered in the liver; ROS levels were 109% higher in the colon and 71% in the liver; catalase activity and GSH levels, two antioxidant markers, were decreased by 40% and 34% in the liver and 37% and 40% in the colon. MPO activity from colitic rats was about 100% higher in colon, liver and plasma, while levels of carbonyl proteins, a pro-oxidant marker, were 70% higher in plasma. Colitic animals showed lower plasma antioxidant capacity, as observed by reduced TAC (37%), FRAP (26%) and thiols (30%) compared to the control. Morphometric analysis revealed that colitic rats had a 20% reduction in area and a 7% increase in hepatocyte density, increased thickness in the distal colon of the tunica mucosa (20%), submucosa (136%) and total wall (21%). Colitic rats showed no change in neurons and glial cells of the myenteric plexus, while gluconeogenesis was decreased by 40% in the liver. In colitic animals, alpha-bisabolol at a dose of 50 mg/kg decreased distal colon weight (36%), disease activity index (45%), macroscopic score (50%), but did not prevent loss of body weight. It also decreased levels of colonic TBARS (35%), hepatic ROS

(35%) and MPO activity in liver (76%), plasma (47%) and colon (45%), while increasing SOD activity by 92% and catalase by 170% in the liver. In the plasma of colitic rats, alpha-bisabolol 50 mg/kg increased thiol levels by 22% and TAC by 50%, while in the colon, it increased glial cell density by 85% and hepatocyte area by 13%. Alpha-bisabolol at both doses increased hepatic gluconeogenesis in colitic animals to control levels, but the 200 mg/kg dose decreased this pathway in control animals. Likewise, alpha-bisabolol 200 mg/Kg increased oxidative stress in the liver and plasma of healthy animals, which indicates the absence of toxicity at this dose, even with anti-inflammatory activity in the colon and liver. Plasma AST and ALT enzymes were practically unmodified by either colitis or alpha-bisabolol treatment.

DISCUSSION AND CONCLUSION: At seven days after induction, colitic rats present increased infiltration of leukocytes in the colon and liver, increased oxidative stress in the colon and liver, altered morphometry of hepatocytes and colon wall and reduced gluconeogenesis in the liver. The latter must be the result of the increased oxidative stress and inflammation that occur in the organ. The hepatic manifestations of the disease occurred without alterations in the plasma markers of liver damage and the experimental model, therefore, was used, at least in part, to investigate the hepatic manifestations of colitis in IBD. Alpha-bisabolol orally administered to rats with TNBS-induced colitis for seven days at a dose of 50 mg/kg considerably reduced systemic, colonic and hepatic inflammation. In addition, it decreased systemic, colonic and hepatic oxidative stress, in the same way that it increased gluconeogenesis to the values found in healthy control rats. At a dose of 200 mg/Kg, alpha-bisabolol negatively modified hepatic metabolism and oxidative stress, which shows the absence of toxicity at this dose. Therefore, alpha-bisabolol at doses close to 50 mg/kg may be a good candidate as an adjuvant in the treatment of intestinal and hepatic manifestations of IBD.

KEY WORDS: hepatic metabolism, oxidative stress, distal colon, experimental colitis, alpha-bisabolol.

Tratamento com alfa-bisabolol reduz a inflamação do cólon distal em ratos com colite induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS)

Francielle Veiga Ramalho^a, Mariana Tofalini da Silva^a, Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi^a, Adelar Bracht^a, Jurandir Fernando Comar^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica – Universidade Estadual de Maringá, 87020900, Maringá, Brasil

Endereço para correspondência:

*Jurandir Fernando Comar

Departamento de Bioquímica

Universidade Estadual de Maringá

87020900 – Maringá, Brasil

E-mail: jfcomar@uem.br

RESUMO

O presente trabalho investigou os efeitos do tratamento com alfa-bisabolol sobre a morfologia e estado oxidativo do cólon distal em ratos com colite induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Ratos machos Wistar com 90 dias de idade foram induzidos à colite com TNBS e tratados com alfa-bisabolol durante 7 dias, sendo distribuídos em: ratos controles, controles tratados com alfa-bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/kg, ratos colíticos, e colíticos tratados com alfa-bisabolol nas mesmas doses. O cólon distal foi utilizado para análises histológica, imunohistoquímica e estresse oxidativo. Ratos colíticos apresentaram aumentado dano macroscópico e índice de atividade da doença, assim como peso corporal reduzido e peso do cólon distal aumentado. O estresse oxidativo esteve aumentado, mediante níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e espécies reativas de oxigênio (ROS), assim como marcadores de proteção antioxidante apresentaram redução, como a atividade da catalase e glutathiona reduzida. Houve também aumento na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), um marcador inflamatório, aumento da espessura das túnicas mucosa e submucosa, e da parede total do cólon distal e a manutenção na densidade dos neurônios e células da glia do plexo mioentérico. Os animais colíticos tratados com alfa-bisabolol 50 mg/kg, reduziram o peso do cólon distal, o índice de atividade da doença, o score macroscópico, os níveis de TBARS, MPO e aumentaram a densidade das células gliais mioentéricas. Porém, os animais colíticos tratados com 200 mg/kg, reduziram o peso corporal, os níveis de TBARS, a espessura da túnica submucosa e a atividade da MPO. Entretanto, os animais controles tratados na mesma dose apresentaram aumento nos níveis de TBARS e ROS. Diante disso, podemos concluir que o alfa-bisabolol como alternativa para tratamento de DII é eficaz de forma macro e microscópica, reduzindo o estresse oxidativo e inflamatório, entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para avaliar a dose a ser utilizada.

Palavras chave: alfa-bisabolol, colite, estresse oxidativo, cólon distal, inflamação.

ABSTRACT

The present work investigated the effects of alpha-bisabolol treatment on the morphology and oxidative status of the distal colon in rats with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced colitis. Male Wistar rats aged 90 days were induced to colitis with TNBS and treated with alpha-bisabolol for 7 days, being divided into: control rats, controls treated with alpha-bisabolol at doses of 50 and 200 mg/kg, colitic rats, and colitics treated with alpha-bisabolol at the same doses. The distal colon was used for histological, immunohistochemical and oxidative stress analyses. Colitic mice showed increased macroscopic damage and disease activity index, as well as reduced body weight and increased distal colon weight. Oxidative stress was increased, through levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and reactive oxygen species (ROS), as well as antioxidant protection markers were reduced, such as catalase activity and reduced glutathione. There was also an increase in the activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO), an inflammatory marker, an increase in the thickness of the mucous and submucosal tunics, and of the total wall of the distal colon, and the maintenance of the density of neurons and glial cells in the myenteric plexus. Colitic animals treated with alpha-bisabolol 50 mg/kg reduced distal colon weight, disease activity index, macroscopic score, TBARS, MPO levels and increased myenteric glial cell density. However, colitic animals treated with 200 mg/kg reduced body weight, TBARS levels, submucosal thickness and MPO activity. However, control animals treated at the same dose showed an increase in TBARS and ROS levels. In view of this, we can conclude that alpha-bisabolol as an alternative for the treatment of IBD is macro and microscopically effective, reducing oxidative and inflammatory stress, however, additional studies must be carried out to evaluate the dose to be used.

Keywords: alpha-bisabolol, colitis, oxidative stress, distal colon, inflammation.

Abreviações:

DII, doenças inflamatórias intestinais (DII); TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; SNE, sistema nervoso entérico; LPS, lipopolissacarídeos; ROS, espécies reativas de oxigênio; MPO, mieloperoxidase; NF- κ B, fator nuclear kappa B; PGE2, prostaglandinas E2; TNBS, ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico; IAD, índice de atividade da doença; PBS, tampão fosfato salina; H&E, hematoxilina e eosina; BSA, albumina de soro bovino; GSH, glutatona reduzida; OPT, o-ftalaldeído; DCFH-DA, 2'-7'-diclorofluoresceína-diacetato; DCF, 2,7-diclorofluoresceína; TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; DSS, dextran sulfato de sódio.

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são caracterizadas por inflamação gastrointestinal crônica e recorrente e estudos epidemiológicos demonstram aumento acentuado destas doenças no século 21, na Ásia e América Latina [1]. A colite ulcerativa e a Doença de Crohn são os principais exemplos de DII e estão associadas à redução da qualidade de vida e aumento dos custos com o sistema de saúde [1,2]. A etiologia das DII não é completamente conhecida, mas decorre uma resposta imune descontrolada contra antígenos bacterianos intestinais em indivíduos geneticamente predispostos [3].

A colite ulcerativa e a doença de Crohn são os dois tipos principais de DII. A colite ulcerativa afeta primariamente a mucosa do cólon, enquanto a doença de Crohn afeta a parede colônica inteira e pode atingir qualquer parte do trato gastrointestinal [4]. A fisiopatologia de ambas envolve um espessamento das túnicas intestinais desencadeada por citocinas pró-inflamatórias, particularmente interleucinas (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) [5,6]. A produção descontrolada destas citocinas estimula neutrófilos e macrófagos ativados a secretar espécies reativas de oxigênio e enzimas inflamatórias, que causam lesão tecidual por meio de hidrólise e oxidação de componentes teciduais, incluindo proteínas e lipídios de membrana [5,7]. Os biomarcadores de estresse oxidativo encontram-se aumentados nos sítios de inflamação intestinal de pacientes com DII e também de animais em modelos experimentais de colite [6,8,9].

A doenças gastrointestinais tem sido investigada e o papel do sistema nervoso entérico (SNE) tem se destacado na literatura. As DII podem afetar populações de neurônios e células gliais, levando a modificações na neurotransmissão e na atividade motora gastrointestinal [10]. Ratos colíticos apresentam redução da densidade celular de neurônios mioentéricos [11] e aumento na contratilidade no cólon distal [10].

O SNE é um sistema intrínseco ao trato gastrointestinal, constituído por rede de gânglios localizados na parede do tubo digestório, ligados por fibras nervosas. Os principais plexos ganglionados são: o plexo mioentérico, localizado entre as subcamadas musculares longitudinal externa e circular interna da túnica muscular, e o plexo submucoso localizado na túnica submucosa [12,13]. São compostos por neurônios sensoriais, motores e

interneurônios, e células da glia, que exercem um papel importante no controle da motilidade, proliferação celular, transporte de íons e liberação de hormônios [14].

Para minimizar os danos gerados pelas DII e tratar os sintomas, o uso de corticoides, aminossalicilatos, anticorpos anti-TNF e imunossupressores são amplamente utilizados [15]. Entretanto, os tratamentos convencionais mostram eficácia variável, efeitos colaterais e toxicidade a longo prazo [16]. Portanto, tratamentos complementares com auxílio de suplementação e antioxidantes são alternativas viáveis para conter o desconforto intestinal, a inflamação e os danos oxidativos mediados por radicais livres [9,17].

O alfa-bisabolol, alfa-4-dimetil-alfa-(4-metil-3-pentenil)-3-ciclohexeno-1-metanol, é um álcool sesquiterpênico monocíclico natural que é o principal constituinte do óleo essencial de camomila-vulgar (*Matricaria chamomilla*), correspondendo a mais de 50% do óleo essencial da mesma [18]. Diversas propriedades terapêuticas têm sido atribuídas ao alfa-bisabolol: atividade antitumoral, antimicrobiana, antifúngica, antinociceptiva, antioxidante e anti-inflamatória [19–23].

A atividade anti-inflamatória, entretanto, é a propriedade terapêutica mais estudada e de interesse para DII. A literatura demonstra este efeito em diversos modelos experimentais, com diminuição dos níveis de TNF- α e da migração de leucócitos induzida por carragenina em camundongos em modelo de pleurisia [22], inibição da produção de óxido nítrico e prostaglandina E2 (PGE2) induzidas por lipopolissacarídeos (LPS) em células RAW265.7 [21] e diminuição da inflamação e estresse oxidativo em modelo de lesão gástrica induzida por etanol [24].

Outros efeitos do alfa-bisabolol foram demonstrados em um estudo com extrato de camomila, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), mieloperoxidase (MPO), IL-6, fator nuclear kappa B (NF- κ B), TNF- α e PGE2 induzidas por LPS em segmento de cólon isolado de ratos, um modelo *ex vivo* de colite ulcerativa aguda. Neste estudo, os efeitos anti-inflamatórios do extrato de camomila foram atribuídos ao alfa-bisabolol, embora sem evidência experimental [25]. Formulações contendo extratos de camomila foram relacionadas a redução de sintomas inflamatórios em pacientes com DII [26,27].

A colite induzida pelo TNBS é uma abordagem experimental em ratos que promove uma intensa inflamação da mucosa com infiltração celular transmural que se assemelha à doença de Crohn humana [28–31].

Investigações acerca do modelo de colite experimental em ratos e os efeitos do alfa-bisabolol são necessários, pois pode se tornar uma opção de tratamento para o cenário atual das DII, utilizando dados morfológicos e do estado oxidativo de ratos, a fim de minimizar os danos causados pela colite. Portanto, o presente trabalho avaliou os efeitos do alfa-bisabolol sobre a morfologia e estado oxidativo do cólon distal no modelo de colite experimental em ratos.

2 METODOLOGIA

2.1 Indução da colite e tratamento

Ratos machos da linhagem Wistar com 90 dias de idade, foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas (DCM) em caixas de polipropileno em temperatura controlada de $22 \pm 3^\circ\text{C}$ com ciclos de iluminação claro e escuro de 12 horas. A alimentação foi fornecida através de ração balanceada (Nuvilab[®], Colombo, Brasil) e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em seis grupos de sete animais: C, ratos controle; CB50, ratos controle tratados com alfa-bisabolol 50 mg/kg; CB200, ratos controle tratados com alfa-bisabolol 200 mg/kg; Col, ratos colícticos induzidos por TNBS; ColB50, ratos colícticos tratados com alfa-bisabolol 50 mg/kg; ColB200, ratos colícticos tratados com alfa-bisabolol 200 mg/kg.

Para a indução da colite, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas com livre acesso à água. Posteriormente, sob anestesia de cetamina (90 mg/kg) e xilazina (9 mg/kg), os animais receberam por enema, 0,6 mL da solução contendo 0,3 ml de TNBS (15mg) em 0,3 ml de etanol 30% [28]. A aplicação foi em dose única, através de um cateter flexível de polietileno nº4, com diâmetro externo de 2 mm, inserido no cólon a 8 cm a partir do ânus, com os ratos de cabeça para baixo. A solução foi administrada lentamente e os animais mantidos nesta posição por 1 minuto após o término da aplicação, para evitar o refluxo da solução. Para o controle do modelo experimental, foi realizado o mesmo processo de indução, porém com salina 0,9%.

O alfa-bisabolol [(-)- α -Bisabolol, código 14462, Sigma-Aldrich] foi administrado diariamente pela manhã via oral diluído em veículo (3% de tween 80 em salina) durante 7 dias, a partir do dia da indução. As doses foram estipuladas conforme estudos prévios em roedores [20,22,24,32]. Os animais controles receberam apenas o veículo.

Todos os procedimentos foram realizados conforme recomendado pelo Conselho Brasileiro para Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) com número de protocolo 4439150318.

2.2 Avaliação de sinais clínicos

Após a indução da colite, foi verificada a massa corporal, sangramento retal e a consistência e ocorrência de sangue nas fezes dos ratos (Quadro 1), sendo pontuados de 0 a 3 de acordo com os critérios de Kim e colaboradores (2012) a fim de obter os dados para o cálculo do Índice de Atividade da Doença (IAD) [33].

Quadro 1. Critérios para escore da avaliação clínica dos animais pós-indução, para obtenção do índice de atividade da doença (IAD).

Score	Sangramento Retal	Consistência das Fezes	Sangue nas Fezes
0	Ausente	Normal	Ausente
1	Avermelhado	Pastosa	Vermelho
2	Vermelho	Muito pastosa	Vermelho escura
3	Vermelho intenso	Diarreia	Preto

[33]

2.3 Coleta e preparação dos tecidos

Os ratos foram profundamente anestesiados (cetamina 90 mg/kg + xilazina 9 mg/kg) e a cavidade peritoneal foi exposta cirurgicamente. O sangue foi coletado da veia cava e depositado em frascos com EDTA 20 mM.

Para a avaliação macroscópica da lesão: parte do segmento distal do cólon foi aberto por incisão longitudinal (na borda mesocólica) e fixado nas extremidades sobre uma placa de isopor e lavado delicadamente com solução salina 0,9%, para a remoção dos resíduos fecais. Os achados macroscópicos foram pontuados de acordo com o nível crescente de lesão e do estado dos animais, conforme expressos no Quadro 2 [34]. Estes segmentos foram reutilizados nas análises histológicas, pois o cólon distal não tem extensão suficiente para haver descarte.

Quadro 2. Critérios para escore macroscópico.

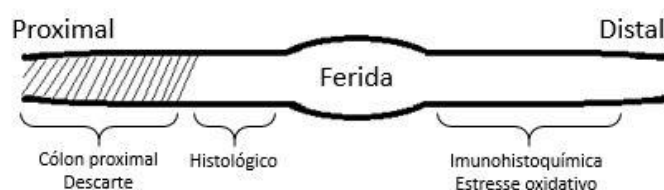
Escore	Achados macroscópicos
0	Sem danos
1	Hiperemia localizada sem ulcerações.
2	Ulcerações com pouca hiperemia e sem espessamento da parede.
3	Ulcerações com inflamação em apenas um local.

4	Dois ou mais sítios de ulceração e inflamação.
5	Dois ou mais sítios maiores de inflamação e ulceração, ou um sítio maior de inflamação e ulceração estendendo-se por mais que 1 cm de comprimento.
6-10	Se o dano for maior que 2 cm de comprimento, adiciona-se 1 ponto a cada cm envolvido a mais.
Mais	
0	Sem adesões intestinais
1	Com adesões intestinais

[34]

Para o processamento do cólon distal, foram padronizadas partes específicas e destinado para as técnicas, a fim de evitar regiões com a lesão tecidual nos animais colícticos. Já para animais controles, seguiu-se o mesmo padrão, descartando o centro do cólon distal e utilizando as extremidades. Para análise histológica foi extraída amostra da região após o cólon proximal e antes da ferida, cerca de 2,0 cm por amostra. Para a imunohistoquímica e estresse oxidativo foram extraídos a partir da região posterior à ferida, cerca de 5 cm. Este padrão de coleta está demonstrado na figura 1.

Figura 1: Representação esquemática dos locais padronizados do cólon distal de ratos colícticos destinados as seguintes técnicas: análise histológica e imunohistoquímica.



2.4 Análise histológica

As amostras de cólon distal foram fixadas em solução de Paraformaldeído 4% por 3 horas e armazenadas em álcool 70%. Posteriormente, foram desidratadas em gradiente de etanol, clareadas com xilol e embebidas em blocos de parafina. Cortes histológicos transversais semi-seriados com espessura de 5 µm foram feitos utilizando micrótomo rotativo (Leica RM2245) e montados em lâminas.

Lâminas com os cortes histológicos do cólon distal foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E), e imagens foram capturadas em objetiva de 40x em um microscópio óptico (Nikon Eclipse®, Shimjuku, Japão) acoplado à câmera de alta resolução (Nikon®, Ds-Fi1c, Shimjuku, Japão) utilizando o software NIS-Elements (versão 4.0, Praga, República Tcheca). A mensuração da profundidade das criptas orientadas longitudinalmente, espessura da túnica mucosa, túnica submucosa, túnica muscular e parede total foram estimadas em 90 sítios randômicos nos cortes histológicos por animal, utilizando o programa Image-Pro Plus® 4.5. Dados expressos em μm .

2.5 Análise imunohistoquímica

Amostras do cólon distal foram retiradas, lavadas com solução de PBS (0,1M, pH 7,4), preenchidas com paraformaldeído 4% (pH 7,4), amarradas em suas extremidades e submersas no mesmo fixador durante 3 horas em temperatura ambiente. Após este período, os segmentos foram lavados em PBS e armazenados na mesma solução acrescida de azida sódica 0.08% [35]. A microdissecção das amostras foi realizada sob estereomicroscópio com transiluminação para remoção da túnica mucosa e obtenção dos preparados totais da túnica muscular.

Recuperação antigênica: esta etapa foi realizada antes da imunofluorescência para expor sítios de ligação aos anticorpos. As membranas dos preparados totais da túnica muscular ficaram imersas em tubo falcon em uma solução contendo tampão acetato + tampão citrato + tween 20% + água destilada por 20 minutos em banho maria a 92°C. Imediatamente após este tempo, foram colocadas em eppendorf contendo PBS 1M e iniciou-se o protocolo de imunofluorescência.

Imunofluorescência: a análise da população neuronal geral (HuC/D⁺) e da glia mioentérica (S100⁺) foi realizada com dupla imunomarcagem utilizando o preparado total da túnica muscular. Para HuC/D⁺ foi utilizado anticorpo primário anti-HuC/D de camundongo (Invitrogen, USA) na diluição de 1:500 e anticorpo secundário Alexa Fluor 546 anti-camundongo na diluição de 1:500. Para S100⁺ foi utilizado anticorpo primário anti-S100 de coelho (Sigma, USA) na diluição de 1:500 e o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 anti-coelho na diluição de 1:500. Resumidamente, os preparados totais da túnica muscular

foram lavados em PBS (0,1 M, pH 7,4) com Triton X-100 0,5%. Posteriormente, foram imersos por 2 horas em uma solução de bloqueio. Os preparados totais foram incubados com os anticorpos primários por 48 horas em temperatura ambiente. Após a incubação, as membranas foram lavadas em PBS 0,1M e incubadas com os anticorpos secundários [36] por 2 horas em temperatura ambiente. Os preparados totais foram montados entre lâmina e lamínula com ProLong® Gold antifade (Invitrogen Molecular Probes).

Para a análise da população HuC/D⁺ e S100⁺ foi utilizado microscópio de fluorescência (Olympus FSX-100) e as imagens capturadas na objetiva de 10x por câmera de alta resolução. A contagem foi realizada por amostragem em 40 imagens por animal, capturadas aleatoriamente da circunferência do cólon distal, na região intermediária, que compreende o intervalo entre 60°-120° e 240-300°, e na região antimesocólica localizada entre 120 e 240°, todas considerando 0° a inserção da borda mesocólica [37]. A área total quantificada foi mensurada (5.73 mm²/animal) e os resultados expressos como neurônios/mm² e glia/mm², utilizando o sistema de análises de imagens Image Pró Plus® 4.5 (Media Cybernetics, Inc.).

2.6 Análise do estresse oxidativo

Um fragmento do cólon distal foi retirado, lavado com solução salina 0,9% e imediatamente clampeado em nitrogênio líquido e armazenado em -80°C até o momento do processamento. Para preparar o homogenato, utilizado no dia dos ensaios, o tecido congelado foi homogeneizado em homogeneizador van Potter-Elvehjem com na porção de 6 volumes de tampão fosfato de potássio (pH 7,4), e uma alíquota separada como homogenato total. O homogenato remanescente foi centrifugado a 9.800g/15 minutos em temperatura de 2-4°C e o sobrenadante separado como fração solúvel do homogenato.

Glutathiona reduzida (GSH): o conteúdo de GSH foi determinado por espectrofluorimetria (excitação em 350 nm e emissão em 420 nm), por meio do ensaio com o-ftalaldeído (OPT) [38], em amostras do homogenato. Os resultados foram calculados usando uma curva padrão preparada com GSH e os valores foram expressos em nmol/mg de proteínas do homogenato.

Espécies reativas de oxigênio (ROS): os níveis de ROS foram quantificados por espectrofluorimetria via 2,7-diclorofluoresceína diacetato

(DCFH-DA) conforme descrito previamente [39]. Este método quantifica a conversão do DCFH-DA para a molécula oxidada e fluorescente 2,7-diclorofluoresceína (DCF), na presença de esterases e espécies reativas de oxigênio. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteínas utilizando uma curva padrão preparada com DCF.

Peroxidação lipídica: ensaio para substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizada para avaliação da peroxidação lipídica. A quantidade de lipoperóxidos foi calculada a partir da curva padrão preparada com 1,1',3,3'-tetraetoxipropano e os valores foram expressos em nmol/mg proteína [40].

Atividade enzimática: a atividade da catalase foi estimada medindo alterações na absorbância a 240 nm, utilizando H₂O₂ como substrato e expressas como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteínas [41]. A atividade da MPO foi determinada por espectrofotometria utilizando o-dianisidina, no qual os resultados foram calculados a partir de $\epsilon=11300/\text{M}\cdot\text{cm}$ e valores expressos em nmoles/min.mg de proteína, conforme previamente descrito [42].

2.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos em gráficos e tabelas como média \pm erro padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism Software (versão 8.0). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Foi utilizado o teste t-student para análise em pares dos grupos Controle e Colite. A significância estatística dos dados paramétricos foi representada por ANOVA one-way e pós teste de Tukey e dados não paramétricos com Kruskal-Wallis e pós teste de Dunns. O nível de 5% ($p < 0.05$) foi adotado como critério de significância.

3 RESULTADOS

Inicialmente, foram analisados os parâmetros biométricos e sua relação com a colite experimental e com o tratamento com alfa-bisabolol. Estes dados estão expressos na Tabela 1. Os animais controles ganharam peso corporal. A colite experimental causou perda de peso corporal, reduzindo o peso final dos animais, ao 7º dia em 20%, comparado ao controle. O tratamento com alfa-bisabolol não preveniu os parâmetros de peso corporal. O cólon distal apresentou peso 200% maior nos animais colícticos ao compará-los com os controles. O alfa-bisabolol reduziu este peso em 36% com a dose de 50 mg/kg e 42% com a dose de 200 mg/kg, comparados ao colite sem tratamento. Não houve modificações no comprimento do cólon distal no modelo de colite e no tratamento com alfa-bisabolol, porém a largura do cólon apresentou-se reduzida nos animais tratados com 50 mg/kg, tanto nos animais controles (26%) quanto nos colícticos (18%).

Tabela 1: Parâmetros biométricos de peso corporal e medidas do cólon distal de ratos. C, ratos controle; Col, ratos colícticos induzidos por TNBS, e seus respectivos tratados com alfa-bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/kg (CB50; CB200; ColB50 e ColB200) por 7 dias.

	<i>Perda/ganho Peso corporal (%)</i>	<i>Peso final corporal (g): 7º dia</i>	<i>Comprimento do cólon (cm)</i>	<i>Largura do cólon (cm)</i>	<i>Peso do cólon (g)</i>
C	+6,4±2,6	332,6±7,8	7,31±0,1	1,5±0,04	1,1±0,08
CB50	+4,6±1,8	362,4±3,9	7,50±0,3	1,1±0,08 ^a	1,0±0,10
CB200	+3,3±1,5	357,0±11,3	7,51±0,4	1,3±0,08	1,2±0,08
Col	-14,8±3,8*	263,7±11*	7,10±0,2	1,6±0,03	3,3±0,2*
ColB50	-12,4±1,8	266,9±9,2	7,10±0,2	1,3±0,03 ^{bc}	2,1±0,1 ^b
ColB200	-11,8±1,0	260,0±2,3	7,12±0,2	1,8±0,13	1,9±0,1 ^b

Dados representados em média ± erro padrão de sete animais. Análise de variância One-Way ANOVA, pós teste de Tukey, sendo ^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Col; ^cp<0,05 vs CB50; ^dp<0,05 vs ColB50. Teste t-student sendo *p<0,05 vs C.

Ao avaliar os danos macroscópicos característicos do modelo experimental, o índice de atividade da doença (Figura 2-A), mensurado através da massa corporal e observações da consistência e presença de sangue nas fezes, foi maior nos animais colícticos e o tratamento com 50 mg/kg amenizou este parâmetro reduzindo em 45%, padrão este que também foi observado ao avaliar a lesão (Figura 2-B), onde os animais colícticos apresentaram elevado score total enquanto que o tratamento com 50 mg/kg reduziu este score em 50%. A dose de 200 mg/kg nos animais colícticos, nas duas avaliações citadas

acima não apresentaram redução significativa se comparados ao colite sem tratamento.

A imagem C (Figura 2-C) refere-se às aderências causadas pela colite experimental, onde foi observado aderências com o rim (r), com o tecido adiposo (ta), com o baço (b) e com o intestino delgado (id). O conjunto de imagens representado em D (Figura 1-D) apresenta os diferentes níveis de lesão ocasionada pela colite experimental com e sem tratamento, comparada com o cólon distal do animal controle sem lesão.

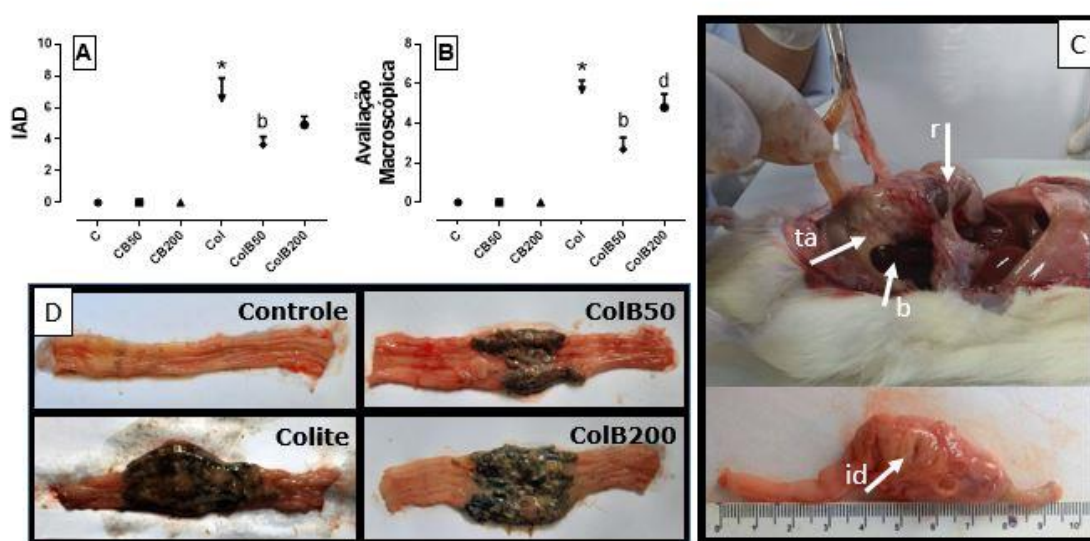


Figura 2: Índice de atividade da doença (A) avaliado através da massa corporal e observações das fezes dos ratos. **Score de avaliação macroscópica da lesão (B)** avaliada a partir de ocorrências como hiperemia, ulcerações, aderências e espessamento de parede intestinal. **Aderências (C)** no rim (r), tecido adiposo (ta), baço (b) e intestino delgado (id). **Imagens representativas do cólon distal de ratos (D)** com lesão tecidual nos diferentes grupos, comparados ao controle sem lesão. Grupos: C: controle, Col: colíticos induzidos por TNBS, e seus respectivos tratados por 7 dias com alfa-bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/kg (CB50; CB200; ColB50 e ColB200). Valores expressos em média \pm erro padrão de sete animais. Análise de variância One-Way ANOVA, pós teste de Tukey, sendo ^b $p < 0,05$ vs Col, ^d $p < 0,05$ vs ColB50. Teste t-student * $p < 0,05$ vs C.

A morfologia do cólon distal está representada em fotomicrografias de cada grupo na Figura 3 e a análise morfométrica está expressa na Tabela 2. Os animais colíticos apresentaram aumento na espessura de 20% na túnica mucosa, de 136% na submucosa, e consequentemente aumento de 21% na parede total (comparados ao controle). A profundidade da cripta e a espessura da túnica muscular não sofreu alteração pela colite experimental.

O tratamento com alfa-bisabolol nos animais controles também aumentou a espessura da túnica submucosa em 143% com a dose de 50mg/kg e 102% com a dose de 200 mg/kg. Da mesma maneira que houve aumento nos animais controle tratados com 50mg/kg na espessura da túnica muscular (92%) e parede total (40%), comparados ao controle. A profundidade de cripta e espessura da túnica mucosa não apresentaram alterações.

Os animais colíticos tratados com 200 mg/kg apresentaram redução na espessura da submucosa em 15%, aumento da espessura da túnica muscular na dose de 50 mg/kg em 28%, e aumento da parede total na dose de 50mg/kg em 30%. Não houve interferências com o tratamento nos animais colíticos ao observar a profundidade de criptas e a espessura da túnica mucosa.

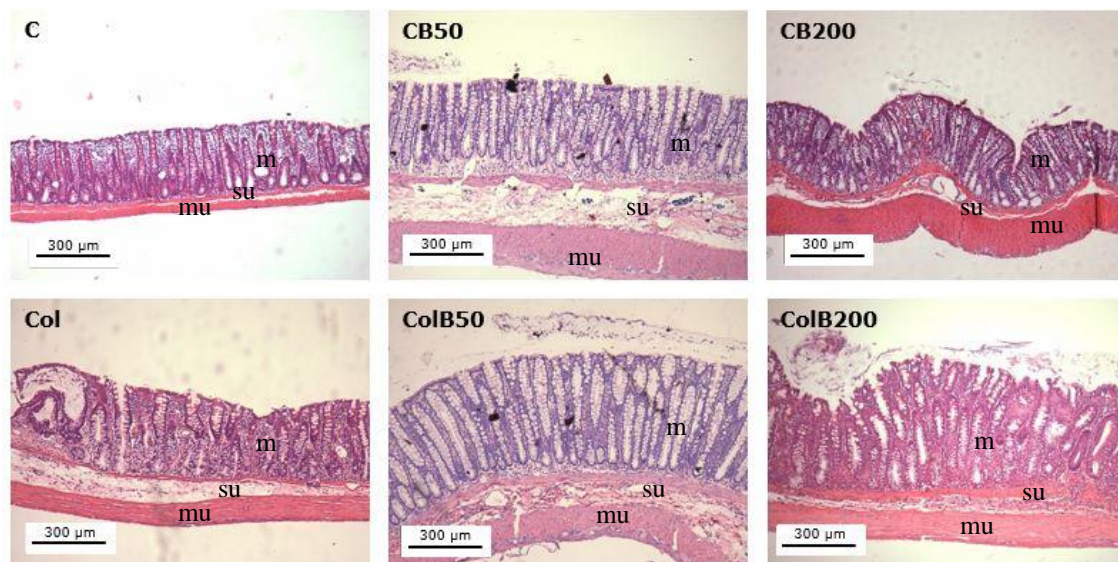


Figura 3: Fotomicrografia do cólon distal de ratos, corado com H&E. Grupos: controle (C) e colíticos (Col) e seus respectivos tratados com alfa bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/kg por 7 dias, (CB50, ColB50, CB200 e ColB200). Barra de calibração 300μm. m: túnica mucosa, su: túnica submucosa, mu: túnica muscular.

Tabela 2: Morfometria do cólon distal de ratos: profundidade de criptas (Cr), espessura de túnica mucosa (Muc), submucosa (Sub), muscular (Mus) e parede total (PT) de ratos controle (C) e colíticos (Col), e seus respectivos tratamentos com alfa bisabolol nas doses de 50 (CB50) e 200 (CB200) mg/kg por 7 dias.

	Cr (μm)[#]	Muc (μm)^{&}	Subm (μm)[#]	Mus (μm)[#]	PT (μm)[#]
<i>C</i>	242,8±12,78	314,7±20,05	39,00±2,93	93,34±11,40	445,2±28,8
<i>CB50</i>	284,7±14,77	363,8±12,55	134,9±19,9 ^a	179,4±13,4 ^a	627,6±15,3 ^a
<i>CB200</i>	257,7±16,77	355,2±21,13	118,6±11,1 ^a	134,2±6,78	576,4±38,6
<i>Col</i>	272,9±11,82	383,2±8,38 [*]	92,33±11,5 [*]	123,9±18,65	540,6±28,8 [*]
<i>ColB50</i>	276,3±9,01	412,6±13,57	119,0±10,58	158,9±10,9 ^b	706,4±20,3 ^b
<i>ColB200</i>	301,3±17,76	421,1±19,34	78,45±8,99 ^d	142,0±9,56	618,6±30,3

Dados representados em média \pm erro padrão de seis animais. [&]Análise de variância One-Way ANOVA, pós teste de Tukey. [#]Kruskall-Wallis, pós teste de Duns. ^ap<0,05 vs C; ^bp<0,05 vs Col; ^dp<0,05 vs ColB50. Teste t-student sendo ^{*}p<0,05 vs C.

A fim de avaliar se de fato o modelo causou um processo inflamatório, foi realizado a análise da atividade da enzima MPO como marcador inflamatório e em adição, alterações morfológicas foram descritas. A Figura 4 demonstra a atividade da MPO, assim como fotomicrografias representativas do cólon distal de ratos controle e colíticos.

A inflamação foi evidenciada pelo aumento de 108% na atividade da MPO, sendo prevenido este resultado ao tratar os animais colíticos com as duas doses. Ao comparar o cólon distal de um animal controle (Figura 4-A) com de um animal colítico (Figura 4-B,C,D), foram encontradas alterações causadas pelo modelo inflamatório, como por exemplo, a desorganização na arquitetura colônica, com distorções e por vezes ausência de criptas em (B,C), a presença de infiltrado com células inflamatórias na lâmina própria em (C-seta) e no plexo mioentérico em (D-seta).

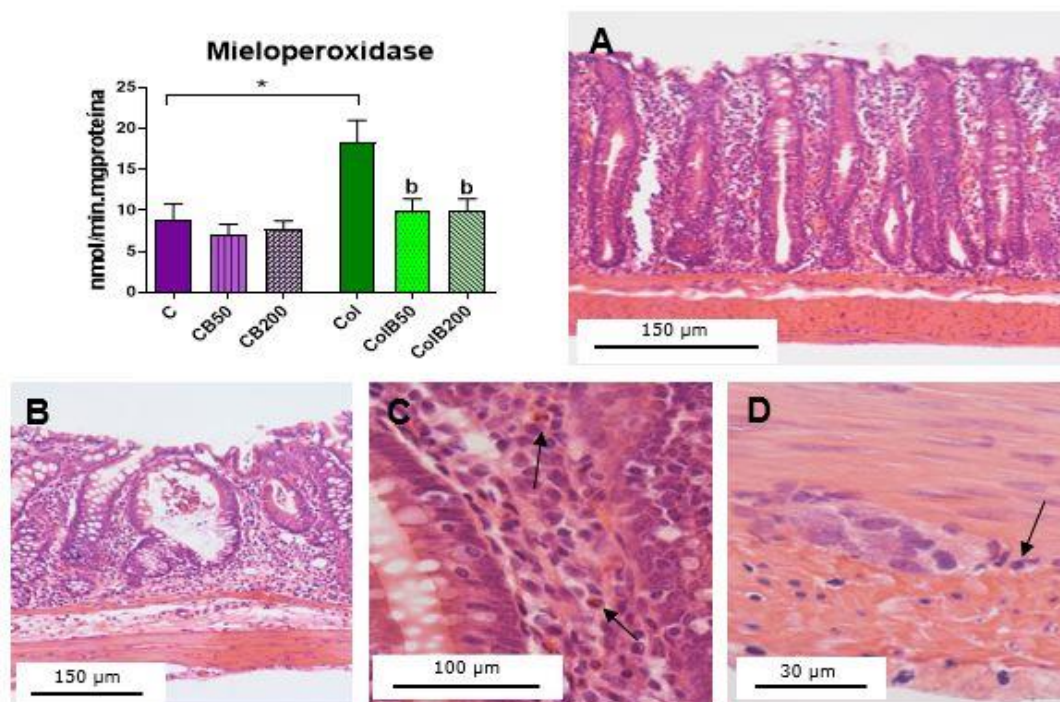


Figura 4: Marcador inflamatório e fotomicrografia representativa do cólon distal de ratos. Atividade da enzima Mieloperoxidase nos ratos controle (C) e colíticos (Col) e seus respectivos tratados com alfa-bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/kg por 7 dias, (CB50, CoIB50, CB200 e CoIB200). Dados representados em média \pm erro padrão de seis animais. Teste t-student $*p < 0,05$ para diferença entre C e Col. ANOVA one way e pós teste de Tukey: $^b p < 0,05$ vs Col. Fotomicrografias coradas com H&E, controle em (A); desarranjo na arquitetura, distorções e por vezes ausência de criptas em rato colítico em (B,C); presença de células inflamatórias na lâmina própria em (C-seta) e no plexo mioentérico em (D-seta). Barra de calibração: A e B em 150 μm , C em 100 μm e D em 30 μm .

Além disso, foi realizado a imunohistoquímica no plexo mioentérico do cólon distal. Foi observado manutenção na densidade dos neurônios dos animais controle e colíticos, apenas os animais controle tratados com 200 mg/kg reduziram em 26% se comparados com o tratamento na menor dose. A glia entérica também manteve a densidade entre os animais controles e colíticos. Entretanto, o alfa-bisabolol 50 mg/kg aumentou o número de Células da Glia por mm^2 tanto nos controles (93%) comparado ao controle sem tratamento, quanto nos colíticos (86%) comparado ao colítico sem tratamento.

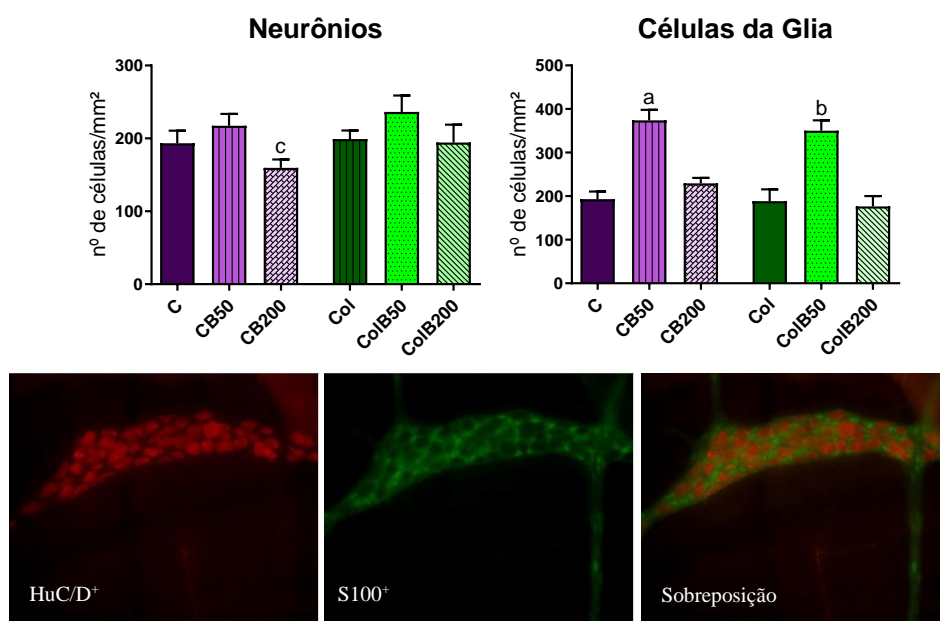


Figura 5: Densidade de Neurônios mioentéricos e Células da Glia no cólon distal de ratos. Imunohistoquímica do preparado de membrana total para neurônios (HuC/D⁺ - vermelho) e células da glia (S100⁺ - verde). Grupos: controle (C) e colíticos (Col) e seus respectivos tratados com alfa-bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/kg por 7 dias, (CB50, ColB50, CB200 e ColB200). Dados representados em média \pm erro padrão de seis animais. Células da Glia: Kruskal-Wallis, pós teste de Duns. Neurônios: análise de variância One-Way ANOVA, pós teste de Tukey. ^a $p < 0,05$ vs C; ^b $p < 0,05$ vs Col; ^c $p < 0,05$ vs CB50.

O estado oxidativo e antioxidante está representado na Figura 2. O estresse oxidativo foi confirmado nos animais colíticos pelo aumento de 252% na peroxidação lipídica através do ensaio TBARS, e aumento de 109% das ROS em comparação ao controle (C). O tratamento com alfa-bisabolol na dose de 200mg/kg nos animais controles aumentou os dois parâmetros (TBARS-207% e ROS-75%), enquanto que, nos animais colíticos, o tratamento nas duas doses foi efetivo ao reduzir apenas o TBARS. Os animais colíticos apresentaram redução na defesa antioxidante não enzimática (GSH-40%) e enzimática (catalase-37%), e o tratamento não atenuou estes parâmetros.

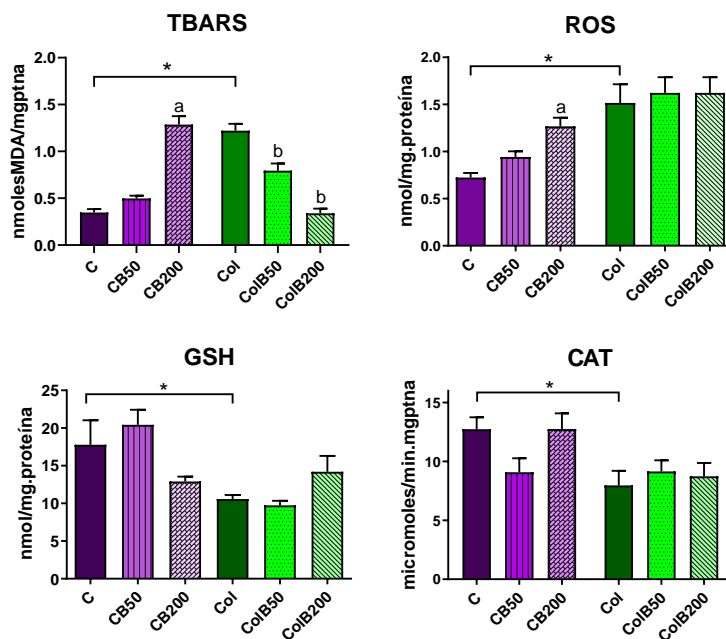


Figura 2 : Efeito da colite experimental e do tratamento com alfa-bisabolol sobre marcadores oxidativos e antioxidantes do cólon distal de ratos. Grupos: C: controle, Col: colícticos induzidos por TNBS, e seus respectivos tratados com alfa bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/kg (CB50; CB200; ColB50 e ColB200) por 7 dias. Dados representados em média \pm erro padrão de seis animais. Análise de variância One-Way ANOVA, pós teste de Tukey, ^a $p < 0,05$ vs C; ^b $p < 0,05$ vs Col. Teste t-student sendo $*p < 0,05$ vs C.

4 DISCUSSÃO

O modelo experimental de colite induzida por TNBS foi avaliado após 7 dias e o efeito do alfa-bisabolol 50 e 200 mg/kg administrado oralmente durante este período também foi avaliado e comparado com os animais sem tratamento.

Diarreia severa com sangramento retal é uma característica importante para diagnosticar uma DII, utilizada no score do IAD [33,43]. Esta diarreia pode estar relacionada com distorções na arquitetura intestinal, com hiperemia, ulcerações e aderência à órgãos adjacentes, alterando a absorção de nutrientes e consequentemente levando a perda de peso corporal, como observado no presente trabalho. Além disso, o estado inflamatório também pode estar associado, como observado em nosso trabalho pelo aumento da atividade da enzima MPO e achados de infiltrados inflamatórios na mucosa do cólon distal. Nossos resultados corroboram trabalhos que demonstram o aumento da atividade da MPO em cólon e plasma de ratos colíticos [31,44].

De fato, o estado inflamatório pode causar danos macroscópicos, como por exemplo as lesões no cólon distal que foram observadas no nosso trabalho, inclusive esta lesão pode refletir diretamente nas células da parede colônica e alcançar outros componentes intestinais, como por exemplo o SNE. A Doença de Crohn é caracterizada por infiltração transmural de células inflamatórias, àquela que penetra nos gânglios do sistema nervoso entérico [4]. Este achado também foi observado pelo nosso estudo, nos gânglios mioentéricos presentes no cólon distal de animais com colite experimental. Outros trabalhos demonstram que modelo de lesão induzida por TNBS no íleo possui eosinófilos no plexo mioentérico e submucoso após 3, 6 e 24h da indução, e presença na lâmina própria após 3, 6 e 24 horas se mantendo até 7 dias após a indução [45].

A população geral neuronal do SNE dos animais controles e colíticos apresentaram manutenção quanto a densidade de neurônios no nosso trabalho. Dora e colaboradores (2021) investigaram a barreira mioentérica que se localiza ao redor dos gânglios do plexo mioentérico e relatam que ela é composta por proteínas da matriz extracelular e prolongamentos finais gliais. Os autores demonstram e explicam que a inflamação causada na colite experimental induzida por DSS pode causar rompimento na barreira

ganglionar, porém este fato não alterou a densidade neuronal mioentérica no cólon distal de camundongos [46]. Este trabalho sugere que a manutenção encontrada no nosso estudo pode ser devido a função de proteção glial formando barreira ao redor do gânglio.

Esta manutenção neuronal e possivelmente a proteção glial também pode ser explicada se levarmos em consideração as funções principais das células da glia, que é o suporte neuronal, a regulação da neurotransmissão e a liberação de citocinas [47]. Acrescentando a este fato, sabe-se que em quadros inflamatórios intestinais, as células gliais estão relacionadas com alterações na função motora, principalmente quando refere-se à constipação [48]. Estes pontos são de extrema relevância pois no presente trabalho obtivemos aumento da densidade das células gliais, aumento da espessura da túnica muscular e redução no IAD nos animais tratados com alfa-bisabolol na dose de 50 mg/kg. Embora o quadro de colite experimental desencadeie diarreia, podemos inferir que o tratamento fez com que os efeitos que causariam a constipação, no caso do presente trabalho, apenas atenuassem a diarreia, com participação ativa da túnica muscular e células do sistema nervoso entérico, levando a um menor score de IAD.

No que se refere a análise morfométrica do cólon distal, os animais colíticos apresentaram aumento da espessura da túnica submucosa, da mucosa e conseqüentemente da parede total. Estes resultados estão de acordo com o aumento da atividade da enzima MPO, pois com a inflamação acentuada, a túnica submucosa, que é constituída principalmente por tecido conjuntivo, apresentou muitas células inflamatórias, causando maior edema no local e aumentando a sua espessura. Dados estes também encontrados por Gonçalves e colaboradores, e atribuídos à presença de infiltrados inflamatórios e edema local [29].

A alteração de vasos sanguíneos decorrente da patologia, na qual vasos originários da submucosa penetram na túnica muscular em direção a serosa, está associada aos estágios crônicos das DII e favorecem a permeabilidade vascular [49]. A integridade da barreira intestinal é o que protege o organismo de invasões bacterianas e influxo de células inflamatórias, que por vezes, alcançam outros órgãos, podendo causar alterações no estado inflamatório e oxidativo [50].

O estresse oxidativo no cólon distal esteve aumentado nos animais colíticos mediante análise da peroxidação lipídica e das espécies reativas de oxigênio. Injúria oxidativa já foi descrita em modelo de colite induzida por TNBS [51]. Na colite experimental, neutrófilos ativados favorecem a produção de ROS, que são altamente reativas. Quando são gerados próximos às membranas celulares, prejudicam a bicamada lipídica, causando a lipoperoxidação. Portanto ocorre uma reação em cadeia, onde o quadro inflamatório aumenta a quantidade de neutrófilos, que produzem mais ROS e causam o dano tecidual nos lipídios de membrana [7].

Este desequilíbrio no estado oxidativo provavelmente estaria relacionado com o sistema antioxidante endógeno, no qual foram observados níveis baixos de GSH e catalase no homogenato do cólon distal dos animais colíticos. Essa redução na proteção antioxidante também está descrita em estudos com cólon de ratos colíticos [51,52].

Ao utilizar o alfa-bisabolol, encontramos resultados no estresse oxidativo, reduzindo os níveis de TBARS, na proteção antioxidante, melhorando os níveis de GSH e catalase e na inflamação, conforme redução da MPO.

Especificamente nos animais colíticos, a dose de 50 mg/kg foi capaz de reduzir o peso do cólon distal, os achados macroscópicos de lesão e o score IAD, a atividade da MPO e os níveis de TBARS, além de aumentar a espessura da túnica muscular e a densidade das células gliais mioentéricas. Enquanto que a dose de 200 mg/kg reduziu o peso do cólon, a espessura da túnica submucosa, a atividade da MPO e os níveis de TBARS. Entretanto, esta mesma dose, nos animais controles, aumentou os níveis de TBARS e ROS no cólon.

Um trabalho recente e inédito demonstra o efeito do alfa-bisabolol diretamente no cólon de animais colíticos, e aponta o efeito protetor na arquitetura intestinal, redução da atividade da enzima MPO, prevenção do aumento dos mediadores inflamatórios COX-2 e iNOS, prevenção do aumento de nitrito e redução das citocinas pró inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-17A [23].

Dados da literatura sugerem que o ideal seja um tratamento realizado preventivamente, antes do quadro grave de colite [53]. Nosso estudo utilizou o tratamento com alfa-bisabolol concomitantemente à evolução da doença, o que o caracteriza como preventivo. Neste contexto, o potencial do alfa-

bisabolol sugere uma melhora no quadro oxidativo e inflamatório ao utilizar a dose de 50 mg/kg.

5 CONCLUSÃO

Os dados deste estudo indicaram que a colite experimental induzida por TNBS em ratos causou aumento no estresse oxidativo, na inflamação tecidual e redução na proteção antioxidante endógena, bem como infiltrados inflamatórios na lâmina própria e no plexo mioentérico, e desarranjo na arquitetura colônica. O tratamento com alfa-bisabolol 50mg/kg na condição colítica foi capaz de reduzir os níveis de peroxidação lipídica, a inflamação tecidual e as úlceras. Além disso, as células gliais entéricas estavam em maior densidade, assim como a túnica muscular se apresentou mais espessa, o que provavelmente causou proteção aos neurônios do gânglio mioentérico. Estes dados sugerem que o alfa-bisabolol é eficaz ao tratar a colite de forma macro e microscópica, entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para reforçar os benefícios do tratamento, inclusive avaliando a dose a ser utilizada.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

6 REFERÊNCIAS

- 1 Ananthakrishnan AN, Kaplan GG, Ng SC. Changing Global Epidemiology of Inflammatory Bowel Diseases: Sustaining Health Care Delivery Into the 21st Century. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020;18(6):1252–60.
- 2 Park KT, Bass D. Inflammatory bowel disease-attributable costs and cost-effective strategies in the United States: A review. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(7):1603–9.
- 3 Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host–microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2012 Nov;491(7422):119–24.
- 4 Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet.* 2007;369(9573):1641–57.
- 5 Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev.* 2014;94(2):329–54.
- 6 Iborra M, Moret I, Rausell F, Bastida G, Aguas M, Cerrillo E, et al. Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn’s disease. *Biochem Soc Trans.* 2011;39(4):1102–6.
- 7 Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis. *J Clin Biochem Nutr.* 2007;41(1):18–26.
- 8 Liu X, Wang J. Anti-inflammatory effects of iridoid glycosides fraction of *Folium syringae* leaves on TNBS-induced colitis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2011;133(2):780–7.
- 9 Zhu H, Li YR. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: Updated experimental and clinical evidence. *Exp Biol Med.* 2012;237(5):474–80.
- 10 Souza RF, Evangelinellis MM, Mendes CE, Righetti M, Lourenço MCS, Castelucci P. P2X7 receptor antagonist recovers ileum myenteric neurons after experimental ulcerative colitis. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2020;11(4):84–103.
- 11 Shang B, Shi H, Wang X, Guo X, Wang N, Wang Y, et al. Protective

- effect of melatonin on myenteric neuron damage in experimental colitis in rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2016;30(2):117–27.
- 12 Furness JB. The enteric nervous system: Normal functions and enteric neuropathies. *Neurogastroenterol Motil*. 2008;20(SUPPL. 1):32–8.
 - 13 Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(5):286–94.
 - 14 Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst*. 2000;81(1–3):87–96.
 - 15 Danese S. New therapies for inflammatory bowel disease: From the bench to the bedside. *Gut*. 2012;61(6):918–32.
 - 16 Kim CJ, Kovacs-Nolan JA, Yang C, Archbold T, Fan MZ, Mine Y. L-Tryptophan exhibits therapeutic function in a porcine model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *J Nutr Biochem*. 2010;21(6):468–75.
 - 17 Marion-Letellier R, Savoye G, Beck PL, Panaccione R, Ghosh S. Polyunsaturated fatty acids in inflammatory bowel diseases: A reappraisal of effects and therapeutic approaches. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(3):650–61.
 - 18 Kamatou GPP, Viljoen AM. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *JAOCS, J Am Oil Chem Soc*. 2010;87(1):1–7.
 - 19 Braga PC, Dal Sasso M, Fonti E, Culici M. Antioxidant activity of bisabolol: Inhibitory effects on chemiluminescence of human neutrophil bursts and cell-free systems. *Pharmacology*. 2009;83(2):110–5.
 - 20 De O. Leite G, Leite LHI, De S. Sampaio R, Araruna MKA, De Menezes IRA, Da Costa JGM, et al. (-)- α -Bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice. *Fitoterapia*. 2011;82(2):208–11.
 - 21 Kim S, Jung E, Kim JH, Park YH, Lee J, Park D. Inhibitory effects of (-)- α -bisabolol on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(10):2580–5.
 - 22 Barreto RSS, Quintans JSS, Amarante RKL, Nascimento TS, Amarante RS, Barreto AS, et al. Evidence for the involvement of TNF- α and IL-1 β

- in the antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl. (Lamiaceae) essential oil and (-)- α -bisabolol, its main compound, in mice. *J Ethnopharmacol.* 2016;191:9–18.
- 23 Venkataraman B, Almarzooqi S, Raj V, Dudeja PK, Bhongade BA, Patil RB, et al. α -Bisabolol Mitigates Colon Inflammation by Stimulating Colon PPAR- γ Transcription Factor: In Vivo and In Vitro Study. *PPAR Res.* 2022 Apr;2022:1–22.
 - 24 Rocha NFM, Oliveira GV De, Araújo FYR De, Rios ERV, Carvalho AMR, Vasconcelos LF, et al. (-)- α -Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. *Eur J Pharm Sci.* 2011;44(4):455–61.
 - 25 Menghini L, Ferrante C, Leporini L, Recinella L, Chiavaroli A, Leone S, et al. An Hydroalcoholic Chamomile Extract Modulates Inflammatory and Immune Response in HT29 Cells and Isolated Rat Colon. *Phyther Res.* 2016;(March):1513–8.
 - 26 Langhorst J, Varnhagen I, Schneider SB, Albrecht U, Rueffer A, Stange R, et al. Randomised clinical trial: A herbal preparation of myrrh, chamomile and coffee charcoal compared with mesalazine in maintaining remission in ulcerative colitis - A double-blind, double-dummy study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;38(5):490–500.
 - 27 Albrecht U, Müller V, Schneider B, Stange R. Efficacy and safety of a herbal medicinal product containing myrrh, chamomile and coffee charcoal for the treatment of gastrointestinal disorders: A non-interventional study. *BMJ Open Gastroenterol.* 2014;1(1):1–7.
 - 28 Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology.* 1989 Mar;96(3):795–803.
 - 29 Gonçalves CCM, Hernandez L, Bersani-Amado CA, Franco SL, Silva JFDS, Natali MRM. Use of propolis hydroalcoholic extract to treat colitis experimentally induced in rats by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2013;2013. DOI: 10.1155/2013/853976
 - 30 Besson JCF, de Carvalho Picoli C, Matioli G, Natali MRM. Methyl

- jasmonate: a phytohormone with potential for the treatment of inflammatory bowel diseases. *J Pharm Pharmacol*. 2018;70(2):178–90.
- 31 Vicentini FA, Barbosa MMC, Fortunato MC, Amado CAB, Comar JF, Longhini R, et al. Treatment with *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction improves healing and reduces oxidative stress in TNBS-induced colitis in rats. *Biomed Pharmacother*. 2018;107(July):194–202.
- 32 Oliveira F de S, Freitas TS de, Cruz RP da, Costa M do S, Pereira RLS, Quintans-Júnior LJ, et al. Evaluation of the antibacterial and modulatory potential of α -bisabolol, β -cyclodextrin and α -bisabolol/ β -cyclodextrin complex. *Biomed Pharmacother*. 2017;92:1111–8.
- 33 Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, Khan WI. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J Vis Exp*. 2012;(60):1–6.
- 34 Appleyard CB, Wallace JL. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. *Am J Physiol Liver Physiol*. 1995 Jul;269(1):G119–25.
- 35 Rissato DF, de Santi Rampazzo AP, Borges SC, Sousa FC, Busso C, Buttow NC, et al. Chronic ingestion of deoxynivalenol-contaminated diet dose-dependently decreases the area of myenteric neurons and gliocytes of rats. *Neurogastroenterol Motil*. 2020;32(4):1–13.
- 36 Cirilo CP, Schoffen JPF, de Santi-Rampazzo AP, Zapater MCVU, Vicentini FA, Comar JF, et al. Dietary restriction interferes with oxidative status and intrinsic intestinal innervation in aging rats. *Nutrition*. 2013;29(4):673–80.
- 37 Sant’ana DMG, Miranda-Neto MH, Molinari SL, Sant’anna MA. Neuron number in the myenteric plexus of the ascending colon of rats: a comparative study using two staining techniques. *Arq Neuropsiquiatr*. 1997 Sep;55(3A):460–6.
- 38 Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976 Jul;74(1):214–26.
- 39 Rodrigues Siqueira I, Fochesatto C, da Silva Torres IL, Dalmaz C, Alexandre Netto C. Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats. *Life Sci*. 2005

- Dec;78(3):271–8.
- 40 Buege JA, Aust SD. Biomembranes - Part C: Biological Oxidations. *Methods Enzymol.* 1978;52:302–10.
- 41 Bergmeyer HU. *Methods of enzymatic analysis.* Weinheim: Academic Press; 1974.
- 42 Bradley P, Christensen R, Rothstein G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood.* 1982 Sep;60(3):618–22.
- 43 El-Akabawy G, El-Sherif NM. Zeaxanthin exerts protective effects on acetic acid-induced colitis in rats via modulation of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress. *Biomed Pharmacother.* 2019;111(August 2018):841–51.
- 44 Bastaki SMA, Adeghate E, Amir N, Ojha S, Oz M. Menthol inhibits oxidative stress and inflammation in acetic acid-induced colitis in rat colonic mucosa. *Am J Transl Res.* 2018;10(12):4210–22.
- 45 Pontell L, Castelucci P, Bagyánszki M, Jovic T, Thacker M, Nurgali K, et al. Structural changes in the epithelium of the small intestine and immune cell infiltration of enteric ganglia following acute mucosal damage and local inflammation. *Virchows Arch.* 2009;455(1):55–65.
- 46 Dora D, Ferenczi S, Stavely R, Toth VE, Varga Z V., Kovacs T, et al. Evidence of a Myenteric Plexus Barrier and Its Macrophage-Dependent Degradation During Murine Colitis: Implications in Enteric Neuroinflammation. *Cmgh.* 2021;12(5):1617–41.
- 47 Neunlist M, Rolli-Derkinderen M, Latorre R, Van Landeghem L, Coron E, Derkinderen P, et al. Enteric glial cells: Recent developments and future directions. *Gastroenterology.* 2014;147(6):1230–7.
- 48 Bassotti G, Villanacci V, Fisogni S, Rossi E, Baronio P, Clerici C, et al. Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: Introducing the neuro-gliopathies. *World J Gastroenterol.* 2007;13(30):4035–41.
- 49 Jerkic M, Peter M, Ardelean D, Fine M, Konerding MA, Letarte M. Dextran sulfate sodium leads to chronic colitis and pathological

- angiogenesis in endoglin heterozygous mice. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(11):1859–70.
- 50 Trivedi PP, Jena GB. Ulcerative colitis-induced hepatic damage in mice: Studies on inflammation, fibrosis, oxidative DNA damage and GST-P expression. *Chem Biol Interact*. 2013;201(1–3):19–30.
- 51 Barbosa MMC, Vicentini FA, Castro-Ghizoni C V., Lameira OA, Sa-Nakanishi AB, Bracht L, et al. Copaiba Oil Decreases Oxidative Stress and Inflammation But not Colon Damage in Rats with TNBS-Induced Colitis. *Endocrine, Metab Immune Disord - Drug Targets*. 2018;18(3):268–80.
- 52 Guazelli CFS, Fattori V, Ferraz CR, Borghi SM, Casagrande R, Baracat MM, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of hesperidin methyl chalcone in experimental ulcerative colitis. *Chem Biol Interact*. 2021;333(October 2020):109315.
- 53 Sugimoto K, Hanai H, Tozawa K, Aoshi T, Uchijima M, Nagata T, et al. Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Gastroenterology*. 2002;123(6):1912–22.

Modificações metabólicas no fígado de ratos com colite induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS): efeitos do tratamento com alfa-bisabolol

Francielle Veiga Ramalho¹, Mariana Tofalini da Silva¹, Anacharis B. Sá-Nakanishi¹, Adelar Bracht¹, Jurandir F. Comar^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil

Endereço para correspondência:

*Jurandir Fernando Comar

Departamento de Bioquímica

Universidade Estadual de Maringá

87020900 Maringá, Brasil

E-mail: jfcomar@uem.br

RESUMO

O presente estudo investigou se a inflamação, o estresse oxidativo e a gliconeogênese hepática estavam alterados em ratos com colite induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Este estudo também investigou a ação do alfa-bisabolol sobre estas manifestações sistêmicas e hepáticas de ratos controles e colíticos. A colite experimental em ratos que compartilha muitas características com as doenças inflamatórias intestinais (DII), particularmente a colite ulcerativa e a doença de Crohn. Para tanto, ratos Wistar foram distribuídos em: ratos controles, controles tratados com alfa-bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/kg, ratos colíticos, e colíticos tratados com alfa-bisabolol nas mesmas doses. O alfa-bisabolol ou veículo foram oralmente administrados por sete dias após a indução da colite. A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi determinada no plasma e fígado como marcador de inflamação e a gliconeogênese a partir de lactato foi investigada no fígado em perfusão. A histologia e o estresse oxidativo foram determinados no fígado assim como os marcadores de estresse oxidativo e dano hepático no plasma. Ratos colíticos apresentam aumentada atividade da MPO e estresse oxidativo no plasma, assim como aumentado estresse oxidativo, infiltração de leucócitos, reduzida área de hepatócitos e reduzida gliconeogênese no fígado. Esta última foi o resultado do aumentado estresse oxidativo e inflamação que ocorre no órgão. As manifestações hepáticas da doença ocorreram sem que os marcadores plasmáticos de dano hepático fossem alterados. O alfa-bisabolol na dose de 50 mg/Kg diminuiu a inflamação sistêmica e hepática de ratos colíticos e, em adição, diminuiu o estresse oxidativo sistêmico e hepático e aumentou a gliconeogênese para os valores dos ratos saudáveis. O alfa-bisabolol 200 mg/Kg diminuiu a inflamação, mas reduziu a gliconeogênese, aumentou o estresse oxidativo e alterou a morfometria do fígado de ratos controles. Estes resultados mostram que ratos com colite por TNBS poderiam ser utilizados para investigar as manifestações hepáticas da colite em pacientes com DII e o alfa-bisabolol na dose de 50 mg/Kg pode ser um bom candidato como adjuvante no tratamento das manifestações hepáticas das DII.

Palavras-chave: alfa-bisabolol, colite induzida por TNBS, metabolismo hepático, fígado de rato perfundido, gliconeogênese, estresse oxidativo.

ABSTRACT

The present study investigated whether inflammation, oxidative stress and hepatic gluconeogenesis were altered in rats with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced colitis. This study also investigated the action of alpha-bisabolol on these systemic and hepatic manifestations in control and colicky rats. Experimental colitis in mice that shares many features with inflammatory bowel disease (IBD), particularly ulcerative colitis and Crohn's disease. Thus, Wistar rats were divided into control rats, controls treated with alpha-bisabolol at doses of 50 and 200 mg/kg, rats with colic and rats with colic treated with alpha-bisabolol at the same doses. Alpha-bisabolol or vehicle was administered orally for seven days after colitis induction. Myeloperoxidase (MPO) activity was determined in plasma and liver as a marker of inflammation and gluconeogenesis from lactate was investigated in perfused liver. Histology and oxidative stress were determined in the liver, as well as markers of oxidative stress and liver damage in plasma. Colitic mice show increased plasma MPO activity and oxidative stress, as well as increased oxidative stress, leukocyte infiltration, reduced hepatocyte area, and reduced gluconeogenesis in the liver. The latter was the result of increased oxidative stress and inflammation that occurred in the organ. The liver manifestations of the disease occurred without altering the plasmatic markers of liver damage. Alpha-bisabolol at a dose of 50 mg/Kg decreased systemic and hepatic inflammation in rats with colic and, in addition, decreased systemic and hepatic oxidative stress and increased gluconeogenesis to values in healthy rats. Alpha-bisabolol 200 mg/Kg decreased inflammation, but reduced gluconeogenesis, increased oxidative stress and altered liver morphometry in control rats. These results show that rats with TNBS colitis can be used to investigate the hepatic manifestations of colitis in patients with IBD and alpha-bisabolol at a dose of 50 mg/Kg may be a good candidate as an adjuvant in the treatment of hepatic manifestations of IBD.

Keywords: alpha-bisabolol, TNBS-induced colitis, hepatic metabolism, perfused rat liver, gluconeogenesis, oxidative stress.

Abreviações:

DII, doenças inflamatórias intestinais; TNBS, ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico; ROS, espécies reativas de oxigênio; MPO, mieloperoxidase; NF- κ B, fator nuclear kappa B; IAD, índice de atividade da doença; GSH, glutatona reduzida; OPT, o-ftalaldeído; KH, tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato; PBS, tampão fosfato salina; H&E, hematoxilina e eosina; DCFH-DA, 2'-7'-diclorofluoresceína-diacetato; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; DNPH, 2,4-dinitrofenilhidrazina; TAC, capacidade antioxidante total; ABTS, 2,2'-azino-bis(3-etylbenzthiazoline-6-sulphonic acid; DTNB, 5,5' ditiobis ácido 2-nitrobenzóico; FRAP, capacidade redutora de ferro; TPTZ, tripiridiltriazina; ALP, fosfatase alcalina; TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; DCF, 2,7-diclorofluoresceína; SOD, superóxido dismutase; DSS, dextran sulfato de sódio; Nfr2, fator nuclear eritróide 2; LPS, lipopolissacarídeo.

1. Introdução

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são caracterizadas por inflamação gastrointestinal crônica, e estão com aumento acentuado da incidência em países da Ásia e América Latina (Ananthakrishnan, Kaplan, & Ng, 2020). A doença está associada à redução da qualidade de vida e ao aumento dos custos com o sistema de saúde (Park & Bass, 2011). A colite ulcerativa e a doença de Crohn são os dois tipos principais de DII. A primeira afeta a mucosa do cólon, enquanto a doença de Crohn afeta a parede intestinal inteira e pode atingir qualquer parte do trato intestinal (Baumgart & Sandborn, 2007). A fisiopatologia de ambas envolve uma hipertrofia da mucosa intestinal e participação de citocinas pró-inflamatórias, que estimulam neutrófilos e macrófagos ativados a secretar espécies reativas de oxigênio e enzimas inflamatórias, que causam dano tecidual (Bhattacharyya, Chattopadhyay, Mitra, & Crowe, 2014; Iborra et al., 2011; Naito, Takagi, & Yoshikawa, 2007). Os marcadores de estresse oxidativo estão aumentados nos sítios de inflamação intestinal de pacientes e modelos animais de DII (Hassan et al., 2010; Iborra et al., 2011; Liu & Wang, 2011; Zhu & Li, 2012).

As DII também estão associadas com alterações sistêmicas, as quais envolvem principalmente as articulações, pele e fígado (Ott & Scholmerich, 2013). As manifestações extraintestinais ocorrem por meio do influxo de células inflamatórias, particularmente linfócitos T, do intestino inflamado para tecidos que apresentam aumentada expressão de moléculas de adesão para estas células (Adams & Eksteen, 2006). As manifestações hepatobiliares são muito comuns e afetam igualmente pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn. Colangite esclerosante primária, hepatite autoimune e trombose da veia porta são as principais manifestações hepáticas na DII (Rojas-Feria, Castro, Suárez, Ampuero, & Romero-Gómez, 2013). Complicações hepáticas secundárias à DII também são muito frequentes, como colelitíase e esteatose hepática, que podem ocorrer inclusive devido à medicação utilizada para tratar a doença (Uko, Thangada, & Radhakrishnan, 2012). Esteatose hepática, por exemplo, atinge cerca de 30% dos pacientes e está relacionada à maior severidade da doença (Uko et al., 2012).

Diante das diversas alterações no fígado de pacientes com DII, torna-se evidente que a doença também deve causar alterações na função hepática.

Os nutrientes da dieta absorvidos pelos enterócitos passam primeiro pelo fígado antes de atingir a circulação sistêmica. Esta posição estratégica do fígado lhe confere um papel fundamental na homeostase metabólica, de modo que o órgão é o local de várias vias ligadas ao metabolismo intermediário, como a glicogenólise, cetogênese e gliconeogênese (Sharabi, Tavares, Rines, & Puigserver, 2015). Estas duas últimas vias, por exemplo, ocorrem quase que exclusivamente no fígado (Bataglini et al., 2021; Wendt et al., 2019). Assim, pacientes com DII podem ter não só problemas de absorção intestinal de nutrientes, mas também alterações na homeostase metabólica corporal em razão do comprometimento da função hepática. De fato, as DII estão associadas com disfunções nutricionais e metabólicas que acarretam em anemia e caquexia (Matusiewicz, Neubauer, Bednarz-Misa, Gorska, & Krzystek-Korpacka, 2017; Nardone et al., 2021), fenômenos estes que também ocorrem em outras doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide (Roubenoff, 2009).

A colite induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) é uma abordagem experimental em ratos que induz uma intensa inflamação da mucosa com infiltração celular transmural semelhante à doença de Crohn humana e, por isso, tem sido muito utilizada para estudar as DII (Gonçalves et al., 2013; Morris et al., 1989). Ratos colíticos também desenvolvem caquexia e apresentam diminuída expressão hepática de enzimas do sistema P450 (Masubuchi, Enoki, & Horie, 2008). A colite induzida por TNBS é mediada por células T e também está associada com complicações hepatobiliares, principalmente colestase intra-hepática (Kawaguchi et al., 2000; Morris et al., 1989). Neste sentido, avaliar vias metabólicas no fígado de ratos colíticos poderia esclarecer se as manifestações hepáticas secundárias à doença podem afetar a homeostase metabólica de pacientes com DII. Em adição, algumas vias metabólicas hepáticas são muito sensíveis a alterações na integridade celular, de forma que podem estar modificadas diante de danos hepáticos tão discretos que mesmo os marcadores específicos não estão alterados (Ames-Sibin et al., 2018; Castro Ghizoni et al., 2017). Este é o caso da gliconeogênese, uma via que requer energia de um sistema aeróbico associado a membranas. De fato, alterações histológicas não foram verificadas no fígado de ratos colíticos com colestase e mesmo marcadores séricos de dano hepático estão praticamente não alterados nestes animais (Kawaguchi et al., 2000).

Assim, quantificar a gliconeogênese hepática em ratos saudáveis ou colíticos poderia ser útil para avaliar possíveis ações hepatotóxicas de drogas utilizadas para tratar as DII.

O alfa-bisabolol é um álcool sesquiterpênico natural encontrado no óleo essencial de camomila-vulgar (*Matricaria chamomilla*) que é muito utilizado em fragrâncias e cosméticos (Kamatou & Viljoen, 2010). Diversas propriedades terapêuticas têm sido atribuídas a este composto (Braga, Dal Sasso, Fonti, & Culici, 2009; De O. Leite et al., 2011; Kamatou & Viljoen, 2010; Lee et al., 2017), entretanto, a atividade anti-inflamatória é a mais investigada (Barreto et al., 2016; S. Kim et al., 2011). Em humanos, formulações contendo extratos de camomila mostraram-se efetivos em diminuir os sintomas das DII (Albrecht, Müller, Schneider, & Stange, 2014; Langhorst et al., 2013) e, em ratos, o extrato de camomila foi efetivo em diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a atividade da mieloperoxidase (MPO), os níveis de mediadores pró-inflamatórios e a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) induzidos por LPS (lipopolissacarídeos) em segmento de cólon isolado de ratos, um modelo *ex vivo* de colite ulcerativa aguda (Menghini et al., 2016). Estes efeitos do extrato de camomila foram atribuídos ao alfa-bisabolol. Em adição, nós mostramos recentemente que o alfa-bisabolol oralmente administrado durante os 7 dias seguintes a indução da colite com TNBS em ratos diminui o índice de atividade da doença (IAD), a inflamação e o estresse oxidativo do cólon (Ramalho et al., 2022). Entretanto, ainda não se sabe se o alfa-bisabolol modifica as manifestações hepáticas secundárias à colite e mesmo se o composto altera negativamente ou não o metabolismo hepático de ratos saudáveis.

Considerando as informações acima descritas, o presente estudo avaliou se a gliconeogênese está modificada no fígado de ratos com colite induzida por TNBS. Em adição, foi avaliado se o alfa-bisabolol oralmente administrado por sete dias altera o metabolismo hepático de ratos colíticos e controles. O fígado de rato em perfusão isolada foi utilizado como ferramenta experimental porque tem a grande vantagem de conservar a microcirculação do órgão, fator importante, já que o suprimento de oxigênio e substratos para as células ocorre por esta via. Análises histológicas do fígado e medidas de estresse oxidativo sérico e hepático foram também realizadas para fornecer um quadro

mais detalhado das alterações observadas no órgão como consequência da colite e do alfa-bisabolol.

Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), alfa-bisabolol (alfa-4-dimetil-alfa-[4-metil-3-pentenil]-3-ciclohexeno-1-metanol, C₁₅H₂₆O, 93% de pureza, 2'-7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), o-ftalaldeído (OPT), glutathiona reduzida (GSH), enzimas e coenzimas foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Kits comerciais para AST, ALT, creatinina e albumina foram adquiridos da Gold Analisa Diagnóstica Ltda (Belo Horizonte, MG, Brasil). Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

2.2 Animais e indução da colite

Ratos machos da linhagem Wistar pesando 340-360g (90 dias de idade) foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os animais foram mantidos no laboratório setorial em caixas de polipropileno (quatro animais por caixa) sob condições padrões: temperatura controlada de 24±3°C com ciclos de iluminação claro e escuro de 12 horas. A alimentação foi *ad libitum* com ração balanceada (Nuvilab[®], Colombo, Brasil). Para a indução da colite, os animais em jejum de 12 horas receberam, sob anestesia de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), por enema 0,6 mL de uma solução contendo 0,3mL de TNBS (15mg) dissolvido em 0,3 mL de etanol 30% (Morris et al., 1989). Para cada enema, um cateter flexível de polietileno com um diâmetro externo de 2 mm foi inserido no cólon a 8 cm a partir do ânus. Animais controles receberam 0,6 mL de salina 0,9% da mesma forma. Todos os procedimentos foram feitos conforme recomendado pelo Conselho Brasileiro para Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEM (protocolo 4439150318).

2.3 Delineamento experimental e tratamento

Os animais foram distribuídos em seis diferentes grupos (n = 7): controles (C), ratos controles tratados com veículo; CB50 e CB200, ratos controles tratados com alfa-bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/Kg; Colíticos (Col), ratos colíticos tratados com veículo; ColB50 e ColB200, ratos colíticos

tratados com alfa-bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/Kg. O alfa-bisabolol foi oralmente e diariamente administrado pela manhã diluído em veículo (tween 80 3% em salina) durante 7 dias, a partir do primeiro dia da indução da colite. As doses de alfa-bisabolol foram determinadas conforme estudo prévio (Ramalho et al., 2022). Este delineamento experimental foi repetido duas vezes para realizar todos os procedimentos do estudo.

2.4 Perfusão de fígado e gliconeogênese

A perfusão de fígado não recirculante e livre de hemoglobina foi realizada conforme descrito anteriormente (Comar, Suzuki-Kemmelmeier, & Bracht, 2003). Após 7 dias de protocolo experimental, no 8º dia, os ratos em jejum de 12 horas foram profundamente anestesiados com cetamina (90 mg/kg) + xilazina (9 mg/kg) e a cavidade peritoneal foi exposta. Após a canulação das veias porta e cava, o fígado foi removido e posicionado sob o aparato de acrílico para perfusão. O líquido de perfusão foi o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) contendo 25 mg% de albumina sérica bovina e saturado com mistura de oxigênio e dióxido de carbono (95:5) por meio de oxigenador de membrana com ajuste simultâneo de temperatura a 37°C. O fluxo foi mantido constante por uma bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson, França). Lactato (2 mM) foi utilizado como substrato gliconeogênico e infundido durante 30 minutos diretamente dissolvido no líquido de perfusão. A concentração de oxigênio no perfusato efluente foi monitorada por polarografia. Amostras do líquido de perfusão efluente foram coletadas em intervalos de dois minutos e analisadas quanto ao seu conteúdo de glicose e piruvato (Bergmeyer, 1974).

2.5 Coleta e preparação dos tecidos

Os ratos foram profundamente anestesiados com cetamina (90 mg/kg) e xilazina (9 mg/kg) e a cavidade peritoneal foi cirurgicamente exposta. O sangue foi coletado da veia cava e depositado em frascos com EDTA 20 mM. Na sequência, o fígado foi removido e dividido em duas partes: a primeira parte foi imediatamente clampeada em nitrogênio líquido e armazenada em -80°C para as análises de estresse oxidativo e a segunda parte foi utilizada para a análise histológica.

O sangue foi centrifugado a 4000g/15 minutos, o sobrenadante separado como fração plasmática. O tecido hepático congelado foi homogeneizado em homogeneizador van Potter-Elvehjem com 10 volumes de tampão fosfato de potássio (pH 7,4) e uma alíquota separada como homogenato total. O remanescente foi centrifugado (11000g/15 minutos) e o sobrenadante separado como fração solúvel do homogenato.

Para o processamento histológico, as amostras de fígado foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 6 horas, desidratadas em gradiente de etanol, clareadas com xilol e embebidas em blocos de parafina. Cortes transversais semi-seriados com espessura de 5 μm foram cortados em micrótomo rotativo (Leica RM2245) e montados em lâminas histológicas.

2.6 Análises histológicas

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para determinar a morfologia e a morfometria dos hepatócitos. As análises morfológicas do fígado foram feitas com imagens do parênquima hepático na região próxima à veia central. As imagens foram capturadas em objetiva de 40x em um microscópio óptico (Nikon Eclipse®, Shimjuku, Japão) acoplado à câmera de alta resolução (Nikon®, Ds-Fi1c, Shimjuku, Japão) utilizando o software NIS-Elements (versão 4.0, Praga, República Tcheca). O número e área dos hepatócitos foram avaliados usando o programa Image-Pro Plus® 4.5 (Media Cybernetics) com auxílio de uma tarja de tamanho padrão em todas as imagens a fim de ocultar a veia central e padronizar a área a ser analisada. Para o número de hepatócitos, foram analisadas 40 imagens totalizando uma área de 12,35 mm² por animal. Para a área dos hepatócitos, 200 células foram examinadas por animal. Os dados de número e área de hepatócitos foram expressos como número de células/mm² e área (μm^2).

2.7 Ensaio no plasma

Os níveis de proteínas carboniladas foram determinados por espectrofotometria utilizando 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteínas no plasma (Levine et al., 1990).

A capacidade antioxidante total plasmática (TAC) foi determinada por método colorimétrico utilizando o composto ácido 2,2'-azino-bis(3-

etilbenzotiazolino-6-sulfônico (ABTS) conforme previamente descrito (Bracht et al., 2016). O composto ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX) foi utilizado como padrão e os resultados expressos como μmols de equivalentes TROLOX por mL de plasma.

Os níveis de grupos sulfidrilas de proteínas (tióis) foram determinados por espectrofotometria (412 nm) utilizando o composto 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) conforme anteriormente descrito (Bracht et al., 2016). Os valores foram expressos como nmol de tióis por mg de proteínas.

A capacidade redutora do ferro plasmático (FRAP) foi medida por espectrofotometria (595 nm) utilizando tripiridiltriazina (TPTZ) e cloreto férrico (FeCl_3) (Benzie & Strain, 1996).

Albumina, proteínas totais, creatinina e atividades das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram determinados no plasma para avaliar danos hepáticos e renais usando kits comerciais (Gold Analisa®). A atividade da MPO foi determinada por espectrofotometria utilizando o-dianisidina (Bradley, Christensen, & Rothstein, 1982).

2.8 Ensaios de estresse oxidativo hepático

Os níveis de peroxidação lipídica foram quantificados no homogenato hepático pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Buege & Aust, 1978). A quantidade de TBARS foi calculada a partir de uma curva preparada com 1,1',3,3'-tetraetoxipropano. Os resultados foram expressos como nmoles MDA/mg de proteína do homogenato.

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) no homogenato hepático foram determinados por espectrofluorimetria (excitação em 350 nm e emissão em 420 nm), por meio do ensaio com o-ftalaldeído (OPT) (Hissin & Hilf, 1976). A fluorescência foi calculada como GSH e os valores expressos em nmol/mg de proteínas do homogenato.

Os níveis de ROS foram quantificados no sobrenadante do homogenato por espectrofluorimetria utilizando a 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Biazon et al., 2016). Este método quantifica a oxidação do DCFH-DA na molécula fluorescente 2,7-diclorofluoresceína (DCF), na presença de esterases

e espécies reativas de oxigênio. Os resultados estão expressos como nmol/mg de proteínas.

A atividade da catalase foi estimada medindo alterações na absorvância a 240 nm, utilizando H₂O₂ como substrato e expressa como $\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{mg}$ de proteínas) (Bergmeyer, 1974). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi estimada pela sua capacidade de inibir a autoxidação do pirogaloil em meio alcalino, o qual é determinado por espectrofotometria em 420 nm (MARKLUND & MARKLUND, 1974). Uma unidade SOD é considerada como a quantidade de enzima que é capaz de causar 50% de inibição e os resultados estão expressos como U/mg de proteínas. A atividade da MPO foi determinada no sobrenadante do homogenato da mesma forma que anteriormente descrito para o plasma.

2.9 Análise estatística

Os dados obtidos estão expressos em gráficos e tabelas como médias \pm erro padrão da média. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism Software (versão 8.0). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. A significância dos dados paramétricos foi representada por ANOVA one-way e pós teste de Tukey e dados não paramétricos com Kruskal-Wallis e pós teste de Dunns. Também foi utilizado test t-student para avaliação em pares dos grupos C e Col. O nível de 5% ($p < 0.05$) foi adotado como critério de significância.

2. Resultados

3.1 Peso corporal

As primeiras análises referem-se ao efeito da indução da colite e do tratamento com alfa-bisabolol sobre a evolução do peso corporal. Estes resultados estão apresentados na Tabela 1. Comparando-se o peso corporal dos animais no 1º e no 7º dia de tratamento, é possível notar que todos os animais dos grupos controles ganharam peso, embora um pouco menos para os animais controles tratados com alfa-bisabolol. Por outro lado, os animais colíticos tratados ou não, tiveram uma redução no peso corporal ao final do tratamento.

Tabela 1: *Efeitos da colite experimental e do tratamento de ratos controle e colíticos com alfa-bisabolol sobre a evolução do peso corporal.* C, ratos controles; Col, ratos com colite induzida por TNBS; CB50; CB200; ColB50 e ColB200, respectivamente ratos controles e colíticos tratados com alfa-bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/kg por 7 dias. Os valores são a média \pm erro padrão da média de sete animais.

Grupos	Perda/ganho de peso corporal (%)	Peso final: 7º dia (g)
C	+6,48 \pm 2,6	332,6 \pm 7,8
CB50	+3,80 \pm 1,8	359,6 \pm 4,4
CB200	+3,30 \pm 1,5	357,0 \pm 11,3
Col	-14,88 \pm 3,8*	263,7 \pm 11,8*
ColB50	-12,48 \pm 1,8	259,5 \pm 10,8
ColB200	-13,63 \pm 1,4	260,0 \pm 2,4

Teste t-student: *p<0,05 para diferença entre C e Col.

3.2 Efeitos da colite e do alfa-bisabolol sobre a gliconeogênese hepática

O efeito da colite e do tratamento com alfa-bisabolol sobre a gliconeogênese foi investigado no fígado em perfusão usando lactato (2 mM) como precursor da glicose. O uso de L-lactato como substrato gliconeogênico apresenta algumas vantagens (Castro Ghizoni et al., 2017): é um dos principais substratos gliconeogênicos em humanos e roedores; é facilmente convertido em piruvato pelo equilíbrio da enzima citosólica lactato desidrogenase; e permite

avaliar a maquinaria gliconeogênica completa passando por todas as etapas da via desde o piruvato até a glicose. A Fig. 1A mostra os cursos de tempo das modificações causadas pela indução da colite e pelo tratamento com alfa-bisabolol na dose de 50 mg/Kg nos fígados perfundidos de ratos saudáveis e colíticos. A Fig. 1A também ilustra o protocolo experimental usado para alfa-bisabolol na dose de 200 mg/Kg. Fígados de ratos em jejum de 12 horas foram usados para garantir baixos níveis de glicogênio. Sob tais condições, a velocidade de produção de glicose reflete principalmente a velocidade da gliconeogênese (Comar, Suzuki-Kemmelmeier, Peralta, & Bracht, 2016). Na ausência de substrato, isto é, nos primeiros 10 minutos de perfusão mostrados na Fig. 1A (período basal) a produção de glicose e piruvato foi extremamente baixa e o consumo de oxigênio estável. A infusão de lactato produziu aumentos progressivos na produção de glicose e piruvato e no consumo de oxigênio. Esses aumentos tenderam a se estabilizar aos 36 minutos de perfusão e foram diferentes entre os grupos. O incremento da produção de glicose foi menor no fígado de ratos colíticos, uma das hipóteses iniciais deste estudo. Após a retirada do lactato do líquido de perfusão, a produção de glicose, a produção de piruvato e o consumo de oxigênio tenderam a retornar aos níveis basais.

Experimentos como os ilustrados na Fig. 1A foram repetidos para os grupos tratados com alfa-bisabolol na dose de 200 mg/Kg. Para facilitar as comparações, os valores de estado estacionário (36 minutos de perfusão na Fig. 1A) para a produção de piruvato e glicose e o consumo de oxigênio de todos os grupos estão mostrados na Fig. 1B. A produção de glicose foi 40% menor no fígado de ratos colíticos não tratados quando comparados aos controles não tratados. Entretanto, a produção de piruvato e o consumo de oxigênio não foram diferente entre estes dois grupos. O tratamento dos animais colíticos com alfa-bisabolol aumentou a produção de glicose dos animais colíticos para os níveis de controles não tratados, mas diminuiu a mesma nos animais controles tratados com alfa-bisabolol na dose de 200 mg/Kg. Já a produção de piruvato foi aumentada em 26% e 54% respectivamente nos fígados de animais controles e colíticos tratados com alfa-bisabolol na dose de 200 mg/Kg. O consumo hepático de oxigênio praticamente não foi alterado pelo tratamento, exceto por uma diminuição de 14% nos animais colíticos que receberam alfa-bisabolol na dose de 50 mg/Kg.

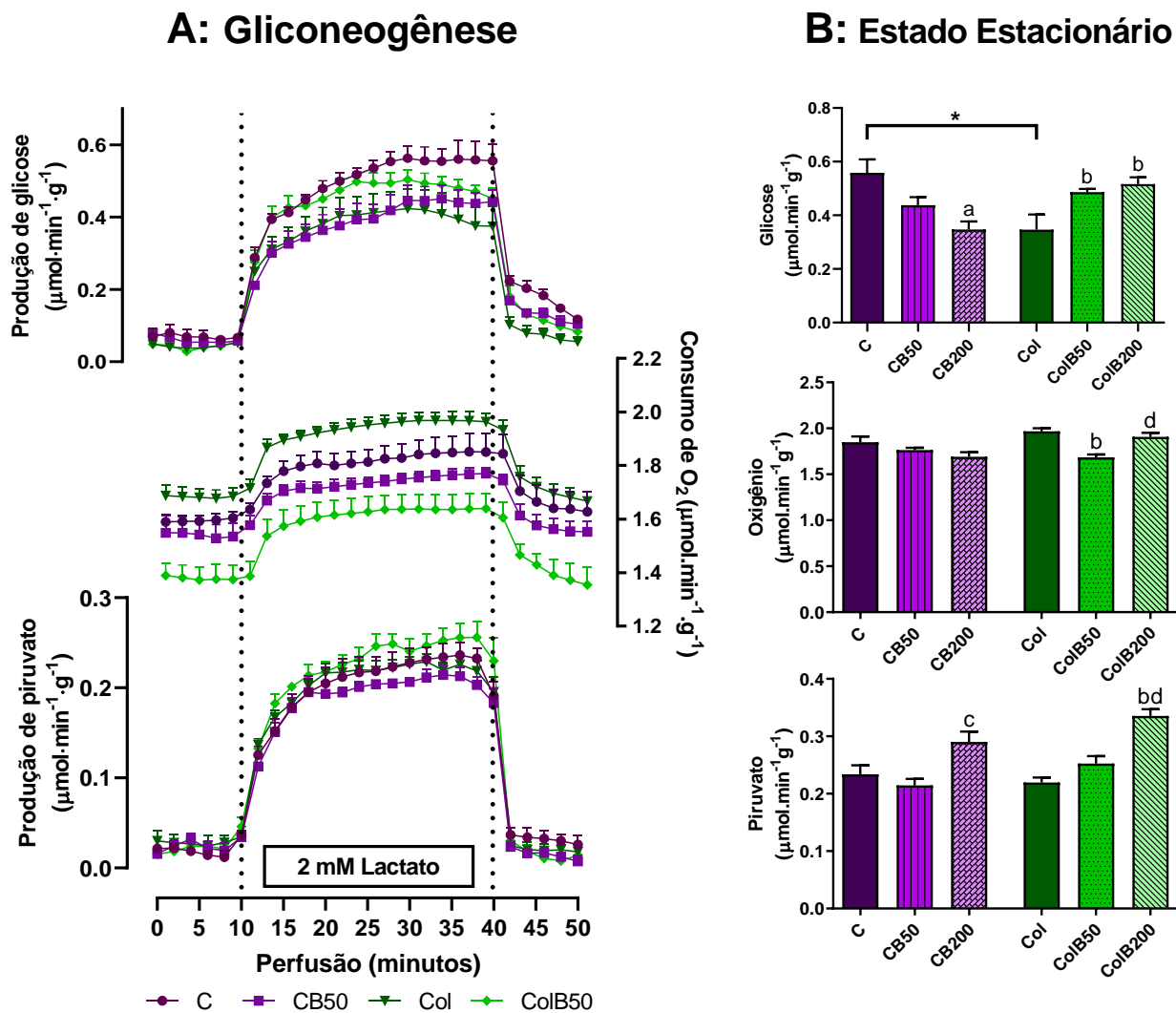


Fig. 1: Efeitos da colite experimental e do tratamento com alfa-bisabolol sobre a gliconeogênese no fígado de ratos em perfusão isolada. Fígados de animais em jejum de 12 h foram perfundidos com lactato 2mM conforme descrito em materiais e métodos. O perfusado efluente foi coletado a cada dois minutos e dosado para o conteúdo de piruvato e glicose. O consumo de oxigênio foi medido por polarografia. Painel A: decurso temporal da produção de metabólitos. Painel B: valores de estado estacionário para os metabólitos no tempo 36 do Painel A. Os valores são a média \pm erros padrão da média de seis animais. Teste t-student: * $p < 0,05$. Análise de variância ANOVA one way com pós teste de Tukey: ^a $p < 0,05$ vs grupo C, ^b $p < 0,05$ vs grupo Col, ^c $p < 0,05$ vs grupo CB50, ^d $p < 0,05$ vs grupo ColB50.

3.3 Estresse oxidativo e inflamação no plasma

A atividade da MPO, a capacidade antioxidante total (TAC), a capacidade redutora do ferro (FRAP) e os níveis das proteínas carboniladas e tióis no plasma estão mostrados na Fig. 2. A atividade da MPO foi três vezes maior no plasma de ratos colícticos (comparado aos controles). O tratamento de ratos colícticos com alfa-bisabolol 50 mg/Kg, mas não 200 mg/Kg, reduziu a atividade da MPO plasmática em 50%. O tratamento de animais controles com alfa-bisabolol 200 mg/Kg, mas não 50 mg/Kg, aumentou a atividade da MPO em 60%. Os níveis de proteínas carboniladas, um marcador pró-oxidativo, foi 70% maior no plasma de animais colícticos. O tratamento com alfa-bisabolol 50 mg/Kg aumentou ainda mais os níveis de proteínas carboniladas no plasma de ratos colícticos e, na dose de 200 mg/Kg, aumentou em 140% os níveis de proteínas carboniladas no plasma de ratos controles e diminuiu em 63% estes níveis em animais colícticos. Os marcadores antioxidantes TAC, FRAP e tióis foram respectivamente 37%, 26% e 30% menores no plasma de animais colícticos (comparados aos controles). O tratamento com alfa-bisabolol não modificou a FRAP no plasma de animais colícticos e controles, mas aumentou a TAC em 50% no plasma de animais colícticos para a dose de 50 mg/Kg. Já na dose de 200 mg/kg, o alfa-bisabolol diminuiu a TAC em 28% no plasma de ratos controles, mas não nos colícticos. O tratamento com alfa-bisabolol 50 mg/Kg, mas não 200 mg/Kg, aumentou os níveis de tióis em 23% no plasma de ratos colícticos.

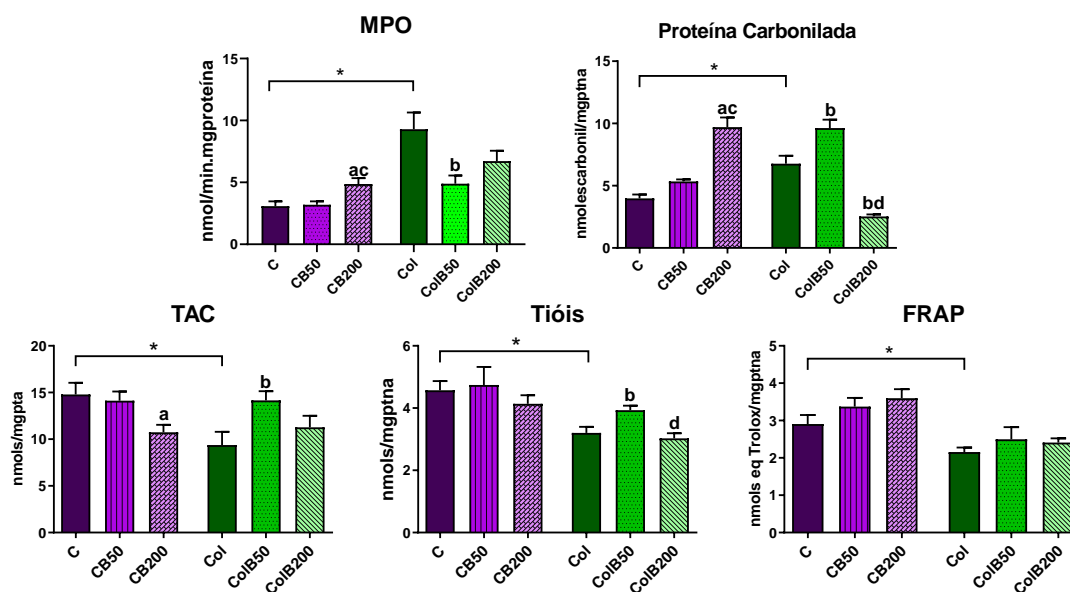


Fig. 2: Efeito do tratamento com alfa-bisabolol sobre o estresse oxidativo e inflamação no plasma de ratos controles e colíticos. C: controle, Col: colíticos, e seus respectivos tratamentos com alfa-bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/kg (CB50; CB200; ColB50 e ColB200). Os valores são a média \pm erros padrão da média de seis animais. Teste t-student: * $p < 0,05$ para diferença entre C e Col; ANOVA one way e pós teste de Tukey: ^a $p < 0,05$ vs grupo C, ^b $p < 0,05$ vs grupo Col, ^c $p < 0,05$ vs grupo CB50, ^d $p < 0,05$ vs grupo ColB50.

3.4 Estresse oxidativo e inflamação hepática

A Fig. 3 mostra os resultados dos marcadores de estresse oxidativo e inflamação no fígado. A atividade da enzima MPO foi utilizada como marcador de infiltração por células inflamatórias no fígado. A atividade da MPO foi 130% maior no fígado de ratos colíticos e o tratamento com alfa-bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/Kg diminuiu esta atividade para valores iguais àqueles dos controles não tratados. O tratamento dos animais controles com alfa-bisabolol na dose de 50 mg/Kg não modificou a atividade da MPO no fígado, mas o tratamento com a dose de 200 mg/Kg causou um aumento de 158% na atividade da enzima. Os níveis de TBARS hepático, um marcador pró-oxidativo, não foi modificado nem pela colite, nem pelo tratamento com alfa-bisabolol. Já os níveis hepáticos de ROS, os quais causam injúria oxidativa hepática, foram 71% maior nos animais colíticos não tratados. O tratamento dos animais colíticos com alfa-bisabolol nas duas doses diminuiu os níveis de ROS hepáticos para valores iguais àqueles dos

controles (Fig. 3). Os níveis de GSH, um marcador antioxidante, foram 34% menores no fígado de ratos colíticos quando comparados aos animais controles. O tratamento com alfa-bisabolol não modificou os níveis hepáticos de GSH nos animais colíticos, mas diminuiu estes níveis nos animais controles para a dose de 200 mg/Kg. A atividade da enzima antioxidante catalase foi 40% menor no fígado de ratos colíticos não tratados (comparado aos controles). O tratamento com alfa-bisabolol na dose de 50 mg/Kg aumentou a atividade da catalase em 51% e 170% no fígado de ratos controles e colíticos, respectivamente. O tratamento com alfa-bisabolol na dose de 200 mg/Kg não alterou a atividade da catalase. A atividade da enzima antioxidante SOD não apresentou diferença no fígado de ratos colíticos se comparada aos controles, mas o tratamento com alfa-bisabolol aumentou a atividade da SOD em 93% no fígado de ratos colíticos para a dose de 50 mg/Kg e diminuiu em 80% a mesma atividade no fígado colítico para a dose de 200 mg/Kg. A atividade da SOD não foi modificada pelo tratamento dos animais controles.

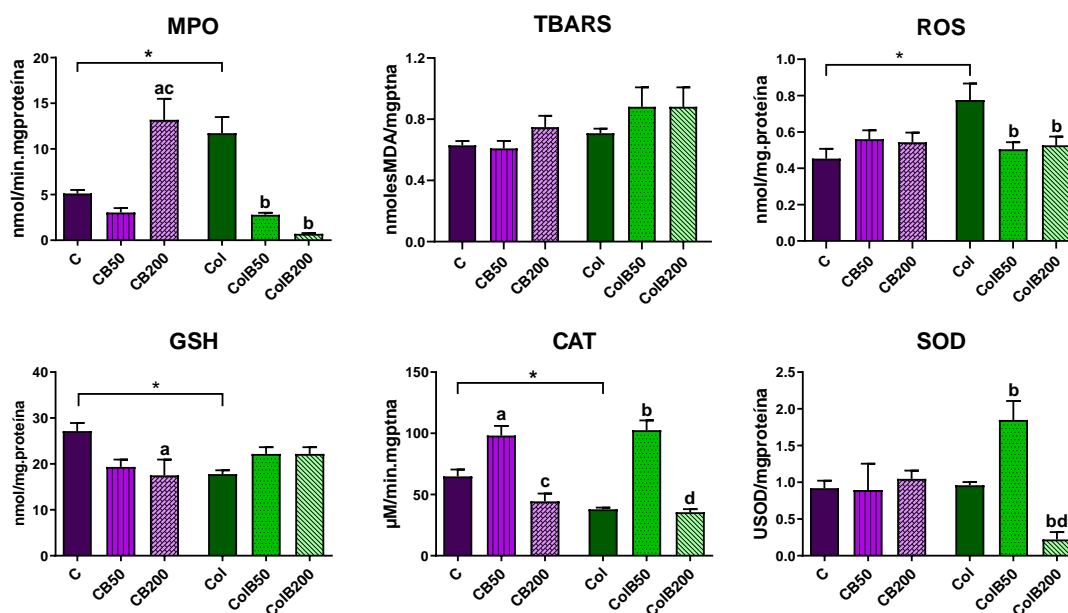


Fig. 3: Efeito do tratamento com alfa-bisabolol sobre o estresse oxidativo e inflamação no fígado de ratos controles e colíticos. C: controle, Col: colíticos, e seus respectivos tratamentos com alfa-bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/kg (CB50; CB200; ColB50 e ColB200). Os valores são a média \pm erros padrão da média de seis animais. Teste t-student: * $p < 0,05$ para diferença entre C e Col; ANOVA one way e pós teste de Tukey: ^a $p < 0,05$ vs grupo C, ^b $p < 0,05$ vs grupo Col, ^c $p < 0,05$ vs grupo CB50, ^d $p < 0,05$ vs grupo ColB50. MPO, mieloperoxidase; TBARS, substância reativa ao ácido tiobarbitúrico; ROS, espécies reativas de oxigênio; GSH, glutatona reduzida; CAT, catalase; SOD, superóxido dismutase.

3.5 Marcadores plasmáticos de dano hepático e renal

As atividades de AST e ALT e os níveis de albumina foram determinados no plasma para avaliar se o tratamento com alfa-bisabolol está associado com dano hepático. A creatinina plasmática foi utilizada como marcador de dano renal. Os resultados estão apresentados na Tabela 2. Tanto a colite quanto o tratamento com alfa-bisabolol não modificaram consideravelmente as atividades ou os níveis destes marcadores plasmáticos.

Tabela 2: Efeitos do tratamento com alfa-bisabolol sobre marcadores plasmáticos hepático e renal de ratos. C: controle, Col: colíticos, e seus respectivos tratados com alfa-bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/kg (CB50; CB200; ColB50 e ColB200).

Parâmetros	AST (U·L ⁻¹)	ALT (U·L ⁻¹)	Albumina (g·dL ⁻¹)	Creatinina (mg·dL ⁻¹)
C	51,8 ± 2,2	24,4 ± 1,7	2,02 ± 0,10	0,35 ± 0,01
CB50	43,3 ± 3,4	19,5 ± 0,6	1,76 ± 0,10	0,39 ± 0,01
CB200	37,7 ± 1,7 ^a	22,3 ± 2,0	1,91 ± 0,07	0,38 ± 0,01
Col	45,1 ± 2,1	21,2 ± 1,9	1,79 ± 0,11	0,36 ± 0,01
ColB50	36,9 ± 2,3	22,3 ± 1,5	1,72 ± 0,13	0,36 ± 0,02
ColB200	50,9 ± 3,8 ^b	24,7 ± 2,5	1,77 ± 0,10	0,40 ± 0,01

Os valores são a média ± erros padrão da média de seis animais. Teste t-student: *p<0,05 para diferença entre C e Col; ANOVA one way e pós teste de Tukey: ^ap<0,05 vs grupo C, ^bp<0,05 vs grupo Col. AST: Aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase.

3.6 Histologia hepática

As análises morfológicas e morfométricas foram realizadas no fígado para avaliar se as alterações metabólicas, oxidativas e o aumento da atividade da MPO estão também associadas com alterações estruturais do parênquima hepático. Os resultados da densidade e área dos hepatócitos estão apresentados na Fig. 4, a qual também apresenta uma fotomicrografia do fígado de um animal colítico corado com H&E. Para facilitar as comparações, a Fig. 4 também repete os resultados da atividade da MPO no fígado. É possível observar na fotomicrografia do fígado colítico um foco de infiltração por células inflamatórias (círculo), fenômeno condizente com a maior atividade da MPO destes animais e que estava ausente nos animais controles. De fato, os animais controles (não mostrado) apresentam estruturas histológicas normais, com veia central e portal típicas e hepatócitos organizados em cordões com núcleos centrais e citoplasma preservado. Já nos animais colíticos, são observados diversas alterações, como sinusóides dilatados e distorcidos (seta fina) e linfócitos intraepiteliais (seta grossa). Em relação à morfometria, o tamanho dos hepatócitos foi 20% menor nos animais colíticos. O tratamento com alfa-bisabolol 50mg/kg aumentou este

parâmetro em 13%, e a dose de 200 mg/kg aumentou em 7% (comparados aos colíticos). Já nos animais controle tratados com 200mg/kg, houve redução do tamanho dos hepatócitos em 5% (comparados aos controles) (Fig. 4). Quanto à densidade, os animais colíticos apresentaram um maior número de hepatócito por mm^2 (7%). O tratamento com alfa-bisabolol na dose de 50 mg/kg para os animais controles reduziu em 5% comparado ao controle sem tratamento, e nos colíticos tratados na mesma dose reduziu 15% comparado aos colíticos sem tratamento. Já o tratamento na dose de 200 mg/kg aumentou a densidade dos hepatócitos nos animais controles e colíticos.

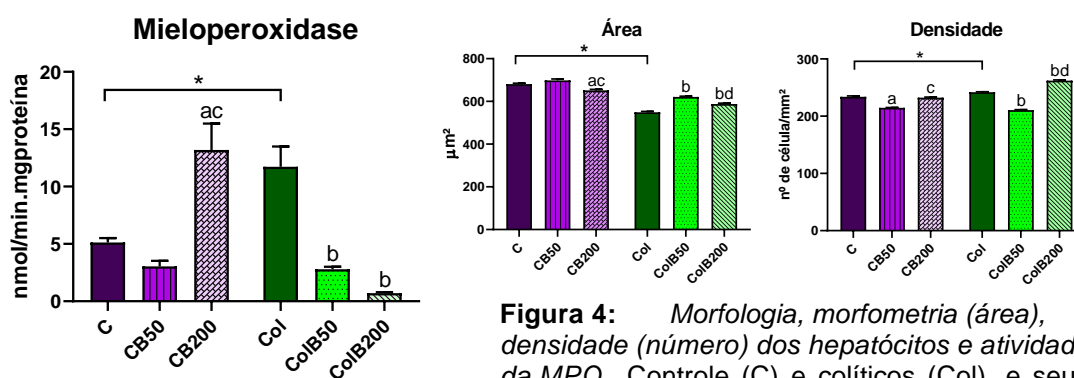
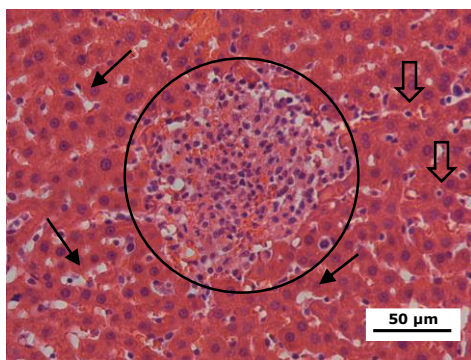


Figura 4: Morfologia, morfometria (área), densidade (número) dos hepatócitos e atividade da MPO. Controle (C) e colíticos (Col), e seus respectivos tratados com alfa-bisabolol nas doses de 50 e 200 mg/kg (CB50, CB200, ColB50 e Col200) por 7 dias. Fotomicrografia do fígado de rato colítico corado com H&E. Círculo: infiltrado inflamatório, seta fina: sinusoides dilatados, seta larga: linfócito intraepitelial. Os valores são a média \pm erros padrão da média de seis animais. Teste t-student $*p < 0,05$. Análise de variância ANOVA e pós teste de Tukey, $^a p < 0,05$ vs grupo C, $^b p < 0,05$ vs grupo Col, $^c p < 0,05$ vs grupo CB50, $^d p < 0,05$ vs grupo ColB50. Barra de calibração 50 μm .



3. Discussão

Os resultados do presente estudo mostram, que os ratos com colite induzida por TNBS apresentam manifestações extraintestinais claras, especificamente perda de peso corporal, aumentada inflamação e estresse oxidativo sistêmico e alterações hepáticas. Em relação a esta última, os ratos colíticos apresentaram reduzida gliconeogênese, aumentado estresse oxidativo, infiltrado inflamatório e alterada morfologia do parênquima hepático. Estudos prévios já relatam um reduzido peso corporal de animais colíticos (Gonçalves et al., 2013) e aumento na atividade da MPO hepática e colônica (El-Akabawy & El-Sherif, 2019; Tatiya-Aphiradee, Chatuphonprasert, & Jarukamjorn, 2021; Vicentini et al., 2018), além de modificações morfológicas no parênquima hepático, tais como a desorganização dos cordões hepáticos na região periportal e infiltrado inflamatório (Moura et al., 2016; Tatiya-Aphiradee et al., 2021; Trivedi & Jena, 2013). Os achados histológicos do presente estudo mostraram que a área dos hepatócitos esteve diminuída no fígado de ratos colíticos. Esta alteração tem sido associada com modificações na permeabilidade intestinal que ocorre na colite, o que favorece a passagem de bactérias através das junções *tight* intestinal que alcançam a veia porta hepática e deixam o órgão susceptível a modificações associadas à esteatose e fibrose (Trivedi & Jena, 2013). Achados histológicos similares foram encontrados na doença hepática gordurosa não alcoólica, que apresenta aumento de infiltrado inflamatório no fígado como o resultado da translocação e crescimento pronunciado de bactérias no cólon (Gäbele et al., 2011; Kwon, Lee, Heo, Kim, & Hyun, 2021).

Os marcadores plasmáticos de dano hepático, especificamente ALT, AST e albumina, não foram alterados nos ratos colíticos, o que mostra que as manifestações hepáticas, em particular a inflamação do tecido hepático, não foram suficientes para causar lise nos hepatócitos, ao menos até o sétimo dia após a indução da colite. De fato, um estudo prévio também não encontrou modificação na atividade das enzimas AST e ALT no plasma de animais com colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) (S. H. Kim et al., 2020). Esta última, entretanto, ao contrário da colite induzida por TNBS, está associada principalmente com dano local, isto é, no cólon, sem que manifestações extraintestinais tenham sido relatadas para o modelo (Czaja, 2014; Wirtz et al.,

2017). Por outro lado, a ausência de dano estrutural hepático não implica que a função do órgão não esteja prejudicada, como aqui mostrado pela reduzida gliconeogênese hepática e aumentado estresse oxidativo hepático. Fenômeno semelhante tem sido também observado no fígado de ratos com artrite induzida por adjuvante, um modelo de artrite reumatoide severa (Ames-Sibin et al., 2018; Comar et al., 2013; Moreira et al., 2022; Souza et al., 2021).

Em relação ao estresse oxidativo, este foi aumentado no plasma e fígado dos ratos colíticos e deveria ser a consequência de um sistema pró-oxidante estimulado associado a uma defesa antioxidante deficiente (Halliwell & Gutteridge, 2015). De fato, a capacidade antioxidante plasmática determinada por TAC, FRAP e tióis foi diminuída no plasma e os níveis de GSH e atividade da enzima antioxidante catalase foram diminuídas no fígado de animais colíticos. Por consequência, altos níveis de proteínas carboniladas foram encontrados no plasma, entretanto, os níveis de TBARS, um marcador de injúria oxidativa à lipídios, não foram alterados no fígado de ratos colíticos. Considerando que os níveis de ROS foi aumentado no fígado, é muito provável que a injúria oxidativa ao tecido esteja de fato ocorrendo, porém, não observada utilizando a técnica do TBARS. A este respeito, é já sabido que proteínas carboniladas são marcadores muito mais sensíveis que TBARS para avaliar injúria oxidativa no fígado (Comar et al., 2013). Em relação ao sistema pró-oxidante, a inflamação sistêmica deveria ser a principal causa do aumentado estresse oxidativo tanto no plasma quanto no fígado já que a atividade da enzima MPO foi aumentada em ambos tecidos. Os leucócitos, particularmente neutrófilos e macrófagos, são um dos principais liberadores de espécies reativas para o tecido. No fígado, a aumentada infiltração de leucócitos, particularmente neutrófilos e macrófagos residentes ativados, devem liberar mediadores inflamatórios (TNF α , IL-1 β , IL-6, entre outros), enzimas proteolíticas e espécies reativas, principalmente ROS, que intensificam não apenas a inflamação como também o estresse oxidativo no tecido. Aumentados níveis de ROS tem sido reportado também o fator nuclear NF-kB, o que potencializa a inflamação por aumentar a expressão e liberação de mediadores inflamatórios (Glauert, 2007). Por sua vez, as citocinas inflamatórias, particularmente TNF- α , estimulam a produção de ROS por mitocôndrias hepáticas (Kastl et al., 2014). Assim, o estresse oxidativo já

observado no intestino de ratos colícticos também é observado sistemicamente no sangue e fígado (RAMALHO et al., 2022).

A gliconeogênese hepática foi diminuída no fígado de ratos colícticos, um fenômeno que está provavelmente relacionado com os pronunciados estresse oxidativo e inflamação do órgão. O estresse oxidativo alterado é o resultado de um sistema antioxidante prejudicado associado a um aumento na produção de ROS, ambos mediados por citocinas inflamatórias derivadas tanto do intestino inflamado como dos infiltrados inflamatórios hepáticos. Por sua vez, o estresse oxidativo acentuado consome uma quantidade excessiva de equivalentes redutores para neutralizar sem sucesso a produção mais intensa de ROS e, portanto, deixam o fígado em um estado mais oxidado, uma condição que deveria fazer prevalecer as vias catabólicas sobre as vias anabólicas hepáticas, como é o caso da gliconeogênese (Wendt et al., 2019). De fato, fenômeno similar tem sido reportado para o fígado de ratos com artrite induzida por adjuvante, um modelo de doença inflamatória crônica e sistêmica, da mesma forma que a colite induzida por TNBS (Castro Ghizoni et al., 2017; Comar et al., 2013; Júnior et al., 1999; Sá-Nakanishi et al., 2018). Animais artríticos apresentam uma reduzida gliconeogênese causada por um ambiente celular mais oxidado que ocorre como consequência de aumentado estresse oxidativo e inflamação hepáticos. A diminuída gliconeogênese observada aqui para o fígado de ratos colícticos poderia ser ao menos em parte extrapolada para pacientes com DII, a qual poderia contribuir para as disfunções nutricionais e metabólicas que acarretam em anemia e caquexia colíctica (Matusiewicz et al., 2017; Nardone et al., 2021).

O presente estudo mostra também que o tratamento de ratos colícticos com alfa-bisabolol oralmente administrado por sete dias nas doses de 50 e 200 mg/Kg diminuiu a inflamação sistêmica, particularmente a inflamação hepática, conforme demonstrado pela redução na atividade da MPO plasmática e hepática. O tratamento por sete dias de animais colícticos com alfa-bisabolol nas mesmas doses utilizadas no presente estudo foi efetivo em diminuir a inflamação e o estresse oxidativo no cólon distal (RAMALHO et al., 2022). Assim, o presente estudo mostra que o alfa-bisabolol pode ser efetivo não apenas para os sintomas intestinais da colite, mas também as manifestações sistêmicas da doença, principalmente as manifestações hepáticas. Da mesma forma que reduziu a

inflamação, o tratamento com alfa-bisabolol diminuiu os níveis hepáticos de ROS nos animais colíticos, mostrando a relação de produção de ROS com o número de células inflamatórias no tecido. Em relação ao mecanismo de ação anti-inflamatório, tem sido relatado que o alfa-bisabolol inibe a produção de enzimas e mediadores inflamatórios que são induzidos pelo fator de transcrição NF- κ B, especificamente por inibir a fosforilação de I κ B α (inibidor de NF- κ B) e, por consequência, inibir a translocação de NF- κ B para o núcleo (S. Kim et al., 2011).

O alfa-bisabolol foi efetivo em reduzir o estresse oxidativo hepático e plasmático dos animais colíticos, conforme mostrado pelos menores níveis de ROS hepático e maiores níveis de TAC e tióis no plasma e atividade das enzimas SOD e catalase no fígado. Entretanto, os marcadores antioxidantes foram aumentados apenas para o alfa-bisabolol na dose de 50 mg/Kg. Ao contrário, na dose de 200 mg/Kg, o tratamento de ratos controles saudáveis causou uma diminuição da TAC plasmática, aumentos de proteínas carboniladas no plasma e atividade MPO no plasma e fígado, e diminuição dos níveis de GSH e atividade da SOD e catalase no fígado. Mais uma vez, os marcadores de dano hepático não foram alterados pelo alfa-bisabolol, mas a gliconeogênese foi diminuída para a dose de 200 mg/Kg no fígado de ratos controles saudáveis. Da mesma forma em que modificou a morfometria hepática de ratos saudáveis controles. Isto mostra que de alguma forma a dose de 200 mg/Kg não apresenta ausência total de toxicidade. De fato, a gliconeogênese foi também diminuída no fígado de ratos saudáveis tratados oralmente com óleo de copaíba sem que a atividade plasmática de AST e ALT fossem alteradas (Castro Ghizoni et al., 2017). Isto mostra também que a gliconeogênese tem uma maior sensibilidade para avaliar o efeitos de compostos que modificam a função hepática. De qualquer forma, o alfa-bisabolol da dose de 50 mg/Kg foi efetivo para diminuir as manifestações hepáticas de ratos colíticos sem causar danos oxidativos e metabólicos no fígado de ratos controles.

Em relação ao mecanismo de ação antioxidante, o alfa-bisabolol, ao menos na dose de 50 mg/Kg, poderia diminuir o estresse oxidativo atuando diretamente como sequestrador de radicais livres (1), estimulando o sistema antioxidante endógeno (2) ou diminuindo o processo inflamatório (3). No presente estudo, o alfa-bisabolol poderia até eliminar diretamente ROS (1) e de alguma forma diminuir o estresse oxidativo no fígado e plasma, entretanto, o composto

mostrou uma atividade antioxidante inferior *in vitro* (DPPH e FRAP) quando comparado com antioxidantes clássicos, como a vitamina E, vitamina C e BHA (Bezerra, 2009; Merghache et al., 2014). Da mesma forma, o estímulo do sistema antioxidante endógeno pode ser estimulado pelo alfa-bisabolol (2), conforme observado por aumentos na atividade catalase e SOD no fígado de ratos colíticos, porém, os níveis de GSH não foram modificados pelo tratamento. Este último é uma das principais consequências da ativação do fator nuclear eritróide 2 (Nfr2), que regula positivamente os genes das enzimas relacionadas à síntese de glutathione (Niture, Khatri, & Jaiswal, 2014). Por fim, a atividade anti-inflamatória do alfa-bisabolol (3) certamente está contribuindo para a diminuição do estresse oxidativo, conforme demonstrado pela diminuição da atividade MPO no plasma e fígado. A redução da inflamação diminui não só a liberação de citocinas inflamatórias, mas também a produção de ROS por parte das células inflamatórias. Estudo prévio de fato mostra que o tratamento de ratos com colite induzida por DSS durante 5 dias com extrato de camomila diminui a produção de ROS e a atividade da MPO no cólon, um efeito atribuído ao alfa-bisabolol presente no extrato e associado com um menor número de neutrófilos recrutados para sítio de inflamatório (Barreto et al., 2016; Menghini et al., 2016).

Experimentos adicionais são requeridos para um mais completo detalhamento destes efeitos do alfa-bisabolol. Este é o caso da recuperação da gliconeogênese no fígado de ratos colíticos tratados com alfa-bisabolol na dose de 200 mg/Kg, a qual diminuiu a gliconeogênese de animais controles saudáveis e causou outros efeitos associados à toxicidade para esta dose. É importante ressaltar aqui que a produção de piruvato no fígado de animais colíticos foi também aumentada com a dose de 200 mg/Kg, uma situação que normalmente ocorre quando a produção de glicose a partir de lactato está diminuída no fígado (Simões et al., 2022).

4. Conclusões

Ratos com colite induzida por TNBS apresentam, aos sete dias após a indução, aumentado infiltrado inflamatório, aumentado estresse oxidativo, reduzida área de hepatócitos e reduzida gliconeogênese no fígado. Esta última deve ser o resultado do aumentado estresse oxidativo e inflamação que ocorre no órgão. As manifestações hepáticas da doença ocorrem sem que os marcadores plasmáticos de dano hepático estejam alterados e o modelo experimental, portanto, poderia ser utilizado ao menos em parte para compreensão das modificações hepáticas da colite. O alfa-bisabolol oralmente administrado em ratos com colite induzida por TNBS durante sete dias na dose de 50 mg/Kg diminuiu consideravelmente a inflamação sistêmica e hepática. Em adição, diminuiu o estresse oxidativo sistêmico e hepático e aumentou a gliconeogênese para os valores encontrados nos ratos controles saudáveis. Diante disso, o alfa-bisabolol pode ser um bom candidato no tratamento das manifestações hepáticas das DII ou mesmo um promissor para o desenvolvimento de novos anti-inflamatórios.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- Adams, D. H., & Eksteen, B. (2006). *of inflammatory bowel disease*. 6(March).
- Albrecht, U., Müller, V., Schneider, B., & Stange, R. (2014). Efficacy and safety of a herbal medicinal product containing myrrh, chamomile and coffee charcoal for the treatment of gastrointestinal disorders: A non-interventional study. *BMJ Open Gastroenterology*, 1(1), 1–7. <https://doi.org/10.1136/bmjgast-2014-000015>
- Ames-Sibin, A. P., Barizão, C. L., Castro-Ghizoni, C. V., Silva, F. M. S., Sá-Nakanishi, A. B., Bracht, L., ... Comar, J. F. (2018). β -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(12), 10262–10277. <https://doi.org/10.1002/jcb.27369>
- Ananthakrishnan, A. N., Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2020). Changing Global Epidemiology of Inflammatory Bowel Diseases: Sustaining Health Care Delivery Into the 21st Century. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 18(6), 1252–1260. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.01.028>
- Barreto, R. S. S., Quintans, J. S. S., Amarante, R. K. L., Nascimento, T. S., Amarante, R. S., Barreto, A. S., ... Quintans-Júnior, L. J. (2016). Evidence for the involvement of TNF- α and IL-1 β in the antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl. (Lamiaceae) essential oil and (-)- α -bisabolol, its main compound, in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 191, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.022>
- Bataglini, C., Mariano, I. R., Azevedo, S. C. F., Freire, V. N., Natali, M. R. M., Pedrosa, M. M. D., ... Comar, J. F. (2021). Insulin degludec and glutamine dipeptide modify glucose homeostasis and liver metabolism in diabetic mice undergoing insulin-induced hypoglycemia. *Journal of Applied Biomedicine*, 19(4), 210–219. <https://doi.org/10.32725/jab.2021.025>
- Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*, 369(9573), 1641–1657. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60751-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60751-X)

- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bergmeyer, H. U. (1974). *Methods of enzymatic analysis*. Weinheim: Academic Press.
- Bezerra, S. B. (2009). *Atividade Gastroprotetora E Antimicrobiana (Camomila) E Do Alfa-Bisabolol : Possíveis*. 114.
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., & Crowe, S. E. (2014). Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological Reviews*, 94(2), 329–354. <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2012>
- Biazon, A. C. B., Wendt, M. M. N., Moreira, J. R., Ghizoni, C. V. C., Soares, A. A., da Silva Silveira, S., ... Comar, J. F. (2016). The *in vitro* Antioxidant Capacities of Hydroalcoholic Extracts from Roots and Leaves of *Smallanthus sonchifolius* (Yacon) Do Not Correlate with Their *in vivo* Antioxidant Action in Diabetic Rats. *Journal of Biosciences and Medicines*, 04(02), 15–27. <https://doi.org/10.4236/jbm.2016.42003>
- Bracht, A., Silveira, S. S., Castro-Ghizoni, C. V., Sá-Nakanishi, A. B., Oliveira, M. R. N., Bersani-Amado, C. A., ... Comar, J. F. (2016). Oxidative changes in the blood and serum albumin differentiate rats with monoarthritis and polyarthritis. *SpringerPlus*, 5(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1671-1>
- Bradley, P., Christensen, R., & Rothstein, G. (1982). Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood*, 60(3), 618–622. <https://doi.org/10.1182/blood.V60.3.618.618>
- Braga, P. C., Dal Sasso, M., Fonti, E., & Culici, M. (2009). Antioxidant activity of bisabolol: Inhibitory effects on chemiluminescence of human neutrophil bursts and cell-free systems. *Pharmacology*, 83(2), 110–115. <https://doi.org/10.1159/000186049>
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Biomembranes - Part C: Biological

- Oxidations. *Methods in Enzymology*, 52, 302–310. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687978520326>
- Castro Ghizoni, C. V., Arssufi Ames, A. P., Lameira, O. A., Bersani Amado, C. A., Sá Nakanishi, A. B., Bracht, L., ... Comar, J. F. (2017). Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions of Copaiba Oil Are Related to Liver Cell Modifications in Arthritic Rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(10), 3409–3423. <https://doi.org/10.1002/jcb.25998>
- Comar, J. F., Babeto De Sá-Nakanishi, A., De Oliveira, A. L., Marques Nogueira Wendt, M., Bersani Amado, C. A., Ishii Iwamoto, E. L., ... Bracht, A. (2013). Oxidative state of the liver of rats with adjuvant-induced arthritis. *Free Radical Biology and Medicine*, 58(d), 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.003>
- Comar, J. F., Suzuki-Kemmelmeier, F., & Bracht, A. (2003). The action of oxybutynin on haemodynamics and metabolism in the perfused rat liver. *Pharmacology and Toxicology*, 93(3), 147–152. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2003.930307.x>
- Comar, J. F., Suzuki-Kemmelmeier, F., Peralta, R. M., & Bracht, A. (2016). The metabolic action of oxybutynin in the perfused rat liver can be explained as a diminution of the accessible cell space. *Latin American Journal of Pharmacy*, 35(3), 474–480.
- Czaja, A. J. (2014). Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(10), 2515–2532. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i10.2515>
- De O. Leite, G., Leite, L. H. I., De S. Sampaio, R., Araruna, M. K. A., De Menezes, I. R. A., Da Costa, J. G. M., & Campos, A. R. (2011). (-)- α -Bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice. *Fitoterapia*, 82(2), 208–211. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.09.012>
- El-Akabawy, G., & El-Sherif, N. M. (2019). Zeaxanthin exerts protective effects on acetic acid-induced colitis in rats via modulation of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 111(August 2018), 841–851.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.001>

- Gäbele, E., Dostert, K., Hofmann, C., Wiest, R., Schölmerich, J., Hellerbrand, C., & Obermeier, F. (2011). DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH. *Journal of Hepatology*, *55*(6), 1391–1399.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.035>
- Glauert, H. P. (2007). Vitamin E and NF- κ B Activation: A Review. *Vitamins and Hormones*, *76*(07), 135–153. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(07\)76006-5](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(07)76006-5)
- Gonçalves, C. C. M., Hernandez, L., Bersani-Amado, C. A., Franco, S. L., Silva, J. F. D. S., & Natali, M. R. M. (2013). Use of propolis hydroalcoholic extract to treat colitis experimentally induced in rats by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/853976>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (Fifth Edit; U. P. Oxford, ed.).
- Hassan, A., Ibrahim, A., Mbodji, K., Coëffier, M., Ziegler, F., Bounoure, F., ... Marion-Letellier, R. (2010). An α -linolenic acid-rich formula reduces oxidative stress and inflammation by regulating NF- κ B in rats with TNBS-induced colitis. *Journal of Nutrition*, *140*(10), 1714–1721.
<https://doi.org/10.3945/jn.109.119768>
- Hissin, P. J., & Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, *74*(1), 214–226. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2)
- Iborra, M., Moret, I., Rausell, F., Bastida, G., Aguas, M., Cerrillo, E., ... Beltrán, B. (2011). Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn's disease. *Biochemical Society Transactions*, *39*(4), 1102–1106.
<https://doi.org/10.1042/BST0391102>
- Júnior, Z. F., Ishii-Iwamoto, E. L., Bersani Amado, C., Vicentini, G. E., D'Urso Panerari, Â. D., Bracht, A., & Kelmer-Bracht, A. M. (1999). Gluconeogenesis in the liver of arthritic rats. *Cell Biochemistry and*

Function, 17(4), 271–278. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0844\(199912\)17:4<271::AID-CBF839>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0844(199912)17:4<271::AID-CBF839>3.0.CO;2-P)

Kamatou, G. P. P., & Viljoen, A. M. (2010). A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1483-3>

Kastl, L., Sauer, S. W., Ruppert, T., Beissbarth, T., Becker, M. S., Süss, D., ... Gülow, K. (2014). TNF- α mediates mitochondrial uncoupling and enhances ROS-dependent cell migration via NF- κ B activation in liver cells. *FEBS Letters*, 588(1), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.11.033>

Kawaguchi, T., Sakisaka, S., Mitsuyama, K., Harada, M., Koga, H., Taniguchi, E., ... Sata, M. (2000). Cholestasis with altered structure and function of hepatocyte tight junction and decreased expression of canalicular multispecific organic anion transporter in a rat model of colitis. *Hepatology*, 31(6), 1285–1295. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.7435>

Kim, S. H., Lee, W., Kwon, D., Lee, S., Son, S. W., Seo, M.-S., ... Jung, Y.-S. (2020). Metabolomic Analysis of the Liver of a Dextran Sodium Sulfate-Induced Acute Colitis Mouse Model: Implications of the Gut–Liver Connection. *Cells*, 9(2), 341. <https://doi.org/10.3390/cells9020341>

Kim, S., Jung, E., Kim, J. H., Park, Y. H., Lee, J., & Park, D. (2011). Inhibitory effects of (-)- α -bisabolol on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 49(10), 2580–2585. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.076>

Kwon, J., Lee, C., Heo, S., Kim, B., & Hyun, C. K. (2021). DSS-induced colitis is associated with adipose tissue dysfunction and disrupted hepatic lipid metabolism leading to hepatosteatosis and dyslipidemia in mice. *Scientific Reports*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84761-1>

Langhorst, J., Varnhagen, I., Schneider, S. B., Albrecht, U., Rueffer, A., Stange, R., ... Dobos, G. J. (2013). Randomised clinical trial: A herbal preparation of myrrh, chamomile and coffee charcoal compared with mesalazine in maintaining remission in ulcerative colitis - A double-blind,

- double-dummy study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 38(5), 490–500. <https://doi.org/10.1111/apt.12397>
- Lee, J. C., Lee, H. Y., Kim, T. K., Kim, M. S., Park, Y. M., Kim, J., ... Lee, M. S. (2017). Obesogenic diet-induced gut barrier dysfunction and pathobiont expansion aggravate experimental colitis. *PLoS ONE*, 12(11), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187515>
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lens, A.-G., ... Stadtman, E. R. (1990). Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods in Enzymology*, 186(1), 464–478. [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(79\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0049-0172(79)90003-9)
- Liu, X., & Wang, J. (2011). Anti-inflammatory effects of iridoid glycosides fraction of *Folium syringae* leaves on TNBS-induced colitis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 780–787. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.010>
- MARKLUND, S., & MARKLUND, G. (1974). Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3), 469–474. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>
- Masubuchi, Y., Enoki, K., & Horie, T. (2008). Down-regulation of hepatic cytochrome P450 enzymes in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(3), 597–603. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.018754>
- Matusiewicz, M., Neubauer, K., Bednarz-Misa, I., Gorska, S., & Krzystek-Korpacka, M. (2017). Systemic interleukin-9 in inflammatory bowel disease: Association with mucosal healing in ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 23(22), 4039–4046. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i22.4039>
- Menghini, L., Ferrante, C., Leporini, L., Recinella, L., Chiavaroli, A., Leone, S., ... Brunetti, L. (2016). An Hydroalcoholic Chamomile Extract Modulates Inflammatory and Immune Response in HT29 Cells and Isolated Rat Colon. *Phytotherapy Research*, (March), 1513–1518.

<https://doi.org/10.1002/ptr.5655>

Merghache, D., Boucherit-Otmani, Z., Merghache, S., Chikhi, I., Selles, C., & Boucherit, K. (2014). Chemical composition, antibacterial, antifungal and antioxidant activities of Algerian *Eryngium tricuspidatum* L. essential oil. *Natural Product Research*, 28(11), 795–807.

<https://doi.org/10.1080/14786419.2014.883392>

Moreira, L. S., Chagas, A. C., Ames-Sibin, A. P., Pateis, V. O., Gonçalves, O. H., Silva-Comar, F. M. S., ... Comar, J. F. (2022). Alpha-tocopherol-loaded polycaprolactone nanoparticles improve the inflammation and systemic oxidative stress of arthritic rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 12(4), 414–425. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2021.12.003>

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.

[https://doi.org/10.1016/0016-5085\(89\)90904-9](https://doi.org/10.1016/0016-5085(89)90904-9)

Moura, F. A., De Andrade, K. Q., Araújo, O. R. P. De, Nunes-Souza, V., Santos, J. C. D. F., Rabelo, L. A., & Goulart, M. O. F. (2016). Colonic and Hepatic Modulation by Lipoic Acid and/or N-Acetylcysteine Supplementation in Mild Ulcerative Colitis Induced by Dextran Sodium Sulfate in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

<https://doi.org/10.1155/2016/4047362>

Naito, Y., Takagi, T., & Yoshikawa, T. (2007). Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 41(1), 18–26. <https://doi.org/10.3164/jcbtn.2007003>

Nardone, O. M., de Sire, R., Petito, V., Testa, A., Villani, G., Scaldaferrri, F., & Castiglione, F. (2021). Inflammatory Bowel Diseases and Sarcopenia: The Role of Inflammation and Gut Microbiota in the Development of Muscle Failure. *Frontiers in Immunology*, 12(July), 1–11.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.694217>

Niture, S. K., Khatri, R., & Jaiswal, A. K. (2014). Regulation of Nrf2 - An update. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 36–44.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.008>

- Ott, C., & Scholmerich, J. (2013). Extraintestinal manifestations and complications in IBD. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *10*(10), 585–595. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.117>
- Park, K. T., & Bass, D. (2011). Inflammatory bowel disease-attributable costs and cost-effective strategies in the United States: A review. *Inflammatory Bowel Diseases*, *17*(7), 1603–1609. <https://doi.org/10.1002/ibd.21488>
- Rojas-Feria, M., Castro, M., Suárez, E., Ampuero, J., & Romero-Gómez, M. (2013). Hepatobiliary manifestations in inflammatory bowel disease: The gut, the drugs and the liver. *World Journal of Gastroenterology*, *19*(42), 7327–7340. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i42.7327>
- Roubenoff, R. (2009). Rheumatoid cachexia: A complication of rheumatoid arthritis moves into the 21st century. *Arthritis Research and Therapy*, *11*(2), 5–6. <https://doi.org/10.1186/ar2658>
- Sá-Nakanishi, A. B., Soni-Neto, J., Moreira, L. S., Gonçalves, G. A., Silva, F. M. S., Bracht, L., ... Comar, J. F. (2018). Anti-inflammatory and antioxidant actions of methyl jasmonate are associated with metabolic modifications in the liver of arthritic rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/2056250>
- Sharabi, K., Tavares, C. D. J., Rines, A. K., & Puigserver, P. (2015). Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Molecular Aspects of Medicine*, *46*, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.09.003>
- Souza, K. S., Moreira, L. S., Silva, B. T., Oliveira, B. P. M., Carvalho, A. S., Silva, P. S., ... Comar, J. F. (2021). Low dose of quercetin-loaded pectin/casein microparticles reduces the oxidative stress in arthritic rats. *Life Sciences*, *284*(August), 119910. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119910>
- Tatiya-Aphiradee, N., Chatuphonprasert, W., & Jarukamjorn, K. (2021). *Garcinia mangostana* linn. Pericarp and alpha-mangostin ameliorate dextran sulfate sodium-induced hepatic injury in mice. *Journal of Physiology and Pharmacology*, *72*(3), 427–438.

<https://doi.org/10.26402/jpp.2021.3.11>

Trivedi, P. P., & Jena, G. B. (2013). Ulcerative colitis-induced hepatic damage in mice: Studies on inflammation, fibrosis, oxidative DNA damage and GST-P expression. *Chemico-Biological Interactions*, 201(1–3), 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.12.004>

Uko, V., Thangada, S., & Radhakrishnan, K. (2012). Liver disorders in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Research and Practice*, 2012(Cd). <https://doi.org/10.1155/2012/642923>

Vicentini, F. A., Barbosa, M. M. C., Fortunato, M. C., Amado, C. A. B., Comar, J. F., Longhini, R., ... Natali, M. R. M. (2018). Treatment with *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction improves healing and reduces oxidative stress in TNBS-induced colitis in rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 107(July), 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.160>

Wendt, M. M. N., de Oliveira, M. C., Franco-Salla, G. B., Castro, L. S., Parizotto, Â. V., Souza Silva, F. M., ... Comar, J. F. (2019). Fatty acids uptake and oxidation are increased in the liver of rats with adjuvant-induced arthritis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1865(3), 696–707. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.12.019>

Wirtz, S., Popp, V., Kindermann, M., Gerlach, K., Weigmann, B., Fichtner-Feigl, S., & Neurath, M. F. (2017). Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nature Protocols*, 12(7), 1295–1309. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.044>

Zhu, H., & Li, Y. R. (2012). Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: Updated experimental and clinical evidence. *Experimental Biology and Medicine*, 237(5), 474–480. <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011358>

Anexo 1: Parecer de Aprovação do CEUA- UEM



Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Estadual de Maringá

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do alfa-bisabolol sobre a inflamação intestinal e o metabolismo hepático de ratos com colite induzida por TNBS", protocolada sob o CEUA nº 4439150318 (ID 001687), sob a responsabilidade de **Jurandir Fernando Comar e equipe; Francielle Veiga Ramalho** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 15/05/2018.

We certify that the proposal "Effects of alpha-bisabolol on intestinal inflammation and hepatic metabolism of rats with TNBS-induced colitis", utilizing 560 Heterogenics rats (560 males), protocol number CEUA 4439150318 (ID 001687), under the responsibility of **Jurandir Fernando Comar and team; Francielle Veiga Ramalho** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 05/15/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2018** a **03/2021** Área: **Dbq-Bioquímica**

Origem: **Biotério Central da UEM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **80 a 90 dias**

N: **560**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **340 a 360 g**

Local do experimento: Laboratório de Metabolismo Hepático Laboratório de Histologia

Maringá, 16 de maio de 2018

Prof. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Coordenadora da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Dr. Claudemir Martins Soares
Coordenador Adjunto da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Anexo 2: Normas da revista *Digestive Disease and Science*

Digestive Diseases and Sciences (DDS) publishes peer-reviewed basic/translational and clinical studies and special articles on all aspects of gastroenterology and hepatology and related fields.

For complete information regarding authorship, ethics and availability of data and materials please review DDS's full [submission guidelines](#).

Manuscript Quality and Review Process

Manuscripts submitted to *Digestive Diseases and Sciences* (DDS) should be concise, well organized, and clearly written. Acceptance of manuscripts will be based on originality and importance to the field of digestive diseases. Submitted manuscripts are reviewed by the editor-in-chief and associate editors and, in the majority of cases, by two or more experts in the field. The editors can choose to reject a manuscript without peer review if the manuscript is of insufficient quality or relevance to warrant acceptance.

Articles are routinely checked for duplication; those that excessively re-use the text from their own published work or that from others will not be published. If data from another publication are included out of scientific necessity, this should be clearly stated in the manuscript, referenced, and the appropriate permissions must be acknowledged. Moreover, how the submitted work differs from prior publications should be specifically stated.

The editors reserve the right to reject poorly written manuscripts regardless of scientific content or potential importance. Submissions deemed of substantial scientific value but poorly written may be returned to the authors for editing by a professional editing service or native English speaker. Springer reserves the right to copyedit accepted manuscripts. Proofs will be sent to the corresponding author for final approval and must be returned within 48 hours of receipt.

Please note that DDS does not accept material written by or with the substantial assistance of professional medical writers, in particular those sponsored by the pharmaceutical industry.

SPECIFIC CONSIDERATIONS

The following submission categories are either not encouraged or require attention to specific instructions:

- **Alternative medicine:** Interventions considered as "alternative," "nontraditional," or ethnopharmacologic are generally considered to have been derived from ancient medical practices such as the use of herbal extracts and chemical mixtures that are not rigorously defined or standardized. The lack of standardization of these substances is likely to affect reproducibility and also limit the use to areas where such treatments are considered acceptable. Due to these considerations, such articles may either be returned to the authors or transferred by the publisher for consideration by a more appropriate journal

at the discretion of the editor and the Springer Transfer Desk. Submissions that use defined chemical compounds or standardized nontraditional practices, or reviews or analyses of such practices will generally be excluded from these considerations.

- **Derivative studies:** Submissions in which the principal purpose is to re-analyze previously published data will be classified as “derivative studies.” To be considered for publication, they must fulfill *all* of these criteria:

- 1) The “parent” paper must have been accepted for publication prior to submission to DDS of any derivative studies.

- 2) The complete, accepted version of the parent publication has to be clearly cited in the DDS submission. Citation to abstracts, preliminary papers, or “making of” papers is not acceptable.

- 3) A full text version of the published parent publication must be available to the editors and reviewers of the DDS submission in order to enable full comparison of the data.

- 4) The “child” paper must be of clear significance and advance the field in its own right.

- 5) Figures, data tables, methods, and other material cannot be duplicated verbatim from the parent paper without the permission of the publisher of the original paper and must be cited appropriately. The authors may cite identical methods and data in the “child” study.

- 6) In the introduction, the authors of the “child” paper must clearly state that the data in the submitted work are based on original data that were published previously, and must justify the significance and importance of re-analyzing their published data, stressing how new conclusions and insights generated from their re-analysis advance the field.

- **Iterative, repetitive, or incremental studies:** Although confirmatory studies often have value, the submission of studies in which near-identical methods are used to assess the efficacy of a succession of treatments tested in a standard disease model or *in vitro* system, particularly when the study is part of a large series of similar studies from the same laboratory, is discouraged, since these studies are usually not designed to test a thoughtful hypothesis or to gain insight into disease mechanisms or pathophysiology, but rather serve to maximize the number of publications given the capabilities of the laboratory.

- ***In vitro* only studies:** Experiments that rely on *in vitro* models, such as isolated tissues, cell cultures, or other organ models, are generally enhanced by confirmatory studies using animal models or even clinical studies. At the editors’ discretion, submissions reliant on data obtained solely from *in vitro* systems will likely be rejected or recommended for consideration by a more appropriate journal.

OPEN ARTICLE TYPES

The editors will consider and publish the following categories of manuscripts,

- **Original Article:** articles of interest to its readership that appeal to practicing gastroenterologists and scientists working in academic institutions and in industry who focus on the study of the digestive organs including the gastrointestinal tract, pancreas, and hepatobiliary system. Four major categories are welcome:

- 1) Medical education and practice, focusing on the delivery of medical care,

disease classification, health outcomes, health quality measurement tools, and other aspects of health services research, and on educational topics such as fellow training and other issues concerning gastrointestinal fellowship programs.

2) Diversity and inclusion in GI, addressing issues centered around gender and racial diversity primarily among GI trainees and faculty but also inclusive of all related topics of interest to the DDS readership. Basic/translational, which encompasses experimental animal research and re-search on clinical subjects or material using non-standard analyses and testing of fundamental mechanisms.

3) Clinical articles, which can include meta-analyses and systematic reviews, clinical trials of any design, biomarker studies, and any other clinically-based research of interest to our readership. Industry-sponsored articles will be considered provided that the relationship to the sponsor is clearly disclosed in the manuscript. An original article deemed of particular significance that is briefer than is usual may be reclassified as a "Brief Report" at the editor's discretion.

- **Review:** Comprehensive and thoroughly referenced coverage of basic or clinical topics. Industry-sponsored reviews will be considered provided that the relationship to the sponsor is clearly disclosed in the manuscript and if industry-sponsored professional writers have made no substantial contribution to its preparation.
- **Correspondence:** concise opinions on papers published in DDS online within the past six months.
- **Image of the Month:** an image of particular interest and novelty illustrating a clinical or basic science finding.

Please note that while DDS published case reports in the past, this article type is no longer accepted for consideration.

INVITED ARTICLE TYPES AND SPECIAL SECTION ARTICLES

The editors welcome proposals for articles addressing topics of interest to the journal's readership in the following categories:

- **Invited Reviews:** Please see description under "Review" above.
- **Current Clinical Controversies:** Brief reviews addressing a controversial area of current interest to the GI community, providing incisive conclusions based on the best available evidence.
- **Mentored Reviews:** Reviews basic disease mechanisms or pathophysiology or clinical topics and must be co-authored by a trainee/postdoc/fellow and a faculty mentor.
- **Fellows and Young GIs Section:** a series of mini-reviews on the topics of education and training, with an emphasis toward trainees and young GIs, bringing to the forefront the evidence available for best practices, issues related to GI training programs, education, diversity and inclusion, and other topics of interest to the most junior gastroenterologists.

Proposed articles must receive approval by section editors or the editor-in-chief prior to submission. Please email the specified section, proposed title and authors, a brief summary including how the article would advance basic science or clinical practice (250 words or less), and citations to similar articles published within the past 5 years (if any) to the editorial office at dds.journal@springernature.com. All invited articles will be peer reviewed either

by the journal's editors or by outside reviewers. Submitted full-length articles in these categories will be returned to the authors at the editor's discretion.

Submission

Original article, review, and correspondence manuscripts should be submitted online using Springer's manuscript submission and review system, Editorial Manager, at <https://www.editorialmanager.com/ddsj>. Corresponding authors must confirm that an institutional, noncommercial email address is included in their Editorial Manager profile before submitting. (Authors may include multiple email addresses in their profile, separated by semicolons.) Image of the month submissions should be emailed to the editorial office (dds.journal@springernature.com) rather than uploaded to Editorial Manager.

Editorial Manager supports a wide range of submission file formats:

- **Manuscripts:** Word, WordPerfect, RTF, TXT, and LaTeX
- **Figures:** TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript. Color art is FREE for both online and print publication and is encouraged in the interest of visual appeal and clarity. Please note that PDF is not an acceptable file format for manuscripts or figures.

Manuscript submission requires the uploading of at least one manuscript file (including references), but a cover letter, figures, figure legends, and tables may also be uploaded as separate files. The cover letter should include a statement that the article has not been published previously except in abstract form or by a nonprofit, recognized preprint server. Files should ideally be posted in the following order (order can be changed after uploading):

1. Cover letter
2. Manuscript
3. Tables
4. Figure legends (if separate)
5. Figures
6. Other

Submission of original articles and reviews also requires the suggestion of four to six peer reviewers (experts in the topic area of the manuscript and not recent collaborators or from the same institution as the author[s]), including name, department, institution, and email address.

Once the manuscript is uploaded to Editorial Manager, the corresponding author will receive an email requesting approval of the PDF created from the source files. If not done immediately following upload, it is important to review and approve the PDF to initiate review by the editors.

Should any difficulties arise while submitting manuscripts online, please contact the responsible editorial assistant by clicking "Contact Us" in the Editorial Manager toolbar at the top of each page. Once submitted, a manuscript's progress through the review process may be tracked in real time.

GRAPHICAL ABSTRACTS

Graphical abstracts are highly encouraged and should be a single-panel image that will help readers quickly gain an overview of the article. This visual summary will be visible to all readers of the online edition. The full color image should be labelled "Online Abstract

Figure" and may be accompanied by a short sentence (140-200 characters)

summarizing the key message(s) of the article, to be used as a legend for the graphic abstract. Upload the graphic abstract as a separate "figure" file type in Editorial Manager, preferably in one of the following formats: JPEG, PNG, SVG, TIFF, BMP, doc, docx, ppt, or pptx (note that PDF is not accepted). Acceptable size: 920x300px, 150KB max. Please make sure that you are the owner of the copyright or have obtained permission to reprint the image from the publisher or copyright holder.

Manuscript Style – All Manuscripts

- **Titles** should state the main findings of the article, not focus on design of the research, and should not exceed 120 characters (not including spaces) in length. Do not use abbreviations in titles.
- **Title page** should contain the title of the article, name(s) of author(s) and highest academic degree(s), affiliations of all authors, name of the corresponding author, corresponding author's institutional email and postal addresses, author contributions, acknowledgment of grant support, conflicts of interest, and disclosure of financial arrangements related to the research or assistance with manuscript preparation. Regarding authorship, please note that no more than one corresponding author and no more than one first author may be listed.
- **Text** should conform to accepted standards of American English style and usage. Before submitting an article to DDS, authors for whom English is a second language are encouraged to have their manuscripts reviewed and professionally edited by an individual whose native language is English. (Please see "English Language Editing" below.) All authors may also find the editor-in-chief's style guide, "[DDS Elementary Style: A Brief Guide for Authors](#)," helpful toward improving the readability and impact of their manuscript.
- **Format** of all manuscripts should be set as follows: 12-point font size, double-spaced with 1-inch margins, and only one space after periods and commas. Authors should retain a copy of all materials.
- **Keywords** should express the precise content of the manuscript, as they are used for indexing purposes and should preferably be terms from the Index Medicus Medical Subject Headings (MeSH) list. Figure title and caption material should appear in the legend and not on the figure. Legends should be typed double-spaced on pages separate from the text. Figures should be numbered in one consecutive series in the order in which they are cited in the text. Please include sufficient information in the legends to interpret the figures without reference to the text.
- **Illustrations** should be clear, with sharp contrast, especially where fine lines such as those of grids or traces are to be retained. Illustrations should be no larger than 8 1/2 x 11 inches, but preferably of a size not needing enlargement or reduction. Non-traceable (raster) line-art and photographs should ideally be provided as TIFFs of at least 600 dpi resolution. Please provide traceable (vector) figures in EPS format. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Scanned line drawings and line drawings in BMP format should have a minimum resolution of 1200 dpi. Halftone photographs should be provided as TIFFs of at least 200 dpi resolution.

No specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. The grouping of images from different parts of the same

gel, or from different gels, fields, or exposures must be made explicit by the arrangement of the figure (e.g., using dividing lines) and in the text of the figure legend. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if they are applied to the whole image and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g., changes to gamma settings) are not permitted.

All figures that were previously published can only be re-published with the permission of the copyright holder, usually obtained through RightsLink or similar mechanism. The publication from which the figure was copied must be cited and publisher acknowledged according to the copyright holder's requirements.

- **Tables** should be double-spaced on separate pages, with the table number and table title centered above the table and explanatory notes below the table.

- **References** should be cited in the text by Arabic numerals enclosed in square brackets. Only literature that is published or in press (with the name of the journal) may be numbered and listed. Abstracts and letters to the editor may also be cited, but should ideally be less than three years old and identified as such after the title, e.g., [Abstract] or [Letter to Editor].

The references section should be typed double-spaced on pages separate from the text and numbered consecutively in the order in which references are cited in text. Included are last names and initials of authors, title of article, name of publication, year published, volume, and inclusive pages. For references with more than six authors, the fourth and subsequent authors should be replaced with "et al."; for references with between one and six authors all the authors should be listed. Abbreviations should conform to those used in Index Medicus. References must be verified by the authors against original documents.

We recommend the use of tools such as EndNote or Reference Manager for referencemanagement and formatting.

The style and punctuation of the references should conform to the following examples,

- Article:

Sandborn WJ, Tremaine WJ, Batts KP, et al. Fecal bile acids, short-chain fatty acids, and bacteria after ileal pouch-anal anastomosis do not differ in patients with pouchitis. *Dig Dis Sci.* 1995;40:1471-1483.

- Book:

Banks PA. *Pancreatitis.* New York, NY: Plenum Medical; 1979.

- Contribution to a book:

Creutzfeldt W. Endocrine tumors of the pancreas. In: Volk BW, Wellmann KF, eds. *The Diabetic Pancreas.* New York, NY: Plenum Medical; 1977:551-590.

- Electronic:

ISI Web of Knowledge. *Journal Citation Reports, 2007 JCR Science Edition.* Available at: <http://isiwebofknowledge.com>. Accessed June 20, 2008.

Manuscript Style – by Article Type

- **Original articles** should be arranged as follows: Title Page, Abstract,

Keywords, Introduction, Methods, Results, Discussion, References, Tables, Figure Legends, and Figures. There is no maximum for word count, figures, tables, or references. Manuscripts should include a structured abstract of no more than 250 words organized as applicable into the following categories: Background, Aims, Methods, Results, and Conclusions. Abbreviations, footnotes, and references should not be used in the abstract, with the exception of standard, repetitive abbreviations such as HCV, GERD, etc. A list of four to six keywords should be provided directly below the abstract. Reports of prospective clinical trials with a control or comparison group should be presented according to the CONSORT guidelines (<http://www.consort-statement.org> or JAMA. 2001;285:1987- 1991). The registry URL (e.g., <http://www.clinicaltrials.gov> in the United States) and clinical trial number should be included in the body of the manuscript in the methods section. All structured reviews and meta-analyses should adhere to the guidelines published by the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) group (Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. PLoS Med. 2009 Jul 21;6); <http://www.prisma-statement.org>.

- **Review articles** should include a general abstract of no more than 250 words followed by four to six keywords. There is no maximum for word count, figures, tables, or references.
- **Correspondence** should be limited to 500 words and should relate to papers published in DDS online within the past six months.
- **Image of the month** should be limited to a maximum of 150 words, 4 images, and 3 references.

Anexo 3: Normas da revista *Cell Biochemistry & Function*.

1. Aims and Scope *Cell Biochemistry & Function* publishes original research articles and reviews on the mechanisms whereby molecular and biochemical processes control cellular activity with a particular emphasis on the **integration of molecular and cell biology, biochemistry and physiology in the regulation of tissue function in health and disease**. The primary remit of the journal is on mammalian biology both in vivo and in vitro but **studies on the biochemistry and function of cells *in situ* are especially encouraged**. Observational and pathological studies will be considered providing they include a rational discussion of the possible molecular and biochemical mechanisms underlying the results and **their immediate impact on our understanding of mammalian biology**.

Areas of particular interest include:

- Dysregulation of cellular function in disease
- Cell cycle control with respect to cell proliferation, differentiation and death
- DNA and RNA processing and the effects on cellular activity
- Regulation of stem cells and regenerative medicine
- Intra-cellular organelles, cellular metabolism and the control of cell biochemistry
- Local niches and cell function
- Cell-cell communication
- Nutrition and cell biochemistry
- Microbiomes

Cell Biochemistry and Function currently does not publish research in specific areas that are better served by specialist journals. This includes studies that are exclusively clinical. *Cell Biochemistry & Function* also discourages submission of research based exclusively on analysis of publically available transcriptomic and proteomic datasets, although the acceptability of specific manuscripts in this particular area can be discussed with the Editor-in-Chief.

2. Submission and Peer Review Authors should kindly note that submission of a paper will be held to imply that it is unpublished work which is not being considered for publication elsewhere. If accepted, it is expected that the paper will not be published in another journal or book in either the same or another format or language.

Once the submission materials have been prepared in accordance with the Author Guidelines, new submissions should be made via the Research Exchange submission portal <https://submission.wiley.com/journal/cbf>. Should your manuscript proceed to the revision stage, you will be directed to make your revisions via the same submission portal. You may check the status of your submission at any time by logging on to submission.wiley.com and clicking the "My Submissions" button. For technical help with the submission system, please review our FAQs or contact submissionhelp@wiley.com. For help with submissions, please contact the Editorial Office: JCBeditorial@wiley.com.

This journal does not charge submission fees.

Article Preparation Support [Wiley Editing Services](#) offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence. Also, check out our resources for [Preparing Your Article](#) for general guidance about writing and preparing your manuscript.

Open Access This journal is a subscription journal that offers an open access option. You'll have the option to choose to make your article open access after acceptance, which will be subject to an APC. You can [read more about APCs](#) and whether you may be eligible for waivers or discounts, through your institution, funder, or a country waiver. Please click [here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

Data Citation Please review [Wiley's Data Citation policy](#).

Funding You should list all funding sources in the Acknowledgments section. You are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the [Open Funder Registry](#) for the correct nomenclature.

Authorship All listed authors should have contributed to the manuscript substantially and have agreed to the final submitted version. Review [editorial standards](#) and scroll down for a description of authorship criteria. Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

Joint first or senior authorship: In the case of joint first authorship a footnote should be added to the author listing, e.g. 'X and Y should be considered joint first author' or 'X and Y should be considered joint senior author.'

Author Name Change Policy In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.

Correction to authorship In accordance with [Wiley's Best Practice Guidelines on Research Integrity and Publishing Ethics](#) and the [Committee on Publication Ethics' guidance](#), *Cell Biochemistry & Function* will allow authors to correct authorship on a submitted, accepted, or published article if a valid reason exists to do so. All authors – including those to be added or removed – must agree to any proposed change. To request a change to the author list, please complete

the [Request for Changes to a Journal Article Author List Form](#) and contact either the journal's editorial or production office, depending on the status of the article. Authorship changes will not be considered without a fully completed Author Change form. [Correcting the authorship is different from changing an author's name; the relevant policy for that can be found in [Wiley's Best Practice Guidelines](#) under "Author name changes after publication."]

Reproduction of Copyright Material

If excerpts from copyrighted works owned by third parties are included, credit must be shown in the contribution. It is your responsibility to also obtain written permission for reproduction from the copyright owners. For more information visit [Wiley's Copyright Terms & Conditions FAQ](#). The corresponding author is responsible for obtaining written permission to reproduce the material "in print and other media" from the publisher of the original source, and for supplying Wiley with that permission upon submission.

Cover Letters

Submissions should include a cover letter. The cover letter must state that the manuscript has not been submitted or published at any other journal, the researchers' compliance with local, state and national regulations for use of animal or human subjects, and anything else the author wishes for the editor to know. This could be specific questions the author wishes for reviewers to address, or suggestions for reviewers.

Free Format submission

Cell Biochemistry & Function now offers **Free Format submission** for a simplified and streamlined submission process.

Before you submit, you will need:

- Your manuscript: this should be an editable file including text, figures, and tables, or separate files – whichever you prefer. All required sections should be contained in your manuscript, including abstract (which does need to be correctly styled), introduction, methods, results, and conclusions. Figures and tables should have legends. Figures should be uploaded in the highest resolution possible. If the figures are not of sufficiently high quality your manuscript may be delayed. References may be submitted in any style or format, as long as it is consistent throughout the manuscript. Supporting information should be submitted in separate files. If the manuscript, figures or tables are difficult for you to read, they will also be difficult for the editors and reviewers, and the editorial office will send it back to you for revision. Your manuscript may also be sent back to you for revision if the quality of English language is poor.
- An ORCID ID, freely available at <https://orcid.org>. (*Why is this important? Your article, if accepted and published, will be attached to your ORCID profile. Institutions and funders are increasingly requiring authors to have ORCID IDs.*)
- The title page of the manuscript, including:

- Your co-author details, including affiliation and email address. (*Why is this important? We need to keep all co-authors informed of the outcome of the peer review process.*)
- Statements relating to our ethics and integrity policies, which may include any of the following (*Why are these important? We need to uphold rigorous ethical standards for the research we consider for publication*):
 - data availability statement
 - funding statement
 - conflict of interest disclosure
 - ethics approval statement
 - patient consent statement
 - permission to reproduce material from other sources
 - clinical trial registration

To submit, login at <https://wiley.atyponrex.com/journal/cbf> and create a new submission. Follow the submission steps as required and submit the manuscript.

Your Manuscript Manuscripts can be uploaded either as a single document (containing the main text, tables and figures), or with figures and tables provided as separate files. The main manuscript file can be submitted in Microsoft Word (.doc or .docx) or LaTeX (.tex) format. If submitting your manuscript file in LaTeX format via Research Exchange, select the file designation "Main Document – LaTeX .tex File" on upload. When submitting a Latex Main Document, you must also provide a PDF version of the manuscript for Peer Review. Please upload this file as "Main Document - LaTeX PDF." All supporting files that are referred to in the Latex Main Document should be uploaded as a "LaTeX Supplementary File."

Your main document should include (recommended formatting):

- A short informative **title** containing the major key words. The title should not contain abbreviations (see [Wiley's best practice SEO tips](#));
- A short **running title** of less than 40 characters;
- The full **names of the authors with institutional affiliations** where the work was conducted and the full contact details of the lab/institute where the work was conducted, **institutional e-mail-addresses need to be provided at least for submitting and/or corresponding author**. Authors should add a footnote for the author's present address if this is different from where the work was conducted;
- **Unstructured Abstract:** The Abstract should be clearly written in 300 words or less and should succinctly state the objectives and the working hypothesis of the study, experimental design, major observations and conclusions, and their major significance. The abstract should be intelligible to scientists in general and should thus be free of specialized jargon and abbreviations. References should generally not be cited in the abstract, but if they are, the complete citation should be given. Please mention the main keywords.
- **Significance Statement:** Each manuscript submission must include a Significance Statement that will be published as part of the final manuscript. This should be a short statement (less than 120 words) that explains why the

manuscript is important. It should state the purpose of the research – why was this work carried out? It should state what the key findings are, and why the data matter – what is the potential impact of this study on future research? The Significance Statement should be written in plain language that could be generally understood. However, it should NOT be a shortened version of the abstract.

- **5-7 keywords:** Keywords should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at www.nlm.nih.gov/mesh.

- **Main body:** formatted as introduction, materials & methods, results, discussion. Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical matter.

- **Acknowledgments:** Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

- **Conflict of Interest Statement:** Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the 'Conflict of Interest' section in the Editorial Policies and Ethical Considerations section below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

- **Data Availability Statement:** Authors will be asked to provide a data availability statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the 'Data Availability Statement' section in the respective section above.

- **References:** References should be prepared according to the Publication Manual of the American Psychological Association (6th edition). This means, in-text-citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper. References should be limited to 50. (A maximum of 25 table and figure footnotes is allowed if necessary).

Examples of APA references are listed below. Review your [reference style guidelines](#) prior to submission. Please note that a DOI should be provided for all references where available. For more information about APA referencing style, please refer to the [APA FAQ](#). Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one.

- i. Journal article
Beers, S. R. , & De Bellis, M. D. (2002). Neuropsychological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 159, 483–486. <http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.159.3.483>
- ii. Book
Bradley-Johnson, S. (1994). *Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school* (2nd ed.). Austin, TX: Pro-ed.
- iii. Internet Document
Norton, R. (2006, November 4). How to train a cat to operate a light switch [Video file]. Retrieved from www.youtube.com/watch?v=Vja83KLQXZs

- **Figures legends** must be added beneath each individual image during upload AND as a complete list in the text, after the main body and the references. Legends should be concise but comprehensive - the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.
- **Tables** (each table complete with title and footnotes): Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.
- **Appendices** (if relevant)

Figures and Supporting Information should be supplied as separate files:

- **Figures:** Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted. Click [here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements. No more than 8 figures may be presented, approximately equivalent of 3 pages-worth total.

Please be aware that all figures submitted with a manuscript to Cell Biochemistry and Function are screened for image manipulation. If manipulation is detected, the Author's Institution may be contacted. Please also check the **Data Reporting Policies regarding Reporting Western Blots** and other electrophoretic results [here](#).

- Supporting Information is information that is not essential to the article but provides greater depth and background, or e.g. gives data from control experiments. It is hosted online and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc. Click [here](#) for Wiley's FAQs on Supporting Information. Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper. See section "Data Sharing, Data Availability, and Data Reporting" for more details.

Article Types

Article Type	Description	Word Limit	Abstract / Structure	Other Requirements
Research Articles	reports of new research findings or conceptual analyses that	should not exceed 5000 words (including	Yes, unstructured	<u>Conflict of Interest Statement, Dat</u>

	make a significant contribution to knowledge	references, and table and figure legends) and contain no more than five display elements (figures and tables)		<u>a Availability Statement</u>
Reviews	discussing the state of the art of a particular and relevant topic; authors should contact the Editor-in-Chief (M.Hewison@bham.ac.uk) before the manuscript is drafted	up to 10 000 words	Yes, unstructured	<u>Conflict of Interest Statement, Data Availability Statement</u>
Rapid communications	should have the same style as research articles	up to 1000 words (excluding references)		contain only a single figure

Peer Review

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to journal readership. This journal operates under a single-blind peer review model. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper matches the scope of the journal, reaches the adequate priority, and meets the appropriate quality and relevance requirements.

In-house submissions, i.e. papers authored by Editors or Editorial Board members of the title, will be sent to Editors unaffiliated with the author or institution and monitored carefully to ensure there is no peer review bias. Wiley's policy on the confidentiality of the review process is available here.

Guidelines on Publishing and Research Ethics in Journal Articles

The journal requires that you include in the manuscript details IRB approvals, ethical treatment of human and animal research participants, and gathering of informed consent, as appropriate. In some cases the Editor-in-Chief may request specific evidence of animal or human ethics agreements awarded by local or national bodies. You will be expected to declare all conflicts of interest, or none, on submission. **Please review Wiley's policies surrounding human studies, animal studies, clinical trial registration, biosecurity, and research reporting guidelines.**

This journal follows the core practices of the **Committee on Publication Ethics**

(COPE) and handles cases of research and publication misconduct accordingly (<https://publicationethics.org/core-practices>).

This journal uses **iThenticate's CrossCheck** software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read [Wiley's Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors](#) and [Wiley's Publication Ethics Guidelines](#).

Figure screening policy: All figures submitted with a manuscript to *Cell Biochemistry and Function* are screened for image manipulation. In case manipulation is detected, the Author's Institution may be contacted.

Data reporting policies

Cell Biochemistry & Function has implemented stringent policies on data reporting to help ensure integrity of the research reported in the Journal and increase the transparency of the editorial processes. Not complying with the standards and policies explained below may be a reason for a rejection without further detailed comments or review. Authors must be prepared to show the entire underlying data for all results presented, whether they are specifically mentioned here or not.

Reporting Western Blots and other electrophoretic results

Providing unprocessed images for review is mandatory!

This journal requires authors of papers that present results of gel electrophoresis and/or blots to provide original unprocessed images for every result that has been used for display in the figures, for the journal's files. Authors should submit them as "Original Image" or may choose to publish the unprocessed images in the journal's Supporting Information section. **The journal will only consider manuscripts for review and publication if the authors have provided original unprocessed gel electrophoresis images.**

The uncut, original blot should be presented for each figure shown in the manuscript. All blots from the original materials should be clearly marked with regards to the figure number, and those elements used should be highlighted in the original materials using a dotted line to encircle the relevant band(s). **Requirements for gels and blots presented in the paper:**

All images must have sufficient **resolution and quality**. Rearranging bands, composing images from multiple experiments such as splicing lanes from multiple blots to fabricate a specific experimental outcome, image processing leading to a distortion of the originally contained information or similar operations and editing are **in general forbidden** and will lead to immediate rejection without further review. This behavior may be considered as scientific misconduct and lead to further investigation.

Molecular size markers should be included on each gel/blot and positive and negative controls must be included where relevant.

Replicates are necessary for all experiments including gels and blots, and authors should be prepared to submit them for review upon request. The number of repetitions should be clearly **indicated in the Figure legend**.

Quantitative and semi-quantitative blots

Quantification of Western blot/Protein expression data employing PC-based scanning software (e.g. AIDA image analyzer) **is mandatory for comparative analysis** (e.g. different concentrations of a drug used, or demonstration of the extent of a RNAi-based silencing). General statements of "higher" or "lower" expression level of a certain protein are not acceptable.

All quantifications must be performed on signals falling within the linear range of response (for example, bands used in quantification must not be overexposed or overloaded) and authors should be prepared to demonstrate it. Quantitative comparisons between different gels are discouraged; if they are being presented, this must be clearly indicated.

Conflict of Interest

Cell Biochemistry & Function requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to: patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

3. After Acceptance

First Look

After your paper is accepted, your files will be assessed by the editorial office to ensure they are ready for production. You may be contacted if any updates or final files are required. Otherwise, your paper will be sent to the production team.

Wiley Author Services

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with [Wiley Author Services](#). You will be asked to sign a publication license at this point as well as pay for any applicable APCs.

Copyright & Licensing

If a paper is accepted for publication, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

You may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or Open Access under the terms of a Creative Commons License. Standard re-use and licensing rights vary by journal. Note that certain funders mandate a particular type of CC license be used. This journal uses the CC-BY/CC-BY-NC/CC-BY-NC-ND Creative Commons License. Self-Archiving Definitions and Policies: Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions.

Proofs

Authors will receive an e-mail notification with a link and instructions for accessing HTML page proofs online as a pdf. Authors should also make sure that any renumbered tables, figures, or references match text citations and that figure legends correspond with text citations and actual figures. Proofs must be returned within 48 hours of receipt of the email.

Early View

Cell Biochemistry & Function offers rapid publication via Wiley's Early View service. **Early View** articles (first online Version of Record) are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue of the *Cell Biochemistry & Function*. Note there may be a delay after corrections are received before the article appears online, as the proofs are carefully reviewed. Once the article is published in Early View, no further changes to the article are possible. The Early View article is fully citable using the Digital Object Identifier (DOI) and carries an online publication date.

When an article is published online:

- The author will receive an email alert (if requested).
- Authors can share a link to their published article through social media.
- The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).
- For non-open access articles, the corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.

Article Promotion Support

Wiley Editing Services offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

4. Appendix Publication Charges

There are no mandatory charges to authors publishing in *Cell Biochemistry & Function*.

Authors may choose to publish in an open access format, which carries a fee (see the sections on Open Access and on Copyright & Licensing).

Resource Identification Initiative

The journal supports the Resource Identification Initiative, which aims to promote research resource identification, discovery, and reuse. This initiative, led by the Neuroscience Information Framework and the Oregon Health & Science University Library, provides unique identifiers for antibodies, model organisms, cell lines, and tools including software and databases. These IDs, called Research Resource Identifiers (RRIDs), are machine-readable and can be

used to search for all papers where a particular resource was used and to increase access to critical data to help researchers identify suitable reagents and tools.

You will be asked to use RRIDs to cite the resources used in your research where applicable in the text, similar to a regular citation or Genbank Accession number. For antibodies, you should include in the citation the vendor, catalogue number, and RRID both in the text upon first mention in the Methods section. For software tools and databases, please provide the name of the resource followed by the resource website, if available, and the RRID. For model organisms, the RRID alone is sufficient.

Additionally, you must include the RRIDs in the list of keywords associated with the manuscript.

To Obtain Research Resource Identifiers (RRIDs):

1. Use the Resource Identification Portal, created by the Resource Identification Initiative Working Group.
2. Search for the research resource (please see the section titled "Search Features and Tips" for more information).
3. Click on the "Cite This" button to obtain the citation and insert the citation into the manuscript text.

If there is a resource that is not found within the Resource Identification Portal, you are asked to register the resource with the appropriate resource authority. Information on how to do this is provided in the "Resource Citation Guidelines" section of the Portal. If any difficulties in obtaining identifiers arise, please contact rii-help@scicrunch.org for assistance.

Example Citations:

- Antibodies: "Wnt3 was localized using a rabbit polyclonal antibody C64F2 against Wnt3 (Cell Signaling Technology, Cat# 2721S, RRID: AB_2215411)"
- Model Organisms: "Experiments were conducted in *c. elegans* strain SP304 (RRID:CGC_SP304)"
- Cell lines: "Experiments were conducted in PC12 CLS cells (CLS Cat# 500311/p701_PC-12, RRID:CVCL_0481)"
- Tools, Software, and Databases: "Image analysis was conducted with CellProfiler Image Analysis Software, V2.0 (<http://www.cellprofiler.org>, RRID:nif-0000-00280)"

Species Names

Upon its first use in the title, abstract, and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species, and authority) in parentheses. For well-known species, however, scientific names may be

omitted from article titles. If no common name exists in English, only the scientific name should be used.

Genetic Nomenclature

Sequence variants should be described in the text and tables using both DNA and protein designations whenever appropriate. Sequence variant nomenclature must follow the current HGVS guidelines; see varnomen.hgvs.org, where examples of acceptable nomenclature are provided.

Sequence Data

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL, or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL, and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: 'These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345'.
Addresses are as follows:

- DNA Data Bank of Japan (DDBJ): www.ddbj.nig.ac.jp
- EMBL Nucleotide Archive: ebi.ac.uk/ena
- GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank

Proteins sequence data should be submitted to either of the following repositories:

- Protein Information Resource (PIR): pir.georgetown.edu
- SWISS-PROT: expasy.ch/sprot/sprot-top

Structural Data

For papers describing structural data, atomic coordinates and the associated experimental data should be deposited in the appropriate databank (see below). **Please note that the data in databanks must be released, at the latest, upon publication of the article.** We trust in the cooperation of our authors to ensure that atomic coordinates and experimental data are released on time.

- **Organic and organometallic compounds:** Crystallographic data should not be sent as Supporting Information, but should be deposited with the *Cambridge Crystallographic Data Centre* (CCDC) at ccdc.cam.ac.uk/services/structure%5Fdeposit.

- **Inorganic compounds:** Fachinformationszentrum Karlsruhe (FIZ; fiz-karlsruhe.de).
- **Proteins and nucleic acids:** Protein Data Bank (rcsb.org/pdb).
- **NMR spectroscopy data:** BioMagResBank (bmrw.wisc.edu).

Cover Image Submissions

This journal accepts artwork submissions for Cover Images. This is an optional service you can use to help increase article exposure and showcase your research. For more information, including artwork guidelines, pricing, and submission details, please visit the [Journal Cover Image page](#). [Wiley Editing Services](#) offers a professional cover image design service that creates eye-catching images, ready to be showcased on the journal cover.

General Style Points

The following points provide general advice on formatting and style.

- **Language:** *Cell Biochemistry & Function* uses US spelling; however, authors may submit using either option, as spelling of accepted papers is converted during the production process.
- **Abbreviations:** In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader. Initially, use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.
- **Units of measurement:** Measurements should be given in SI or SI-derived units. Visit the [Bureau International des Poids et Mesures \(BIPM\)](#) website for more information about SI units.
- **Numbers:** Numbers under 10 are spelt out, except for: measurements with a unit (8mmol/l); age (6 weeks old), or lists with other numbers (11 dogs, 9 cats, 4 gerbils).
- **Trade Names:** Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used. Drugs should be referred to by their generic names. If proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their generic name, mentioning the proprietary name and the name and location of the manufacturer in parentheses.