

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Eduardo Augusto Rabelo Socca

**EFEITOS DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS DE *Sambucus nigra* L.
SOBRE MODELO DE COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR TNBS**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Eduardo Augusto Rabelo Socca
Alba Monteiro Souza Brito
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Alba Regina Monteiro Souza Brito

Campinas

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

So13e	<p>Socca, Eduardo Augusto Rabelo Efeitos de antocianinas monoméricas de <i>Sambucus nigra</i> L. sobre modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS / Eduardo Augusto Rabelo Socca. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientadora: Alba Regina Monteiro Souza Brito. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Sambucus nigra</i>. 2. Antocianinas monoméricas. 3. Colite ulcerativa. 4. Ácido trinitrobenzenosulfônico. I. Brito, Alba Regina Monteiro Souza, 1954-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p>
--------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Titulo em inglês: Effects of *Sambucus nigra* L. monomeric anthocyanins on TNBS induced ulcerative colitis.

Palavras-chave em inglês: *Sambucus nigra*; Monomeric anthocyanins; Ulcerative colitis; Trinitrobenzenesulfonic acid.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Alba Regina Monteiro Souza Brito, Ana Paula Davel; Leônia Maria Batista.

Data da defesa: 13/01/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 13 de Janeiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito
(Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel


Assinatura

Profa. Dra. Leônia Maria Batista


Assinatura

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis

Assinatura

Profa. Dra. Máira Cola

Assinatura



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

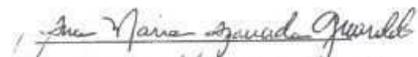
Certificamos que o Protocolo nº 1640-1, sobre "Investigação de dietas ricas em fibras e antioxidantes na proteção contra inflamação do intestino", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito / Eduardo Augusto Rabelo Socca, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 06 de outubro de 2008.

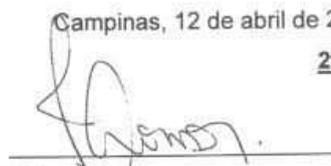
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1640-1, entitled "Investigation of dietary fiber and antioxidants in the protection against inflammatory bowel disease", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on October 6, 2008.

Campinas, 12 de abril de 2010.

2ª. via


Prof. Dra. Ana Maria A. Gualdo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus pais Ermelinda e Valter Socca.

Agradecimentos

À Deus por me dar forças e iluminar meu caminho nas horas difíceis.

Aos meus pais Ermelinda e Valter por serem os melhores exemplos que eu poderia pedir à Deus e por nunca me deixar desistir.

À minha irmã Ana Paula por sua força de vontade e dedicação para alcançar seus objetivos.

Ao meu avô Sebastião, o senhor faz muita falta em minha vida. Que o céu se ilumine com a sua presença.

Aos meus amigos Walter, Luana, Marcelo, Alessandra, Bianca pelo companheirismo de vocês.

À Dra. Alba pela oportunidade e apoio excepcional como orientadora e por tudo o que me ensinou. Não tenho como descrever o quanto lhe sou grato. Obrigada!

Aos meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais: Anderson, Aninha, Cibele, Chris, Erika, Felipe, Ricardo, Vinícius e Vitor. Sem a ajuda e apoio de vocês nada disso seria possível.

Ao Anderson, uma pessoa excepcional, um excelente amigo e um ótimo pesquisador. Obrigado por todo o apoio que você me deu ao longo desses anos.

À Aninha, uma pessoa brilhante. Não dá pra imaginar o Laboratório de Produtos Naturais sem a sua presença.

Aos docentes que compuseram a banca de exame de qualificação: Dr. Ana Paula, Dr. Dora e Dr. Claudio; suas observações foram muito importantes.

Aos professores Dr. Francesco Langone e Dra. Maria Cristina que muito me ensinaram durante meu processo de aprendizado.

Aos vendedores e amigos Tadeu e Lazinho, grandes companheiros.

Aos animais, por exercerem um papel fundamental no desenvolvimento da ciência.

E por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, que fomentou a realização desta Dissertação de Mestrado.

"O primeiro ponto de partida das boas finanças é o derramamento do ensino, a cultura extensiva e intensiva da mentalidade nacional. A base de todo o cálculo financeiro está na produção; e a produção é, no sentido mais científico, mais real, mais prático da palavra, é, para nos servirmos da expressão de Horace Mann, "obra da inteligência". Todos abstratamente estão dispostos a render homenagem a esta verdade; mas quase ninguém, neste país, lhe é fiel, ou sequer a compreende. De atestar que a educação é a matriz universal da felicidade humana, qualquer estadista nosso se honraria; mas transportem-se da retórica aos fatos, e verão que a frase não passa de um desses aforismos convencionais de mero aparato decorativo na eloquência dos oradores, e simples engodo na boca dos políticos, para armarem às simpatias da opinião, a quem são sempre aceitas as causas nobres, os sentimentos generosos. O de que precisamos, é de homens de estado, que se convençam efetivamente de que a suprema necessidade atual da pátria está na criação do ensino. O que falece aos nossos financeiros em geral é esse singelo rudimento da ciência das finanças: que o primeiro elemento de fertilização da terra consiste na fecundação do entendimento do povo; que a produtividade de um país está na razão direta da propagação da ciência entre os seus habitantes; que uma nação será sempre tanto mais pobre, quanto menos difundida se achar nas camadas populares a educação técnica e o saber positivo."

Obras Completas de Rui Barbosa.

V. 9, t. 1, 1882. p. 16

Sumário

Lista de Abreviaturas e siglas	XI
Lista de Tabelas	XIV
Lista de Figuras	XV
RESUMO	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doenças Inflamatórias Intestinais	1
a. Aspectos Gerais	1
b. Epidemiologia.....	3
c. Etiologia	4
c.1. Fatores genéticos	4
d. Mediadores Inflamatórios	9
e. Estresse Oxidativo.....	14
f. Terapêutica.....	17
f.1. Terapêutica convencional.....	18
f.2. Terapêutica emergente	19
f.3. Antioxidantes	19
1.1. Metabólitos secundários de plantas.....	20
a. <i>Sambucus nigra</i>	22
b. Antocianinas	23
2. Objetivos	25
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	26
3.1. Animais	26
3.2. Modelo Experimental	26
a. Preparação da fração de antocianinas monoméricas	26
b. Colite Aguda	27
c. Avaliação da lesão.....	28
d. Dosagem da concentração de Proteínas Totais de tecido cólico.....	28
3.3. Atividade antioxidante	28

a.	Avaliação da atividade antioxidante e redutora <i>in vitro</i>	28
a.1.	Capacidade de redução do radical DPPH	28
a.2.	Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC_{FL})	29
b.	Amostras	30
c.	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i>	30
c.1.	Quantificação da glutathione (GSH)	30
c.2.	Superóxido dismutase (SOD)	31
c.3.	Glutathione peroxidase (GPx)	31
c.4.	Glutathione redutase (GR)	31
c.5.	Mieloperoxidase (MPO)	32
c.6.	Índice de peroxidação lipídica (LPO)	32
c.7.	Catalase	33
d.	Quantificação de citocinas	33
3.4.	Análise Estatística	34
4.	Resultados	35
4.1.	Composição dos componentes fenólicos de <i>Sambucus nigra</i> e separação das antocianinas monoméricas	35
a.	Separação dos compostos fenólicos	35
b.	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	36
b.1.	Redução do radical DPPH	37
b.2.	Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC_{FL})	38
4.2.	Indução de colite experimental por TNBS	38
4.3.	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i>	41
a.	Quantificação de Glutathione (GSH)	41
b.	Atividade da glutathione redutase (GR)	44
c.	Atividade da Mieloperoxidase (MPO)	45
d.	Catalase	46
e.	Determinação do índice de peroxidação lipídica (LPO)	47
4.4.	Quantificação de citocinas	48
a.	Interleucina 10 (IL-10)	48
b.	Interleucina 12 (IL-12)	49
5.	Discussão	50

6.	Conclusões	61
7.	Perspectivas	62
8.	Bibliografia	63

Lista de Abreviaturas e siglas

5-ASA = Ácido 5-aminossalicílico

6-MP = 6-mercaptopurina

AAPH = 2,2 azobis amidinopropano

AGCC = ácidos graxos de cadeia curta

ANOVA = análise de variância de uma via

AZA = azationina

CAT = catalase

CEIs = células epiteliais intestinais

COX = cicloxigenase

DAINES = drogas anti-inflamatórias não esteroidais

DC = doença de Crohn

DII = doenças inflamatórias intestinais

DMSO = Dimetilsulfóxido

DNA = ácido desoxirribonucléico

dp = desvio padrão

DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

dsRNA = RNA de fita dupla

DTNB = ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)

EC₅₀ = concentração mínima para obter 50% do efeito

EDTA = ácido etileno-diamino tetra acético

EGCG = epigalocatequina galato

e.p.m. = erro padrão da média

EROs = espécies reativas de oxigênio

GPx = enzima glutathiona peroxidase

GR = enzima glutathiona redutase

GSH = glutathiona na forma reduzida

GSSG = glutathiona na forma oxidada

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

HOCl = ácido hipocloroso

ICAM-1 = molécula de adesão intracelular-1

IKK = IκB quinase

iNOS = óxido nítrico sintase induzida

L• = radical lipídico

LOOH = peróxido lipídico

LPO = peroxidação lipídica

LPS = lipopolissacarídeos

MadCam-1 = moléculas de adesão celular e adressina mucosa-1

MAPK = proteína quinase ativadora de mitógeno

MDA = Malondialdeído

MEIs = manifestações extra-intestinais

MPO = mieloperoxidase

NADPH = β- nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NBT = nitrobluetetralium

NFκB = fator nuclear kappa B

NO = óxido nítrico

NOD = domínio de oligomerização de nucleotídeos

O_2^- = ânion superóxido

$OH\bullet$ = radical hidroxila

ORAC = capacidade de absorção de radicais de oxigênio

PGE_2 = prostaglandina tipo E_2

PRPs = padrões de reconhecimento de patógenos

RCUI = retocolite ulcerativa idiopática

RNA = ácido ribonucléico

RNAm = RNA mensageiro

SDS = dodecil sulfato sódico

SOD = enzima superóxido dismutase

ssRNA = RNA de fita simples

TBARS = espécies reativas do ácido tiobarbitúrico

Te = transferência de elétrons

TE = valor trolox equivalente

TEPP = tetraeoxipropano

TGI = trato gastrintestinal

TLR = receptores *Toll-like*

TNBS = ácido 2,4,6 trinitrobenzeno sulfônico

TNFRs = receptores para TNF

Lista de Tabelas

Tabela 1. Diferenças e semelhanças entre RCUI e DC.....	2
Tabela 2. Sistemas extraintestinais envolvidos com DII.....	3
Tabela 3. Cromossomos associados às DII e os possíveis genes expressos.	5
Tabela 4. Características espectrais dos pigmentos antocianicos isolados. (a) Harborne (1962); (b) Yoshitama (1981); (c) Du <i>et al.</i> (1975); (d) Du <i>et al.</i> (1975);.....	36
Tabela 5. Efeito da administração da doses crescentes das antocianinas monoméricas dos frutos de <i>Sambucus nigra</i> sobre lesão intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em media \pm erro padrão da média (epm) para a relação peso/comprimento e mediana para o score, ^a p<0,001 versus Grupo Salina e ^b p<0,05 versus grupo TNBS.....	39

Lista de Figuras

Figura 1. Fatores etiológicos ambientais envolvidos no desenvolvimento e manutenção das DII.	6
Figura 2. Vias de sinalização dos receptores do tipo <i>Toll</i> . Adaptado de Testro & Visvanathan, 2009.....	13
Figura 3. Representação esquemática da ação de enzimas antioxidantes.....	17
Figura 4. Fração de antocianinas monoméricas; eluição feita com metanol: HCl (999:1 v/v); $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 529 nm (A_{529} nm).....	36
Figura 5. Potencial redutor da fração de antocianinas monoméricas de <i>Sambucus nigra</i> sobre o radical DPPH. Dados expressos em média \pm dp.....	37
Figura 6. Potencial redutor da fração de antocianinas monoméricas de <i>S. nigra</i> sobre o radical AAPH.....	38
Figura 7. Região cólica após inflamação induzida por TNBS. Os animais receberam solução salina ou tratamento com fração de antocianinas monoméricas de <i>S nigra</i> , em diferentes doses, nos tempos 48h, 24h e 1h antes da indução.....	40
Figura 8. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg ⁻¹ das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre a concentração de GSH no intestino de ratos submetidos à modelo de colite induzido por TNBS. Dados expressos em média \pm e.p.m. ANOVA, seguido de teste de Tukey.	41
Figura 9. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg ⁻¹ das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no intestino de ratos submetidos à modelo de colite induzido por TNBS. Dados expressos em média \pm epm. ANOVA, seguido de teste de Tukey.....	42
Figura 10. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg ⁻¹ das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre a atividade da enzima GPx no intestino de ratos submetidos à modelo de colite induzido por TNBS. Dados expressos em média \pm epm. ANOVA, seguido de teste de Tukey.	43

Figura 11. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg ⁻¹ das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre a atividade da enzima glutathione reductase (GR), no intestino de ratos submetidos à modelo de colite induzido por TNBS. Dados expressos em média ± e.p.m. ANOVA, seguido de teste.....	44
Figura 12. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg ⁻¹ das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre a atividade da enzima MPO no intestino de ratos submetidos à modelo de colite induzido por TNBS. Dados expressos em média ± e.p.m. ANOVA, seguido de teste de Tukey.	45
Figura 13. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg ⁻¹ das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre a atividade da enzima catalase no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS. dados expressos em média e.p.m. ANOVA seguida de teste de Tukey.	46
Figura 14. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg ⁻¹ das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre os níveis de peróxido lipídico, avaliados nos termos de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), no intestino de ratos submetidos à modelo de colite induzido por TNB.....	47
Figura 15. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg ⁻¹ das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre a produção de IL-10 no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS. Dados expressos em média ± e.p.m. ANOVA seguido de teste de Tukey.....	48
Figura 16. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg ⁻¹ das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre a produção de IL-12 no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS. Dados expressos em média ± e.p.m. ANOVA seguido de teste de Tukey.....	49

RESUMO

Retocolite ulcerativa idiopática e doença de Crohn são doenças inflamatórias intestinais caracterizadas por inflamação crônica da mucosa, resultando em diarreia, fezes sanguinolentas, dores abdominais, anemia, febre, fadiga e perda de peso, tanto em homens quanto em mulheres. Acredita-se que essas manifestações sejam resultado de uma interação multifatorial envolvendo indivíduos geneticamente susceptíveis, condições ambientais específicas, desbalanço na microflora intestinal e desajuste da resposta imune. Drogas derivadas do ácido 5-aminossalicílico (sulfassalazina, mesalamina), corticosteróides e agentes imunomoduladores são utilizadas, em conjunto no tratamento dessas patologias. No entanto tais drogas apresentam efeitos adversos importantes, o que acaba por motivar pesquisas envolvendo produtos naturais como alternativas de tratamento. Neste contexto, este trabalho avaliou os efeitos de antocianinas presentes nos frutos de *Sambucus nigra* L. (sabugueiro), espécie arbustiva pertencente à família Adoxaceae, em modelo de colite ulcerativa induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Os frutos do sabugueiro apresentam grandes concentrações de metabólitos secundários como antocianinas, além de outros compostos fenólicos, que acabam por conferir aos frutos propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e laxativas. Neste trabalho, foram avaliadas as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias da fração de antocianinas monoméricas presentes nos frutos de *S. nigra*. Os resultados comprovaram o efeito antioxidante *in vitro* das antocianinas, sendo elas eficazes em reduzir tanto o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), teste que avalia a redução do radical via transferência de elétrons, quanto a taxa de oxidação do radical 2,2 azobis amidinopropano (AAPH), teste que verifica a oxidação do radical via transferência de átomos de hidrogênio. Nos ensaios *in vivo* concluiu-se que a dose de 5mg.Kg⁻¹ de antocianinas apresentou a

melhor resposta em reduzir a lesão causada pelo TNBS, sendo efetiva em manter os níveis de GSH ($5,709 \pm 0,931$) comparado ao grupo TNBS ($0,8525 \pm 0,298$) e ao grupo salina ($6,610 \pm 3,926$). Essas antocianinas foram efetivas ainda em aumentar a atividade da SOD ($8,487 \pm 2,505$), quando comparada com o grupo TNBS ($3,884 \pm 0,925$) e ao grupo salina ($12,240 \pm 4,199$), e reduzir a atividade da MPO ($4,519 \pm 2,016$), quando comparada ao grupo TNBS ($7,572 \pm 2,572$) e ao grupo salina ($1,314 \pm 0,319$). Os resultados obtidos na avaliação da atividade das enzimas GPx ($17,03 \pm 3,951$ no grupo tratado e $22,13 \pm 11,510$ no grupo TNBS) e GR ($0,6524 \pm 0,1180$ no grupo tratado e $0,7249 \pm 0,3968$ no grupo TNBS), comparados ao grupo salina ($84,22 \pm 41,88$) e ($2,131 \pm 0,9858$) respectivamente, indicam que houve queda na ativação destas enzimas após 24h de indução da colite, sendo que esta situação não foi revertida após administração das antocianinas. Do mesmo modo não foram encontradas alterações nos níveis de LPO ($5,756 \pm 1,884$ no grupo tratado e $5,113 \pm 0,8254$ no grupo TNBS) comparados ao grupo salina ($4,688 \pm 1,126$). Já os ensaios anti-inflamatórios revelaram atividade anti-inflamatória promissora, visto que as antocianinas foram capazes de manter os níveis de IL-10 ($466,7 \pm 56,32$) próximos àqueles obtidos no grupo não-colítico ($492,4 \pm 154,5$), quando comparados ao grupo TNBS ($264,8 \pm 66,35$), e de reduzir a produção de IL-12 ($202,3 \pm 53,33$) quando comparados com os animais não tratados ($319,3 \pm 111,5$) e ao grupo salina ($149,8 \pm 51,76$). Neste estudo concluiu-se que as antocianinas presentes nos frutos de sabugueiro apresentam atividade antioxidante, além de aumentar os níveis de IL-10, citocina essa que, provavelmente, participa na redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e, conseqüentemente, a expressão de mediadores inflamatórios.

ABSTRACT

Ulcerative colitis and Crohn's disease are inflammatory bowel disease characterized by chronic inflammation of the mucosa, resulting in diarrhea, bloody stools, abdominal pain, anemia, fever, fatigue and weight loss in both men and women. It is believed that these manifestations are the result of a multifactorial interaction involving genetically susceptible individuals, environmental conditions, imbalance in intestinal microflora and immune response imbalance. Drugs derived from 5-aminosalicylic acid (sulfasalazine, mesalamine), corticosteroids and immunomodulatory agents are used together to treat these diseases. However, such drugs have significant adverse effects, which ultimately motivate research involving natural products as alternative treatments. In this context, this study evaluated the effects of anthocyanins in the fruits of *Sambucus nigra* L. (Elderberry), shrub species belonging to the family Adoxáceae, in a model of ulcerative colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzenes sulfonic acid (TNBS). The fruits of elderberry have large concentrations of secondary metabolites such as anthocyanins and other phenolic compounds, which ultimately give the fruit antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory and laxative properties. In this study we investigated the antioxidant and anti-inflammatory properties of the monomeric anthocyanins fraction in the fruits of *S. nigra*. The results confirmed the *in vitro* antioxidant effect of anthocyanins, which were effective in reducing both the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) test to evaluate the reduction of the radical via electron transfer and the rate of oxidation 2,2 azobis amidinopropane (AAPH), a test that checks radical oxidation via the transfer of hydrogen atoms. *In vivo* tests concluded that the dose of anthocyanins 5mg.Kg⁻¹ had the best response to reduce the damage caused by TNBS, being effective in maintaining the levels of GSH (5.709 ± 0.931) compared to TNBS group ($0, 8525 \pm 0.298$) and the saline group (6.610 ± 3.926). These anthocyanins were also effective in

increasing the activity of SOD (8.487 ± 2.505) compared with the TNBS group (3.884 ± 0.925) and the saline group (12.240 ± 4.199), and reduce the activity of MPO (4.519 ± 2.016) when compared to TNBS group (7.572 ± 2.572) and the saline group (1.314 ± 0.319). The results obtained in the enzymatic activities of GPx (17.03 ± 3.951 in the treated group and 22.13 ± 11.510 in group TNBS) and GR (0.6524 ± 0.1180 in the treated group and 0.7249 ± 0.3968 TNBS group) compared to saline group (84.22 ± 41.88) and (2.131 ± 0.9858) respectively, indicate that there was a decrease in the activation of these enzymes after 24h of colitis induction. Likewise there were no changes in the levels of LPO (5.756 ± 1.884 in the treated group and 5.113 ± 0.8254 in group TNBS) compared to saline group (4.688 ± 1.126). The anti-inflammatory assays have shown promising anti-inflammatory activity, whereas anthocyanins were able to maintain levels of IL-10 (466.7 ± 56.32) than those obtained in non-colitis group (492.4 ± 154 , 5), when compared to TNBS group (264.8 ± 66.35), and reduce the production of IL-12 (202.3 ± 53.33) compared with untreated animals (319.3 ± 111 , 5) and the saline group (149.8 ± 51.76). In this study it was concluded that anthocyanins present in elderberry fruits have antioxidant activity, and increased levels of IL-10, this cytokine, which probably participates in reducing levels of proinflammatory cytokines such as IL-12 and consequently the expression of inflammatory mediators.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Inflamatórias Intestinais

a. Aspectos Gerais

O termo Doença Inflamatória Intestinal (DII) é genérico e engloba patologias como retocolite ulcerativa idiopática (RCUI) e doença de Crohn (DC). Apesar de ambas apresentarem alguns sintomas semelhantes, são consideradas doenças distintas. As DII são manifestações inflamatórias de etiologia desconhecida, que variam quanto aos períodos de atividade e remissão (de Araujo Burgos *et al.*, 2008). A sintomatologia principal das DII envolve inflamação crônica da mucosa intestinal que resulta em diarreia, fezes sanguinolentas, dores abdominais, anemia, febre, fadiga e perda de peso (Tabela 1) (Head & Jurenka, 2003). Conforme Cho & Abraham (2007) as DII são diferenciadas pela distribuição da inflamação intestinal, de acordo com: localização da lesão (RCUI é restrita ao cólon e DC acometendo qualquer porção do trato gastrointestinal), distribuição (difusa na RCUI e irregular e descontínua na DC) e acometimento do tecido (restrito à mucosa e submucosa na RCUI; envolvimento transmural na DC).

Atualmente, a hipótese mais aceita sobre as causas primárias das DII é aquela que envolve uma etiopatologia multifatorial, ou seja, envolvimento de fatores genéticos e ambientais, microflora intestinal e resposta imune irregular (de Araújo Burgos *et al.*, 2008). Como resultado, observa-se aumento no número de células inflamatórias presentes nas áreas intestinais afetadas, o que resulta em superprodução de mediadores pro-inflamatórios como eicosanóides, fatores de ativação plaquetária, citocinas e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Luchini *et al.*, 2008).

Tabela 1. Diferenças e semelhanças entre RCUI e DC.

	RETocolite Ulcerativa Idiopática	Doença de Crohn
Área afetada	Qualquer parte da mucosa cólica, de extensão contínua, sem partes de tecido não lesionado	Pode afetar qualquer porção do trato gastrointestinal, incluindo o cólon, com porções de tecido não afetado
Diarréia	Normalmente quatro episódios por dia	Normalmente quatro episódios por dia
Dores abdominais/ cólicas	Dores abdominais suaves, cólicas suaves	Dores abdominais moderadas a severas
Fezes sanguinolentas	Quantidade depende da severidade da doença	Quantidade depende da severidade da doença
Fadiga	Devido à anemia e perda de sangue	Devido à anemia, perda de sangue e baixa absorção de nutrientes
Febre	Leve nos casos mais severos	Leve nos casos mais severos
Exame físico	Irritação perianal, fissuras, hemorróidas, fístulas e abscessos	Irritação peritoneal, massa abdominal ou pélvica
Perda de peso/ anorexia	Aumentada nos casos mais severos	Comum devido à má digestão e absorção intestinal
Apetite	Muitas vezes reduzido durante os períodos de exacerbação da doença	Muitas vezes reduzido durante os períodos de exacerbação da doença
Risco de câncer de cólon	Alto	Alto

Adaptado de Head & Jurenka, 2003

Juntamente com essas causas multifatoriais, há a participação de manifestações extra-intestinais (MEIs) no desenvolvimento das DII (tabela 2). Estas MEIs acometem entre 21 e 36% dos pacientes. Neste caso, essas MEIs são severas e podem atingir o sistema gastrintestinal, de modo que as DII seriam classificadas como doenças sistêmicas com manifestações intestinais predominantes (Ardizzone *et al.*, 2008).

Tabela 2. Sistemas extraintestinais envolvidos com DII

Hepatobiliares	
Músculo-esqueléticas	} trípade mais comum
Dermatológicos	
Ocular	
Genito-urinário	
Vasculares e hematológicos	
Cardíaco	
Pulmonar	
Endócrinas e metabólicas	

Adaptado de Ardizzone *et al.*, 2008

b. Epidemiologia

Nas últimas décadas houve aumento nas taxas de incidência das DII, principalmente nas áreas mais industrializadas; tal aumento tem ocorrido, de forma significativa, primeiramente na Europa com 2,2 milhões de casos confirmados, seguido dos Estados Unidos com 1,4 milhões (Loftus *et al.*, 2004). No Brasil, ainda são consideradas doenças de baixa incidência, mas de aumento significativo nas últimas décadas, principalmente na região Sudeste do país (Souza *et al.*, 2008). Os dados epidemiológicos sugerem, assim, que o estilo de vida (proximidade às áreas industrializadas) é um fator de risco para as DII, com os países mais industrializados em destaque. Além disso, estes estudos revelaram que a RCUI é mais comum que DC nos países do leste europeu e América do Norte (Vatn, 2009).

A distribuição das DII não apresenta diferenças estatísticas entre homens e mulheres, sendo os povos caucasianos os mais susceptíveis. (Head & Jurenka, 2003). Já a distribuição de idade entre os pacientes com DC e RCUI é de caráter bimodal, sendo que a incidência têm início na infância, atingindo seu primeiro pico (entre 20 e 30 anos); após esse período, a doença fica em estado intermitente até atingir seu segundo pico (entre 60 e 80 anos). O primeiro pico se apresenta mais acentuado na DC, enquanto o segundo pico é mais acentuado na RCUI (Sonnenberg, 2010).

c. Etiologia

No intuito de desenvolver terapias mais eficientes, o estudo com modelos animais, análises diretas em tecidos humanos, identificação dos genes susceptíveis e um reconhecimento amplo dos fatores ambientais envolvidos na patogênese das DII estão sendo utilizados. Tais estudos permitiram a elaboração de diversas hipóteses sobre as vias de ativação da doença e alvos terapêuticos, além do desenvolvimento de novos fármacos (Mayer, 2010). Tais fatores genéticos e ambientais são considerados importantes na etiologia das DII.

c.1. Fatores genéticos

Diversos esforços têm sido feitos para determinar os fatores genéticos, gerais e específicos, envolvidos no desenvolvimento das DII (Cho & Abraham, 2007). Grande parte do que é conhecido sobre mecanismos genéticos relacionados às DII é derivado da alta frequência de casos de DC entre gêmeos monozigóticos. Sabe-se atualmente que existem evidências entre a manifestação da doença e a presença de casos familiares, sugerindo que os fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento e manutenção dessas DII ainda não foram bem estabelecidos (Vatn, 2009).

Na investigação genética, alguns *loci*, em diversas regiões cromossômicas, foram apontados por Cho e Abraham (2007) como apresentando genes susceptíveis às DII e nove cromossomos foram apontados, sugerindo a subclassificação das DII de 1 a 9 (DII1 a 9); além disso, dos nove cromossomos, dois têm sido bem estudados: o

cromossomo 16q12 associado ao gene Nod2 (domínio de oligomerização de nucleotídeos 2) e o cromossomo 5q31 associado aos genes OCTN1 e OCTN2 (Tabela 3). Outros cromossomos associados ao desenvolvimento e manutenção das DII são o cromossomo 6p, associado ao gene HLA, e os cromossomos 12, 14q11-12, 1p36, 16p e 3p36 (Lesage et al., 2000; Dechairo et al., 2001; Cho & Abraham, 2007).

Tabela 3. Cromossomos associados às DII e os possíveis genes expressos.

	Cromossomo	Gene associado
DII1	16q12	Nod2
DII2	12	
DII3	6p	HLA
DII4	14q11-12	
DII5	5q31	OCTN1 e OCTN2
DII7	1p36	
DII8	16p	
DII9	3p26	

Fonte: Cho & Abraham, 2007

Outra importante família gênica a ser citada são os genes para receptores do tipo *Toll* (TLRs). Os TLRs são receptores transmembrana presentes nas membranas celulares (TLR1, 2, 4, 5 e 9) ou em organelas intracelulares (TLR3, 7 e 8), sendo expressos no trato gastrintestinal (TGI) ou nas células epiteliais intestinais (CEIs), miofibroblastos, células enteroendócrinas e nas células imunes da lamina própria, como as células T e células dendríticas (Levin & Shibolet, 2008); a função dos TLRs é identificar padrões de reconhecimento de patógenos (PRPs) e desencadear a resposta imune à esses PRPs através da sinalização de transcrição de citocinas e interferons (Takeuchi & Akira, 2010).

c.2. Fatores ambientais

Outra importante influência no desenvolvimento das DII está relacionada às interações ambientais dos indivíduos. Estudos epidemiológicos, cada vez mais, têm revelado fatores que influenciam o início das DII ou modificam seu curso, sem apontar uma causa específica. O que se notou nos últimos anos foi que um desbalanço no sistema imune pode ser causado por diversos fatores ambientais. O fumo, infecções bacterianas ou virais e o uso de antibióticos têm sido apontados como possíveis determinantes no desenvolvimento das DII, tanto RCUI quanto DC (Figura 1) (Moum, 2000).

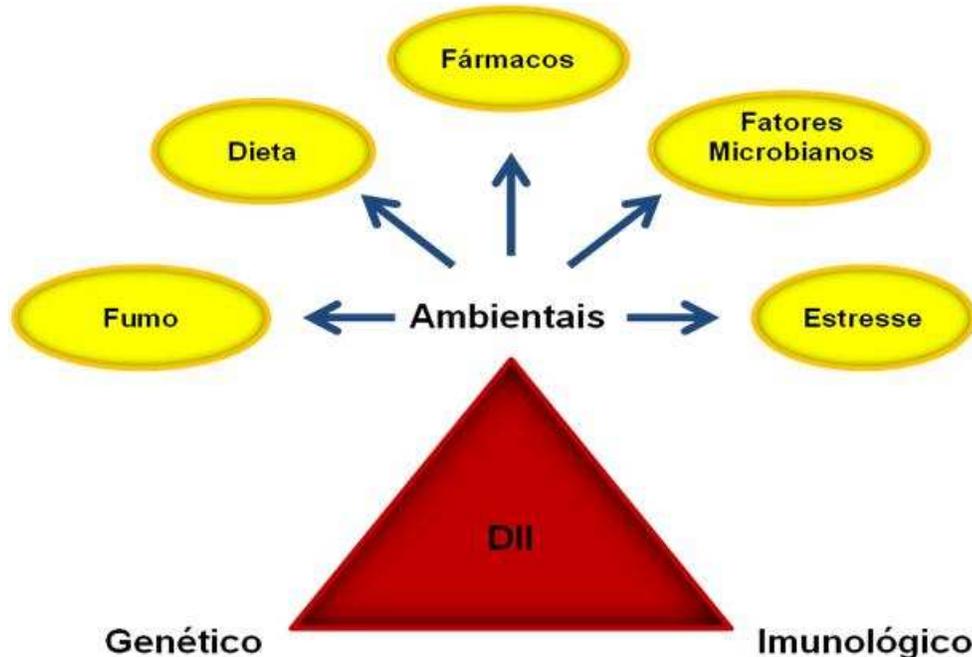


Figura 1. Fatores etiológicos ambientais envolvidos no desenvolvimento e manutenção das DII.

De acordo com Head & Jurenka (2003), pacientes com RCUI ou DC apresentam a mucosa intestinal prejudicada, o que leva a um aumento de sua permeabilidade. Nos últimos anos, muitos microorganismos vêm sendo sugeridos como possíveis

causadores das DII; destes destacam-se a *Yersinia*, aparecendo diversas vezes como causadora de DC devido ao fato dos sintomas iniciais de uma infecção por *Yersinia* se assemelharem a sintomas de DC. Em adição, tem-se *Campylobacter*, *Clostridium*, *Chlamidias*, *Proteus*, *Pseudomonas* *Shigella* e alguns outros microorganismos suspeitos como primeiros agentes infecciosos (Karlinger *et al.*, 2000).

Outro importante fator ambiental a ser considerado é o estresse. Até o momento, poucos foram os estudos realizados correlacionando efeitos psicológicos e desenvolvimento das DII ou sua manutenção. Dentre estes, destacam-se levantamentos de casos, entrevistas com pacientes e relatos de casos, cogitam uma possível relação entre as DII e o estado de estresse, mas não há comprovação científica suficiente (Camara *et al.*, 2009). Atribui-se ao estresse a manutenção do processo inflamatório, em virtude das reações bioquímicas desencadeadas (Li *et al.*, 2004).

Por ser uma enfermidade que acomete o trato gastrointestinal, muitos autores investigam a hipótese de haver relação entre hábitos alimentares e desenvolvimento ou agravamento das DII. Estudos realizados em diferentes países europeus apontaram alguns alimentos como fatores de risco para o desenvolvimento e manutenção das DII; dentre os alimentos citados, encontra-se açúcar refinado, carboidratos totais, amido, sacarose e *fast foods*. Já o consumo de gorduras mono e poli-insaturadas foi associado somente à RCUI. Por outro lado, o consumo de café, frutas, verdura e fibras foram apontados como fatores preventivos no desenvolvimento das DII (Person *et al.*, 1992; Tragnone *et al.*, 1995; Reif *et al.* 1997; Geerling *et al.*, 2000; Sicilia *et al.*, 2009).

Por serem associadas a uma variedade de MEIs, diversos tratamentos para tais manifestações envolvem utilização de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINEs). Paradoxalmente, o uso dessas DAINEs em pacientes com DII resulta em

agravamento dos sintomas da inflamação intestinal. Ibuprofeno, naproxeno, ácido flufenâmico e ácido mefenâmico são algumas DAINEs que agravariam as DII (Head & Jurenka, 2003). De acordo com Feagins & Cryer (2010), o mecanismo envolvido está relacionado ao seu efeito sistêmico sobre a síntese das prostaglandinas, que são reguladas pelas enzimas ciclooxigenases (COX); McCartney e colaboradores (1999) demonstraram que a síntese de prostanóides de classe E e I em pacientes com DII é dependente da atividade de COX-2, sendo a expressão dessa enzima ou sua tradução inibidas na presença de DAINEs.

A toxicidade das DAINEs sobre o intestino delgado e cólon está relacionado aos efeitos diretos da droga sobre a mucosa. O uso crescente das DAINEs, com o intuito de minimizar os efeitos de lesões extratintestinais, pode deixar a mucosa gastrintestinal fragilizada, deixando-a susceptível a danos. A exposição da mucosa intestinal às DAINEs pode levar à perda da integridade intracelular e ao aumento da permeabilidade, já que estas danificam os fosfolípidios de membrana, além de interferir na fosforilação oxidativa (Feagins & Cryer, 2010).

Outro importante fator ambiental a ser discutido é a influência do tabaco sobre as DII. A relação entre o desenvolvimento da doença ou sua recorrência e o hábito de fumar é complexo. Estima-se que 50% dos pacientes com DC sejam fumantes, em sua maioria mulheres, enquanto que o percentual de fumantes com RCUI é relativamente menor, variando entre 11% a 23% (Birrenbach & Böcker, 2004). Os possíveis mecanismos envolvidos na relação tabaco – DII incluem mudanças na imunidade humoral e celular, alterações dos níveis de citocinas e eicosanóides, motilidade intestinal, permeabilidade intestinal, alteração no fluxo sanguíneo, muco cólico e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo a nicotina a molécula ativa suspeita de participar em tais mecanismos (Karban & Eliakim, 2007).

É sabido que o tabagismo modula mecanismos de imunidade celular e humoral, envolvendo também o sistema imune intestinal. Baixos níveis de imunoglobulina-A são encontrados tanto na saliva quanto nas secreções intestinais de fumantes, quadro esse, reversível após cessado o hábito de fumar (Birrenbach & Böcker, 2004).

O tabaco tem grande capacidade de gerar radicais livres de oxigênio, resultando em redução da capacidade antioxidante. Os efeitos depressores do ácido 2,4,6 trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) sobre os níveis de glutatona celular foram reduzidos após exposição à fumaça de cigarro. Por outro lado, o aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) em modelo de RCUI induzida por TNBS foi atenuado. Tal evidência sugere que a exposição à fumaça de cigarro diminui a atividade de sequestro de radicais livres no tecido cólico (Birrenbach & Böcker, 2004).

d. Mediadores Inflamatórios

Com média de 10^{11} bactérias por grama de tecido, incluindo pelo menos 395 filas e antígenos ingeridos, o tecido epitelial do trato gastrointestinal é um ambiente que sofre constante ataque por parte desses imunógenos, que provocam inflamações leves nos tecidos saudáveis. Para manter a homeostase, o trato gastrointestinal se vale de um epitélio cólico com função de barreira mecânica, além de uma flora comensal supressora do processo inflamatório e expressão de peptídeos antimicrobianos (Zenewicz *et al.*, 2009).

O contato entre organismos potencialmente patógenos e o epitélio intestinal, resulta na ativação de linfonodos mesentéricos, folículos linfóides nos sítios indutivos, epitélio e lamina própria subjacente nos sítios efetores (Garret *et al.*, 2010) e liberação de citocinas, como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral

alfa (TNF- α). Essas citocinas induzem a expressão de moléculas de adesão nas paredes das células endoteliais vasculares, às quais neutrófilos, monócitos e linfócitos se ligarão, permitindo aumento da permeabilidade e induzindo coagulação. Outras citocinas que participam deste processo são a interleucina-8 (IL-8) e o interferon- γ (IFN γ), aumentando quimiotaxia para leucócitos e fagocitose. Todos esses efeitos resultam em edema e acúmulo de células leucocitárias nas áreas afetadas (Benjamini, Coico & Sunshine, 2002).

Uma das principais fontes de citocinas são as células T *helper* (T_{H1} e T_{H2}), diferenciadas a partir de células T CD4. Durante a resposta imune inicial, os antígenos têm papel-chave na escolha da via de diferenciação de células T_{H0} indiferenciadas. A quantidade e o tipo de antígeno apresentado para essas células, durante a estimulação primária, também influencia o desenvolvimento dos subgrupos T_{H1} e T_{H2}. (Benjamini, Coico & Sunshine, 2002).

Até pouco tempo as DII eram classificadas de forma simplista em inflamações mediadas por células T_{H1} ou T_{H2}; acreditava-se que a RCUI fosse impulsionada por uma resposta exacerbada de T_{H2}, emergindo de altos níveis de IL-4 e IL-13. Em contrapartida, a DC era vista como sendo impulsionada por uma resposta exacerbada de T_{H1} e altos níveis de IFN γ . Recentemente, foram descobertas as chamadas células T_{H17} associadas à defesa contra agentes infecciosos, assim como na proteção contra inflamações crônicas (Zenewicz *et al.*, 2009; Shen & Durum, 2009).

A diferenciação de T_{H0} em T_{H1} se dá na presença de IL-12, uma citocina do sistema imune inato altamente expressa por macrófagos e células dendríticas. Estas células secretam altos níveis de IFN γ , importantes na ativação de macrófagos, e IL-12,

(Zenewicz *et al.*,2009). Além disso, são responsáveis pela secreção de IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-18 e TNF- α (Neuman, 2004; Benjamini, Coico & Sunshine, 2002).

Já a presença de IL-4 resulta na diferenciação de T_H2 e aumento da produção de IL-4. As células T_H2 produzem uma variedade de citocinas com funções distintas, dentre elas estão IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-25 (Zenewicz *et al.*,2009; Abbas & Lichtman, 2005; Benjamini, Coico & Sunshine, 2002).

Para o reconhecimento dos antígenos potencialmente patógenos, as células se valem de uma importante família de receptores, os receptores *do tipo Tol* (TLRs), com 11 diferentes receptores já identificados em mamíferos. A função dos TLRs é preparar o sistema imune inato com considerável especificidade para uma vasta quantidade de patógenos microbianos, fornecendo ao hospedeiro um sistema de resposta imediata a esses microbios. Além disso, é atualmente aceito que a resposta imune inata é um pré-requisito fundamental para desencadear a resposta imune adaptativa (Levin & Shibolet, 2008; Testro & Visvanathan, 2009). Os principais TLRs são TLR4, TLR5, TLR6, TLR1 e TLR2, na membrana plasmática e TLR3, TLR7/TLR8 e TLR9, localizados em membranas intracelulares. Como pode ser visto na figura 2, de todos os TLR, somente TLR4 é ativado na presença de lipopolissacarídeos (LPS) e tem por finalidade estimular expressão de interferons tipo 1 e produção de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12p40 através da expressão do NF κ B (Takeda & Akira, 2004; Testro & Visvanathan, 2009).

Tanto o TLR1 quanto o TLR6 se associam à TLR2 podendo reconhecer bactérias Gram-positivas e lipoproteínas, culminando com a expressão do NF κ B e, conseqüentemente, com produção de TNF- α , IL-1 e IL6. Por sua vez, TLR5 reconhece a flagelina (proteína presente nos flagelos), induzindo a degradação de I κ B e, por

consequência, ativando NFκB, o que resulta na expressão de IL-8 e da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Cario E. 2008; McNeilly *et al.*, 2010).

Já TLR3 é ativado em resposta a presença de um RNA dupla fita (dsRNA); tal ativação resulta na sinalização, principalmente, de NFκB, levando à expressão de interferons tipo 1, à produção de IL-6, IL-12 e TNF-α e à maturação de células dendríticas (Botos *et al.*, 2009; Alexopoulou *et al.*, 2001; Matsumoto & Seya, 2008). Já TLR7 e TLR8 são responsivos ao RNA de fita simples (ssRNA) presente em vírus, assim como RNAs de algumas bactérias como as do grupo B Streptococcus, o que resulta novamente na expressão de interferons tipo 1 e do NFκB que, por sua vez, induz a produção de citocinas pró-inflamatórias (Takeuchi & Akira, 2010; Guiducci *et al.*, 2008). Por fim, o reconhecimento de dinucleotídeos CpG não-metilados presentes em DNA bacteriano e viral, se dá pelo TLR9; a sinalização desta via culmina novamente na expressão de interferons tipo 1 (O'Neill *et al.*, 2009).

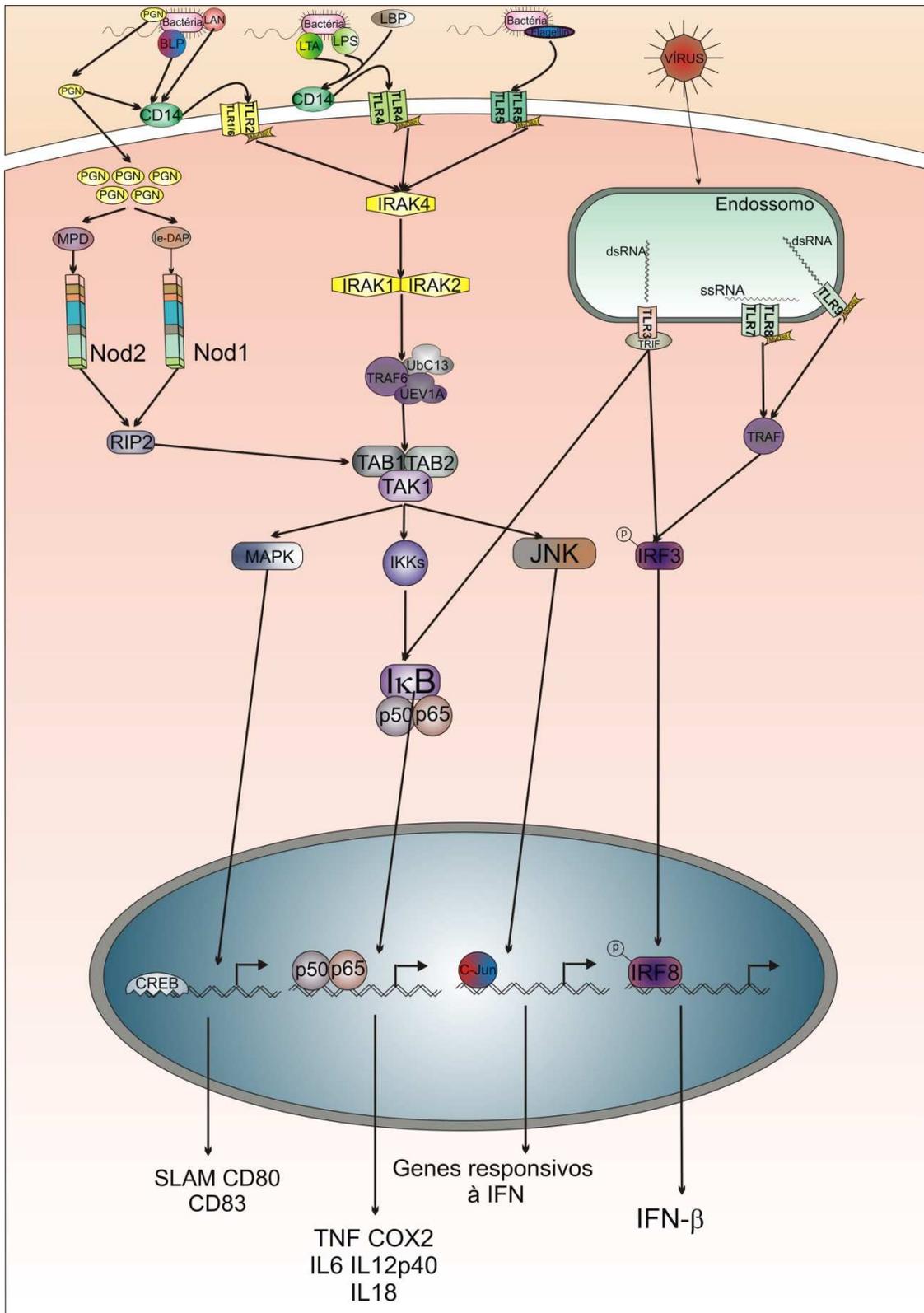


Figura 2. Vias de sinalização dos receptores do tipo Toll. Adaptado de Testro & Visvanathan, 2009.

e. Estresse Oxidativo

A fase de migração e acúmulo de células inflamatórias resulta na superprodução de mediadores inflamatórios, como a enzima mieloperoxidase (MPO), que catalisa a reação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com o cloro (Cl^-) na produção do ácido hipocloroso (HOCl), um potente agente de dano celular (Allgayer, 1991), sendo este H_2O_2 produto da redução do ânion superóxido, reação catalisada pela SOD.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são compostos resultantes da ativação ou redução do oxigênio molecular ou derivados dos produtos dessa redução. Dentre estas espécies, encontram-se moléculas ou fragmentos moleculares que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais, que lhes conferem considerável grau de reatividade. Estas moléculas ou fragmentos moleculares reativos são denominados radicais livres. A produção das EROs é responsável pela regulação de diversas respostas fisiológicas, como controle do tônus muscular, regulação do crescimento celular, além da diferenciação e migração dessas células. Apesar das EROs serem importantes na sinalização celular, sua produção excessiva pode causar danos celulares (Martinon, 2010; Valko *et al.*, 2007).

Rugtveit e colaboradores (1995) demonstraram que monócitos (do sangue periférico) e macrófagos intestinais, isolados de pacientes com DII, produzem espécies reativas de oxigênio (EROs); verificaram também altos níveis de neutrófilos no tecido inflamado de tais pacientes, o que sugere participação dessas EROs no processo inflamatório.

Os mecanismos de defesa contra possíveis danos celulares causados pela produção excessiva dessas EROs envolvem mecanismos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Dentre as defesas enzimáticas, encontram-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Os mecanismos não-enzimáticos são representados pelo ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), glutathiona (GSH), carotenóides, flavonóides dentre outros antioxidantes (Valko *et al.*, 2007). O desbalanço entre formação das EROs e capacidade de eliminar esses radicais oxidados pode produzir um estado celular conhecido com estresse oxidativo (Martinon, 2010).

Evidências apontam para uma relação intrínseca entre as DII, o aumento dos níveis das EROs e a queda das concentrações de enzimas antioxidantes. Entretanto, não se sabe ao certo se as EROs são um fator etiológico no desenvolvimento das DII ou se as mesmas são produto secundário do processo inflamatório.

Durante o processo inflamatório, moléculas de oxigênio (O_2) são convertidas em ânion superóxido ($\bullet O_2^-$) pela enzima xantina oxidase; $\bullet O_2^-$ tem sido largamente associada à etiologia de uma série de doenças. Para proteger o meio de tal molécula, os tecidos se valem da enzima SOD, que catalisa a reação de conversão do $\bullet O_2^-$ em H_2O_2 . Este, por sua vez, pode ser convertido em H_2O e O_2 pela GPx ou pela catalase. H_2O_2 pode ser convertido ainda no radical hidroxila ($HO\bullet$) através da reação com alguns metais de transição na chamada reação de Fenton (Fig. 3) (Valko *et al.*, 2007).

Como mostra a figura 3, GSH intracelular fornece uma das melhores defesas contra o estresse oxidativo nas células animais. Durante o estresse oxidativo, glutathiona reduzida (GSH) é convertida em sua forma oxidada (GSSG). Tal reação é mediada pela GPx, utilizando como substrato, principalmente, o H_2O_2 presente no tecido

lesionado. Os altos níveis de GSH e os baixos níveis de GSSG ajudam a manter o meio em estado reduzido, prevenindo o dano oxidativo às macromoléculas celulares (Blair, 2010). Em adição, a GPx ainda medeia a reação de conversão de GSH em GSSG utilizando como substrato peróxido lipídico (LOOH), que por sua vez é reduzido a LOH. Essas reações garantem a desintoxicação do meio causada por H_2O_2 e LOOH (Valko et al., 2007).

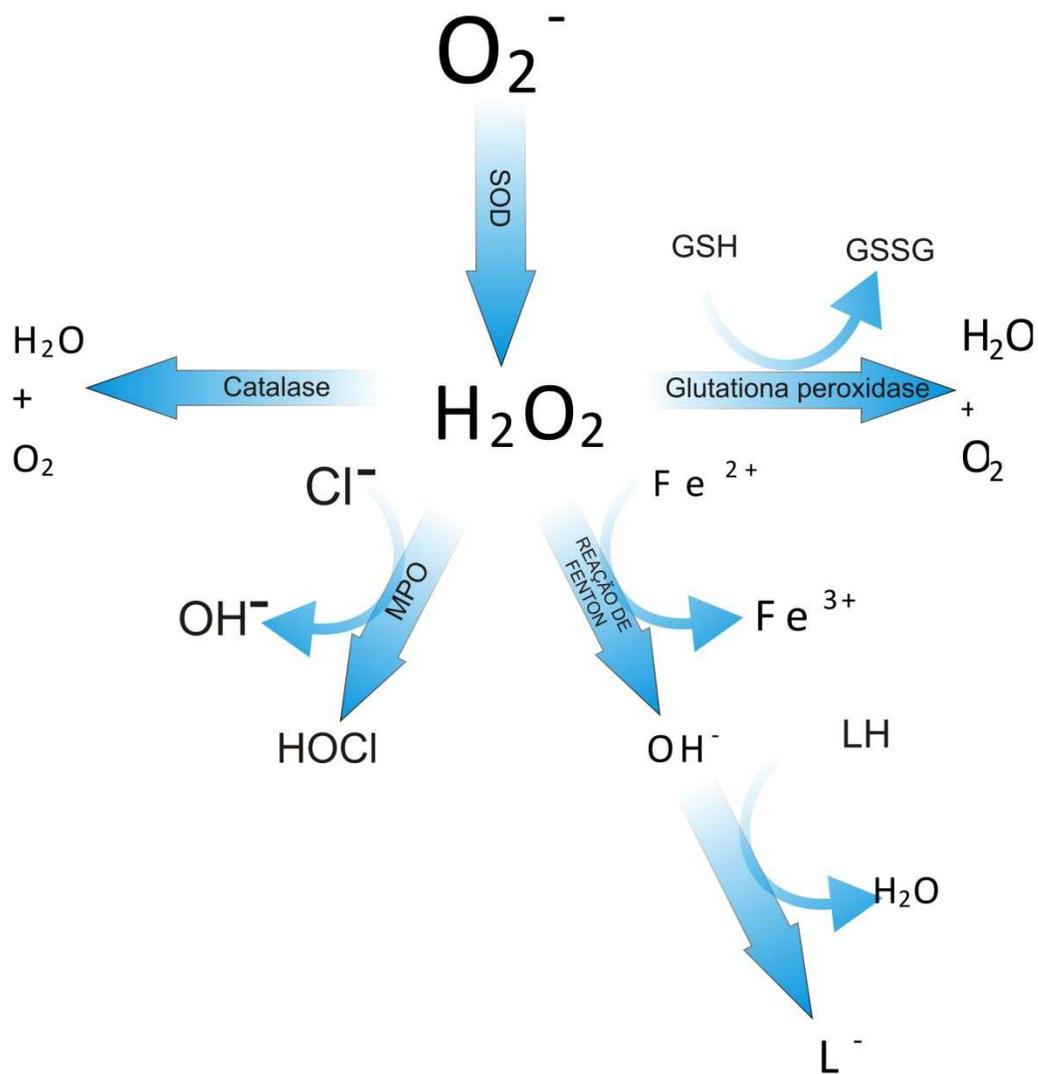


Figura 3. Representação esquemática da ação de enzimas antioxidantes.

f. Terapêutica

De acordo com Mayer (2010), o processo inflamatório pode ser dividido em três fases denominadas: de iniciação, fase de aumento e fase de perpetuação ou regulação. Levando tal informação em consideração, os fármacos desenvolvidos atualmente, que tem como alvo interagir com a microflora intestinal ou com os agentes mediadores da resposta imune, focalizam as duas primeiras etapas do processo, estimulando tanto a resposta imune inata quanto a resposta imune adaptativa. Já os defeitos na fase de regulação são reflexos intrínsecos às alterações da resposta imune adaptativa e, com isso, poucos fármacos são desenvolvidos para atuar neste estágio.

Na verdade, até os anos 90 os tratamentos vigentes para as DII se focavam somente na remissão dos sintomas da doença, não atuando sobre a redução da inflamação e cicatrização da mucosa (Pineton de Chambrum *et al.*, 2010). Os estudos para obtenção de novos fármacos, visando tanto redução do processo inflamatório quanto cicatrização da mucosa, se intensificaram a partir dos anos 90. Desde então, o uso de corticosteróides, aminossalicilatos e seus derivados, assim como antibióticos e drogas imunomodulatórias no tratamento das DII se intensificou. Em consequência, redução do processo inflamatório e cicatrização da mucosa foram obtidas de forma satisfatória. Outras terapias foram surgindo a partir desses estudos, como é o caso de preparações com anticorpos monoclonais, drogas de ácidos nucleicos anti – sense e terapias com anticorpos integrinas. Muitas dessas drogas são promissoras no tratamento das DII, mas estão associadas a efeitos colaterais (Head & Jurenka, 2003; Head & Jurenka, 2004).

f.1. Terapêutica convencional

A primeira linha de medicamentos no tratamento de inflamações leves à moderadas incluiu, os derivados do ácido 5-aminossalicílico (5-ASA), como a sulfassalazina, mesalamina, balsalazina e olsalazina. As drogas desta classe apresentam efeito anti-inflamatório, inibindo IL-1, IL-2 e NF- κ B. Além disso, elas inibem a função de monócitos e linfócitos e proporcionam atividade antioxidante. Por outro lado, o 5-ASA apresenta aparente atividade inibitória na oxidação do butirato, interferindo de forma consistente no metabolismo dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Head & Juranka, 2003; Schwartz & Cohen, 2008).

Em pacientes com inflamação moderada à severa, a administração oral de corticosteróides se mostra efetiva na indução de uma resposta clínica e remissão da DII (Kuhbacher & Fölsch, 2007). Os corticosteróides são potentes inibidores da ativação de células T e da secreção de citocinas, além de mediar sua atividade anti-inflamatória através de sua ligação com receptores intracelulares. Os fármacos desta categoria controlam a expressão de genes alvos, como por exemplo, a inibição do gene ativador de proteínas-1 (AP-1) e do gene inibidor κ Ba (I κ Ba) (Pierik *et al.*, 2006), além de inibir a cascata do ácido aracdônico, INF- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-8 (Head & Jurenka, 2003). Por outro lado, os agentes imunomoduladores tornaram-se importantes medicamentos no tratamento de pacientes com RCUI ou DC córtico-dependentes ou córtico-resistentes (Schwartz & Cohen, 2008). Essas drogas exercem seus efeitos inibindo a proliferação de linfócitos e a síntese de ribonucleotídeos. Seus efeitos anti-inflamatórios se devem à supressão da atividade das células *Natural Killers* (NK) e da supressão da função de células T (Head & Jurenka, 2003).

f.2. Terapêutica emergente

Nos últimos anos, diversas abordagens terapêuticas têm emergido como resultado do acúmulo de dados e evolução da compreensão da patogênese das DII. Essas novas terapias visam mecanismos específicos da doença, com o potencial de proporcionar tratamentos mais eficientes e mais seguros (Nakamura *et al.*, 2008). Dentre essas novas terapias, a mais promissora envolve anticorpos anti-TNF- α , como infliximab, adalimumab e certolizumab (Head & Juranka, 2004). Seus mecanismos de ação incluem a neutralização da atividade do TNF, além de induzir a apoptose de células T ativadas e macrófagos. Nos últimos 12 anos, quatro antagonistas de TNF foram desenvolvidos e aprovados para o uso humano, cada um apresentando características distintas. São eles etanercept, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab. (Chan & Carter, 2010; Martínez-Montiel & Muñoz-Yagüe, 2006).

Outra abordagem utilizada envolve a inibição da polarização das células T_H1 através de anticorpos monoclonais para IL-12, IFN- γ , IL-18 e para o receptor da IL-2. (Sandborn & Targan, 2002). Ustekinumab, um anticorpo humano anti IL-12 e anti IL-23, inibe a interação destas interleucinas com seus receptores e, conseqüentemente, a sinalização da cascata pró-inflamatória mediada por estas interleucinas (Elliott *et al.*, 2009). Fontolizumab apresenta ação anti-IFN- γ , inibindo a ativação de macrófagos e a diferenciação das células T_H0 em T_H1 .

f.3. Antioxidantes

Reimund e colaboradores (1998) avaliaram a influência de três antioxidantes (butirato de hidroxila, tetrahidropapaverolina e ácido nordihidroguaiarético) sobre a

produção de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 em células sanguíneas mononucleares periféricas e em biópsias da mucosa cólica inflamada de pacientes com DC e RCUI. O estudo revelou aumento da produção de IL-1 e IL-6 pelas células sanguíneas mononucleares periféricas. Já a biópsia do cólon destes pacientes revelou a não depleção de IL-6 e IL-8 pelas três drogas, mas estas inibiram IL-1 e TNF- α , estes efeitos inibitórios sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias se mostraram mais pronunciados em pacientes com RCUI do que em pacientes com DC. A atividade farmacológica proposta indica envolvimento de oxigênio molecular e seus derivados sobre a via de sinalização e expressão dessas citocinas.

No intuito de reduzir os efeitos causados por tais agentes, o sistema se vale de agentes antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Outros agentes antioxidantes podem ser obtidos através da alimentação, como é o caso das vitaminas A, C e E, flavonóides e carotenóides (Segui *et al.*, 2004). Em virtude disso, emerge o interesse em se avaliar os efeitos de substâncias naturais, como é o caso de polifenóis no tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

1.1. Metabólitos secundários de plantas

Plantas, bem como outros organismos unicelulares e multicelulares, contem moléculas orgânicas ubíquas (aminoácidos, carboidratos e ácidos graxos), denominadas metabólitos primários, essenciais para a estrutura básica e metabolismo da célula. Esses compostos também servem como substrato para a síntese de substâncias químicas denominadas metabólitos secundários, os quais se acumulam em menores concentrações e apresentam distribuições diferentes para cada espécie. Após a ingestão, alguns metabólitos secundários de plantas comestíveis interagem benéficamente, agindo como coativadores enzimáticos. A ingestão insuficiente desses

metabolitos pode estar associada à patogênese de algumas doenças (Balandrin *et al.*, 1985; Eastwood, 2001).

Polifenóis constituem um dos grupos mais numerosos dentre os metabólitos secundários, caracterizados por um anel benzeno acoplado a um ou mais grupos hidroxilas, que podem ser classificados em quatro grupos distintos: flavonóides, estilbenos, lignanas e ácidos fenólicos. Esses polifenóis apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, tendo em destaque sua atividade antioxidante, atuando como sequestradores de radicais livres em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Nos últimos anos esses polifenóis tem recebido especial atenção devido à sua aparente interação com proteínas específicas de cascatas de sinalização intracelulares, vitais para a função celular (Santangelo *et al.*, 2007; Biesalski, 2007).

Outra importante atividade biológica exercida pelos polifenóis se dá devido às propriedades anti-inflamatórias, cada vez mais abordadas. Diferentes alvos estão envolvidos na atividade anti-inflamatória dos polifenóis, podendo ser divididos naqueles relacionados às vias dependentes do ácido aracdônico, como inibição das cicloxigenases (COX), inibição das lipoxigenases ou inibição da fosfolipase A₂. Quanto às vias independentes do ácido aracdônico, os polifenóis têm como alvo a oxido nítrico sintase (NOS) e o fator nuclear kappa B (NFκB). Em adição, polifenóis exercem efeito sobre a produção de citocinas pelas células T_{H1} e T_{H2} (Biesalski, 2007).

Desde a descoberta do NFκB, suspeita-se que ele apresente importante papel nos processos inflamatórios crônicos e agudos. De fato, o NFκB atua de forma essencial em respostas celulares frente a diferentes estímulos. Aparentemente, polifenóis exercem sua atividade modulando a atividade do NFκB, além de agir em diversos passos do processo de ativação (Santangelo *et al.*, 2007); esta modulação pode ocorrer em dois momentos distintos, ou seja, próximo ao início da via de ativação

(regulando os níveis de oxidantes ou a ativação do IKK) ou de forma tardia, impedindo a ligação do NFκB ao DNA (Rahman *et al.*, 2006; Stevenson & Hurst, 2007; Santangelo *et al.*, 2007). Desta forma, os polifenóis atenuariam a ativação do NFκB em diversos processos inflamatórios (Scalbet *et al.*, 2005).

Modelos de colite aguda ou crônica induzida pela administração de TNBS, ácido acético ou azoximetano utilizaram polifenóis para estudar a atividade biológica dessas substâncias sobre a inflamação. Resveratrol, curcumina, quercetrina, theaflavin-3,3'-digalato, epigallocatequina galato (EGCG), quercetina, β-caroteno e Omega-6 atenuaram os danos epiteliais e o grau de lesão do cólon, diminuíram a atividade da MPO e do IKK citosólico. Além disso, esses polifenóis foram efetivos em reduzir os níveis de IL-6, IL-12p40, TNF-α, IFNγ, PGE₂, leucotrienos B₄, MAPKp38 e os níveis nucleares do NFκB (subunidades p50/p65) reduziram também expressão de iNOS e COX-2 e ativação da NFκB, sendo efetivos ainda em reduzir proliferação de linfócitos e infiltração de neutrófilos (Schrenk, 2009).

a. *Sambucus nigra*

Sambucus nigra L. (Sabugueiro, *Adoxaceae*) é uma espécie arbustiva de clima moderado encontrada na Europa, Ásia, norte da África e EUA. Nos últimos anos o fruto desta planta conhecida popularmente como sabugueiro, recebeu especial atenção devido à grande quantidade de compostos químicos, especialmente altas concentrações de metabólitos secundários. Além de ser importante fonte nutricional, concentrações de antocianinas e outros compostos fenólicos, conferem à planta características antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e laxativas (Schmitzer *et al.*, 2010; Scopel *et al.*, 2010; Vlachojannis *et al.*, 2010).

Os frutos dessa planta são muito usados como corantes ou componentes na indústria farmacêutica, são consumidos na forma de xaropes e sucos, bem como em conservas e bebidas alcoólicas, como o vinho de sabugueiro (Schmitzer *et al.*, 2010). O suco contém vários açúcares e ácidos orgânicos, além de ser uma fonte rica em metabólitos secundários. Dentre esses metabólitos bioativos encontram-se, particularmente, antocianinas, quercetina, ácidos hidroxicinâmicos, além de kaempferol, quercetinas glicosiladas, como rutina e isoquercetina, triterpenos, óleos voláteis e ácidos fenólicos (Schmitzer *et al.*, 2010; Scopel *et al.*, 2010).

b. Antocianinas

As antocianinas são polifenóis responsáveis pelas cores azul, púrpura, vermelha e amarela de diversas frutas e flores (Hwang *et al.*, 2011). Sua função primária nas plantas é agir como atrativo para insetos e passaros, com o objetivo de polinizar e dispersar as semente, sendo assim de grande interação entre plantas e animais. Outra função dessas antocianinas nas plantas é evitar o crescimento de larvas de alguns insetos (Zuanazzi & Montanha, 2007).

Sua utilização na dieta humana se dá através do consumo de frutas, verduras, grãos, cereais e vinhos tintos. Seus efeitos já foram testados em estudos envolvendo atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-tumoral, além de atuar na regulação de algumas moléculas de adesão e na proteção contra danos teciduais causados por isquemia e reperfusão (Nizamutdinova *et al.*, 2009; Hwang *et al.*, 2011).

Entretanto, os efeitos das antocianinas não foram ainda testados em modelos de doenças inflamatórias intestinais. Portanto, neste trabalho avaliaremos os efeitos do tratamento com as antocianinas cianidina (aglicona), cianidina 3-glicosídeo, cianidina 3,5-diclicosídeo, cianidina 3-sambubiosídeo e cianidina 3-sambubiosídeo-5-glicosídeo,

presentes nos frutos de sabugueiro, sobre modelo de colite ulcerativa induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS).

2. Objetivos

Objetivo Geral: Investigar o efeito das antocianinas em modelo de indução aguda de colite ulcerativa por TNBS na perspectiva de entendimento da fisiopatologia e elucidação de novas alternativas terapêuticas.

Como objetivos específicos deste trabalho foram avaliados:

1. Atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de fração etanólica de antocianinas monoméricas de *Sambucus nigra*.
2. Ação de diferentes doses desta fração na proteção contra inflamação intestinal em modelo de retocolite ulcerativa induzida por TNBS.
3. Efeitos sobre os níveis de GSH, atividade das enzimas antioxidantes (GPx, GR, Catalase e SOD) e sobre o mediador inflamatório mieloperoxidase (MPO) *in vivo*.
4. Ação da fração sobre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1. Animais

Machos Unib: WH (200 – 240g) foram providenciados pelo centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Foram alojados em caixas com 4 animais cada em sala especial com controle de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo de claro-escuro de 12h, com acesso livre à água e ração nuvital (Nuvilab). Os ensaios estavam autorizados pelo Comitê de Ética da Unicamp nº CEUA1640-1.

3.2. Modelo Experimental

a. Preparação da fração de antocianinas monoméricas

A extração das antocianinas dos frutos de *Sambucus nigra* foi realizada pelas pesquisadoras Fernanda Albertina Ladeiro Duarte e da professora Dra. Cristina Moiteiro do Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (Lisboa, Portugal). As frutas frescas de *S. nigra* sofreram processo de extração seguindo metodologia descrita por Duarte et al. (1898). Para tal, utilizou-se como solvente a mistura 95% etanol e ácido cítrico 1% (85:15, v/v), sendo que o produto obtido apresentou $\text{pH} \pm 3,1$, que é da mesma ordem de grandeza que os produtos alimentares susceptíveis de serem corados. A extração foi feita em duas etapas, sendo que a 50 g de frutas frescas foram adicionados 175 mL de solvente; em seguida as mesmas foram trituradas e agitadas por 120 minutos. Após agitação, a amostra foi macerada à 4°C por 17 horas, de modo a recuperar 175 mL de extrato. Ao resíduo foram adicionados 200 mL do mesmo solvente, repetindo o procedimento anterior e recuperando 200 mL de extrato, tendo como resultado 375 mL de extrato de *S. nigra*. A secagem seguiu metodologia de

atomização, em que se pulveriza o produto, secando-o em corrente de gás quente com a finalidade de se obter um pó. Para tanto o aparelho utilizado foi um “mini spray dryer” (BÜCHI 190, Buchi Switzerland). Para a identificação das antocianinas presentes na fruta de *S. nigra* o extrato foi filtrado em tela de nylon, seguido de filtração por papel Whatman nº1 e celite. A separação do extrato corado foi realizada por cromatografia em coluna mista de sílica e policlar (10 cm de altura/2,5 cm de diâmetro), obtendo então quatro frações: ácidos fenólicos, antocianinas monoméricas, polímeros vermelhos e castanho-amarelados. Através dos métodos de cromatografia bidimensional em placa e monodimensional em papel, verificou-se que a fração de antocianinas monoméricas é composta por um aglicona e quatro antocianinas, identificados como sendo cianidina, 3-glicosídeo de cianidina, 3-glicosídeo-5-glicosídeo de cianidina, 3-sambubdosídeo de cianidina e 3-glicosídeo-5-xilosídeo de cianidina, sendo o segundo e o quinto os mais abundantes na fruta.

b. Colite Aguda

Retocolite ulcerativa foi induzida pelo modelo descrito por Morris et al (1989). Animais foram mantidos em jejum *overnight* e então anestesiados com halotano (CRISTÁLIA, Itapira, Brasil). Sob o efeito do anestésico, os animais do grupo TNBS e dos grupos tratados receberam uma dose de 10 mg de TNBS [5% (w/v)] – (SIGMA Chemical Co St.Louis, USA) dissolvido em 0,25ml de etanol 50% (v/v) por meio de cânula de teflon inserida 8 cm através do anus. Os animais dos grupos tratados receberam, adicionalmente, 10 ml/kg nas doses de 0.625, 1.25, 2.5, 5 e 10 mg/kg/dia de fração de antocianinas monoméricas de *Sambucus nigra* por gavagem, nos tempos de 48h, 24h e 1h antes da indução. Os ratos dos grupos controles receberam somente o veículo por

gavagem (solução salina). No dia seguinte os animais foram eutanasiados e os cólons foram retirados, limpos e armazenados para ensaios bioquímicos posteriores.

c. Avaliação da lesão

O segmento cólico foi obtido por laparotomia, sendo observada a presença de adesão entre o cólon e os órgãos adjacentes, e foi lavado, colocado em placa sobre gelo, limpo de gorduras e do mesentério, e aberto por corte longitudinal. O segmento foi medido, pesado e o tamanho da lesão determinado por medição com régua. Após isso o cólon foi dividido longitudinalmente em diferentes fragmentos para análises posteriores.

d. Dosagem da concentração de Proteínas Totais de tecido cólico

A quantificação de proteínas totais foi feita utilizando o método de Bradford (1976). A absorbância foi lida a 600 nm em leitor de ELISA VersaMax microplate reader (Molecular Devices, USA), utilizando o programa SoftMax® Pro.

3.3. Atividade antioxidante

a. Avaliação da atividade antioxidante e redutora *in vitro*

a.1. Capacidade de redução do radical DPPH

O ensaio para avaliar a capacidade da fração de antocianinas monoméricas de *Sambucus nigra* em reduzir o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), realizado no laboratório do professor Marcos José Salvador, seguiu protocolo descrito por Blois (1958). Para tanto, 5 mg de fração de antocianinas monoméricas de *S. nigra* foram dissolvidos em 1 mL de etanol obtendo, dessa forma, uma solução estoque. Diversas

diluições foram realizadas em etanol com o intuito de se obter as concentrações finais de 100 a 3,125 ppm. Para cada 10 µL de amostra foram adicionados 100 µL de etanol, 100 µL de tampão fosfato (100 mM) e 50 µL de solução de DPPH (250 µM). Decorridos 30 min, a absorbância foi mensurada em leitor de ELISA Apollo LB 912 (Berthold Technologies GmbH & Co, Bad Wildbad, Germany) a $\lambda=517\text{nm}$ e a porcentagem de redução do radical foi calculada (Huang et al., 2005; Prior et al., 2005; Cuendet et al., 1997) pela equação:

$\% \text{redução} = 100 - [(Abs. \text{ Amostra} - Abs. \text{ controle negativo}) / (Abs. \text{ controle DPPH} - Abs. \text{ controle negativo}) \times 100]$. Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras e como controle positivo, o flavonóide quercetina e/ou Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

a.2. Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC_{FL})

A capacidade antioxidante da fração de antocianinas monoméricas de *Sambucus nigra* foi mensurada utilizando-se o ensaio ORAC_{FL} com sonda fluoresceína e AAPH (2,2'-Azobis (2-amidiopropane) dihydrochloride) como fonte de radical livre. Os ensaios foram realizados no laboratório do professor Marcos José Salvador em placas de microtitulação de 96 poços, de acordo com metodologia descrita por Prior e colaboradores (2003) e Ou e colaboradores (2001) com modificações em Salvador et al., 2006. Para tanto preparou-se uma solução estoque de fração de antocianinas monoméricas de *S. nigra* (50 mg/mL) em tampão fosfato/DMSO (99:1). A partir da diluição em tampão fosfato foram obtidas as concentrações de 500, 100, 50, 10 e 5 ppm. Como padrão foi utilizada a substância de referência Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), um análogo da vitamina E, nas concentrações

de 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 ppm. A leitura foi realizada em triplicata, utilizando-se filtro fluorescente (excitação $\lambda=485\text{nm}$ e emissão $\lambda=528\text{nm}$) em leitor de ELISA Apollo LB 912 (Berthold Technologies GmbH & Co, Bad Wildbad, Germany) monitorando a cinética de reação a cada 2 min, por um período de 70min (Temperatura = 37°C). Os resultados foram expressos em μmol de trolox equivalente (TE) por grama de fração de antocianinas monoméricas (μM de TE/g) \pm desvio padrão (dp).

b. Amostras

Os fragmentos de cólon foram trituradas em nitrogênio líquido; em seguida as amostras foram diluídas em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH=7,4) na proporção 1:10 (g/v) e centrifugadas (7000g, a 4°C, por 15 minutos). O sobrenadante foi então utilizado para a quantificação da atividade antioxidante e anti-inflamatória.

c. Avaliação da atividade antioxidante *in vivo*

c.1. Quantificação da glutathiona (GSH)

A quantificação dos grupamentos sulfidríla (-SH) seguiu o modelo descrito por Faure & Lafond (1995), com algumas modificações. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA, em microplaca de 96 poços, a 412 nm (A1). As amostras foram diluídas em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) na proporção de 1:10. Após isso, a 100 μL do homogenato foram adicionados 100 μL de tampão Tris (1,0mM)/EDTA (0,2mM), pH 8,2. Após a primeira leitura, o meio foi acrescido de 20 μL de ácido 5,5' ditiobis (2-nitrobenzóico) 10 mM (DTNB), solubilizado em metanol. Após 15 minutos foi feita a segunda leitura. Para zerar o aparelho, utilizou-se o meio de reação (Tris-EDTA) e

como branco, DTNB diluído em tampão fosfato (B). A concentração dos grupamentos sulfidríla é dada por $[(A2-B)-(A1-B)] \times 157\text{mM}$.

c.2. Superóxido dismutase (SOD)

Para determinar a atividade da enzima SOD, empregou-se o método descrito por Winterbourn e colaboradores (1975), em que as amostras foram diluídas em tampão fosfato (0,1M, pH 7,4) na proporção de 1 : 20. A 100 μL do homogenato obtido foram adicionados 150 μL de solução de hipoxantina (0,1 mM), xantina oxidase (0,07 U) e nitrobluetetrazolium (NBT – 0,6 mM), solubilizados em tampão fosfato na proporção 1 : 1 : 1. A absorbância foi lida em leitor de ELISA, microplaca de 96 poços, com comprimento de onda (λ) de 560 nm. Os resultados foram expressos em Unidade de SOD/mg de proteína (U/mg de proteína).

c.3. Glutathione peroxidase (GPx)

A determinação da atividade da GPx seguiu método descrito por Yoshikawa e colaboradores (1993). As amostras foram diluídas em tampão fosfato (0,1M, pH 7,4) na proporção de 1:10. Após isso, a 100 μL do homogenato foram adicionados 150 μL de solução de glutathione reduzida (10 mM), NADPH (4 mM) e glutathione redutase (1 U) solubilizados em tampão fosfato (0,1 M; pH=7,4), além de 20 μL de H_2O_2 (25 mM). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA, em microplaca de 96 poços, com filtro de 365 nm, em intervalos de 1 min, por 10 min.

c.4. Glutathione redutase (GR)

Para determinar a atividade da GR seguiu-se o método de Carlberg e Mannervik (1985). As amostras foram diluídas em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4) na proporção de 1 : 10. A reação enzimática foi preparada com 100 μL de homogenato e 150 μL de solução de EDTA (0,2 mM), glutathione oxidada (1mM) e NADPH (0,1mM),

solubilizados em tampão fosfato. A absorbância foi lida em leitor de ELISA a 365 nm, em intervalos de 1 min, durante 10 min. O coeficiente de extinção utilizado para o NADPH foi de $6,22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

c.5. Mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO foi determinada de acordo com método descrito por Krawisz e colaboradores (1984). Neste procedimento as amostras foram diluídas em tampão fosfato (0,05M, pH 6,8), na proporção de 1 : 10. Desse homogenato, 6,7 μL foram misturados à 193,3 μL de solução de dihidroclorato de O-dianisidina e peróxido de hidrogênio 0,0005%, solubilizados em tampão fosfato. A absorbância foi medida em leitor de ELISA a 460 nm em intervalos de 1 min durante 10 min. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

c.6. Índice de peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica foi determinada em termos de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), seguindo metodologia descrita por Ohkawa e colaboradores (1979). Para este procedimento, as amostras foram homogeneizadas em solução de KCl, na proporção de 1:10 (p/v). Em seguida, alíquotas de 0,5 mL do homogenato foram acrescidas de 0,2 mL de dodecil sulfato sódico (SDS) (8,1%), 1,5 mL de ácido acético (20%, pH 3,5), 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,8%) e 0,3 mL de água destilada. Todas as amostras foram deixadas em banho-maria, com termostato ajustado à 95°C , durante 1 hora. Após este período, as amostras foram resfriadas e receberam a adição de 1mL de água destilada e 5 mL de solução de n-butanol e piridina (15:1, v/v), sendo agitadas em vortex por 1 min e centrifugadas a 2600 g, por 10 minutos. Como padrão foi utilizado tetraetoxipropano (TEPP) (0,5 nmol), solubilizado em etanol. A absorbância da camada orgânica foi lida em leitor de ELISA Apollo LB 912

(Berthold Technologies GmbH & Co, Bad Wildbad, Germany), em microplaca de 96 poços, a 532 nm. Os resultados foram expressos em nanomoles de TBARS por mg de proteínas (nmol TBARS/mg de proteínas).

c.7. Catalase

A atividade da enzima catalase foi determinada segundo método descrito por Aebi (1984). As amostras foram diluídas na proporção de 1:200 em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) e triton x-100 (9:1). Após isso foram centrifugadas (7000g, a 4°C, por 15 minutos) e à 200 µL do homogenato foram adicionados 100 µL de H₂O₂ 30 mM (30%). A absorbância foi medida em leitor de ELISA, microplaca de 96 poços, com comprimento de onda (λ) de 240 nm em intervalos de 30s em um total de 25 leituras por poço.

d. Quantificação de citocinas

Para análise das interleucinas, os intestinos foram triturados em nitrogênio líquido e as amostras resultantes foram diluídas em tampão fosfato (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ e 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,2-7,4). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 7000g por 10 min e o sobrenadante congelado a -80°C até a realização dos ensaios bioquímicos.

As concentrações das citocinas IL-10 e IL-12 foram determinadas por técnicas de imunoenensaio enzimático com kit R&D (Duoset ELISA development kit, R&D systems Inc., Minneapolis, MN, USA). O teste foi realizado em microplaca de 96 poços em duplicata, sendo que as duas primeiras colunas da microplaca foram utilizadas para o desenvolvimento da curva-padrão. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA a 450 nm, com correção para 540 nm.

3.4. Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (epm) ou desvio padrão (dp) e submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido de teste a posteriori de Tukey e/ou Dunnett dependendo do experimento. O nível mínimo de significância aceito foi de $p < 0,05$ em todas as análises. O programa utilizado foi o GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA).

4. Resultados

4.1. Composição dos componentes fenólicos de *Sambucus nigra* e separação das antocianinas monoméricas.

a. Separação dos compostos fenólicos

Pelo método de cromatografia em camada de sílica e policlilar, foi possível separar do extrato corado de *S. nigra*, ácidos fenólicos, antocianinas monoméricas, polímeros vermelhos e castanho-amarelados. A eluição dos ácidos fenólicos foi obtida através de mistura de acetato de etila e metanol (95 : 5, v/v) e a das antocianinas monoméricas foi realizada em mistura de metanol e HCl (12N) (999 : 1, v/v) (fig. 4), enquanto aquela dos pigmentos vermelhos foi obtida através de mistura de ácido fórmico e água (1:1, v/v), após lavagem da coluna com água para retirada dos açúcares, Finalmente, a eluição dos polímeros castanhos e amarelos foi feita com ácido fórmico puro.

Posteriormente, a investigação cromatográfica dos pigmentos isolados revelou que as antocianinas presentes na fração monomérica são a cianidina (aglicona), cianidina 3-glicosídeo, cianidina 3,5-diclicosídeo, cianidina 3-sambubiosídeo e cianidina 3-sambubiosídeo-5-glicosídeo, sendo a segunda e a quarta antocianinas encontradas em maior concentração (tabela 4).

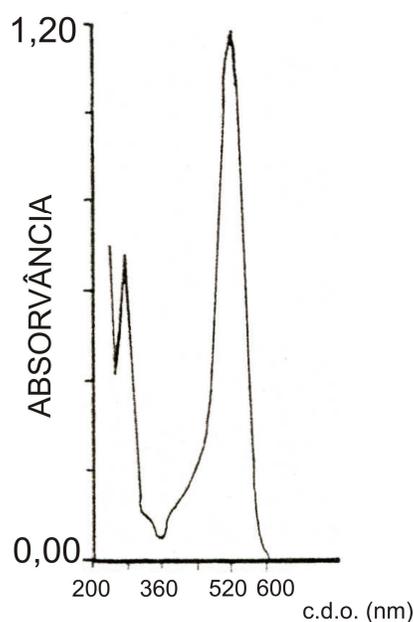


Figura 4. Fração de antocianinas monoméricas; eluição feita com metanol: HCl (999:1 v/v); $\lambda_{m\acute{a}x} = 529 \text{ nm}$ ($A_{529} \text{ nm}$).

Tabela 4. Características espectrais dos pigmentos antocianicos isolados. (a) Harborne (1962); (b) Yoshitama (1981); (c) Du *et al.* (1975); (d) Du *et al.* (1975);

Pigmento	$\lambda_{m\acute{a}x}(\text{nm})$	$\lambda_{m\acute{a}x}(\text{UV})(\text{nm})$	$A_{440}/A_{\lambda_{m\acute{a}x}}(\%)$	$A_{\lambda_{m\acute{a}x}(\text{UV})}/A_{\lambda_{m\acute{a}x}}(\%)$
A	536	272	21	
B	528	282	22	64
C	525	280	13	44
D	526	281	24	70
E	527	278,8	14	44
Bibliografia:				
Cianidina	535 (a)	273 (a)	19 (a)	
3-glicosideo de cianidina	525 (a)		22 (a)	
	530 (b)	282 (b)	21 (b)	30 (b)
	528 (c)		24 (c)	56 (c)
	528 (d)			67 (d)
3-glicosideo-5-glicosideo de cianidina	522 (a)			
	526 (b)	279 (b)	22 (a)	34 (b)
3-sambubidosideo de cianidina	523 (a)			
3-glicosideo-5-xilosideo de cianidina	528 (c)		13,7 (c)	

b. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

b.1. Redução do radical DPPH

A atividade antioxidante do extrato de antocianinas monoméricas foi avaliada inicialmente *in vitro*, testando sua capacidade de reduzir o radical DPPH. Os dados estão demonstrado na figura 5.

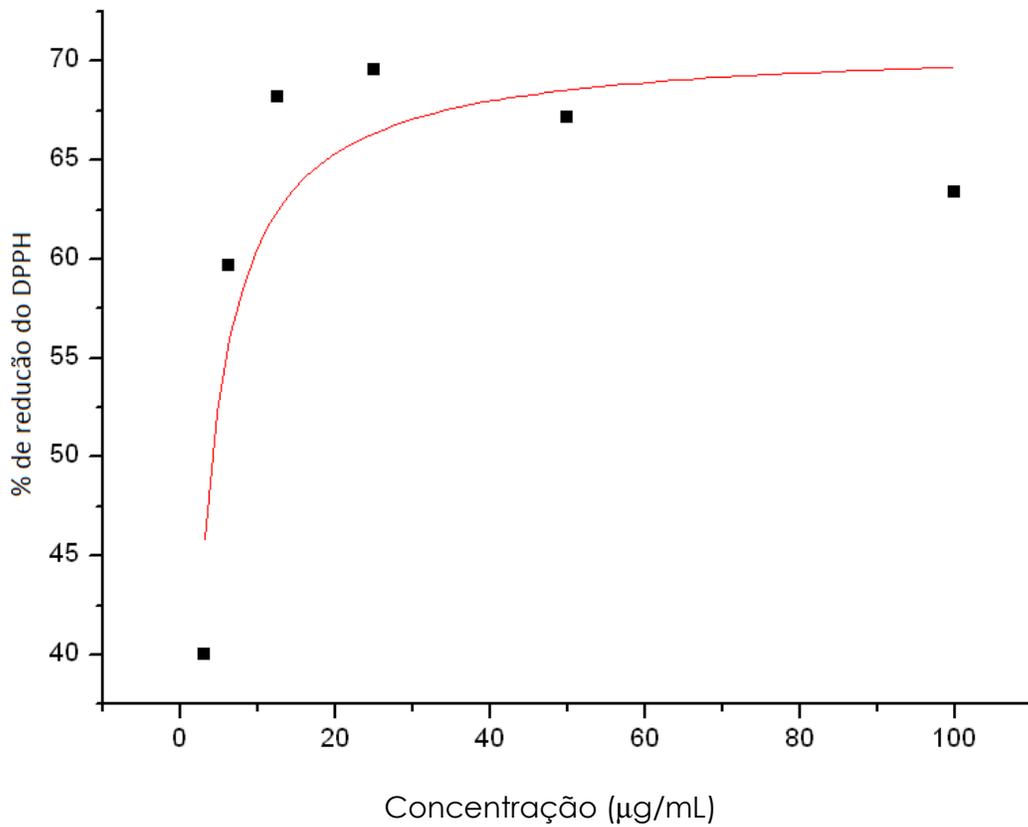


Figura 5. Potencial redutor da fração de antocianinas monoméricas de *Sambucus nigra* sobre o radical DPPH. Dados expressos em média \pm dp.

O ensaio de redução do radical DPPH é utilizado para avaliar rapidamente a capacidade de polifenóis na transferência de elétrons, um provável mecanismo de proteção antioxidante. O teste revelou que as antocianinas presentes nas frutas de *S. nigra* foram eficazes em reduzir o radical, apresentando EC_{50} médio de $5,24 \pm 1,28$. Tal resultado indica atividade antioxidante promissora das antocianinas presentes nos frutos de sabugueiro.

b.2. Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC_{FL})

Outro teste para verificar atividade antioxidante do extrato de antocianinas presentes nos frutos do sabugueiro avaliou sua capacidade de reduzir o radical AAPH. Tal capacidade redutora está evidenciada na figura 6.

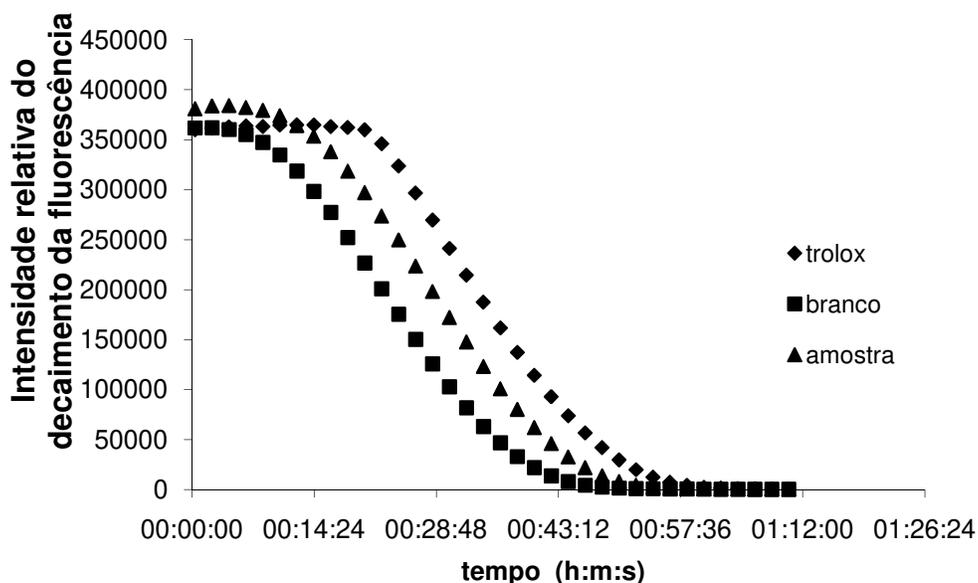


Figura 6. Potencial redutor da fração de antocianinas monoméricas de *S. nigra* sobre o radical AAPH.

Este ensaio foi utilizado para avaliar a atividade antioxidante das antocianinas dos frutos de sabugueiro através da transferência de moléculas de hidrogênio. O ensaio revelou que a concentração 100 ppm apresentou a melhor taxa de redução na oxidação do radical AAPH, com 1991 $\mu\text{mol TE/g}$. O resultado sugere uma atividade antioxidante promissora para as antocianinas avaliadas.

4.2. Indução de colite experimental por TNBS

O modelo utilizado para mimetizar os danos presentes na retocolite ulcerativa foi aquele descrito por Morris e colaboradores (1989), que consiste na indução do dano cólico mediante administração de dose única de 30 mg de TNBS solubilizado em

etanol 50%. No presente estudo, utilizou-se uma dose única de 10 mg de TNBS, a fim de reduzir a severidade do processo inflamatório induzido, com o propósito de facilitar a avaliação dos mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios, mediante tratamento com fração de antocianinas monoméricas de *Sambucus nigra*.

O processo inflamatório intestinal agudo foi inicialmente avaliado, baseando-se em parâmetros gerais como extensão da lesão, relação entre peso/comprimento do cólon e aplicação de índice de dano macroscópico, segundo critérios inicialmente descritos por Bell e colaboradores (1995). Os dados dessa análise encontram-se presentes na tabela 5.

Tabela 5. Efeito da administração da doses crescentes das antocianinas monoméricas dos frutos de *Sambucus nigra* sobre lesão intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em media \pm erro padrão da média (epm) para a relação peso/comprimento e mediana para o score, ^a p<0,001 versus Grupo Salina e ^b p<0,05 versus grupo TNBS.

Grupos	n	Cólon peso/comprimento (g.cm-1)	Danos (Score)
Salina	8	0,100 \pm 0,008	0
TNBS	8	0,172 \pm 0,004 ^a	7,500 (6,5 - 10,0) ^a
0,625 mg.Kg ⁻¹ <i>S. nigra</i> + TNBS	8	0,165 \pm 0,003 ^a	7,500 (6,5 - 9,5) ^a
1,25 mg.Kg ⁻¹ <i>S. nigra</i> + TNBS	8	0,176 \pm 0,007 ^a	8,250 (5,0 - 9,5) ^a
2,5 mg.Kg ⁻¹ <i>S. nigra</i> + TNBS	8	0,169 \pm 0,007 ^a	7,400 (6,5 - 8,5) ^a
5 mg.Kg ⁻¹ <i>S. nigra</i> + TNBS	8	0,142 \pm 0,011 ^{a,b}	6,500 (5,0 - 8,5) ^{a,b}
10 mg.Kg ⁻¹ <i>S. nigra</i> + TNBS	8	0,163 \pm 0,004 ^a	8,000 (7,5 - 10,0) ^a

A avaliação macroscópica dos tecidos revelou que o grupo que recebeu a dose de 5 mg.Kg⁻¹ de fração de antocianinas monoméricas de *Sambucus nigra*, apresentou redução significativa na extensão da lesão (Fig. 7), assim como redução na

relação peso/comprimento do cólon ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$) comparados ao grupo TNBS. Como esta dose mais efetiva, optou-se pela realização dos ensaios bioquímicos com esta dose, comparando-a aos grupos salina e TNBS.

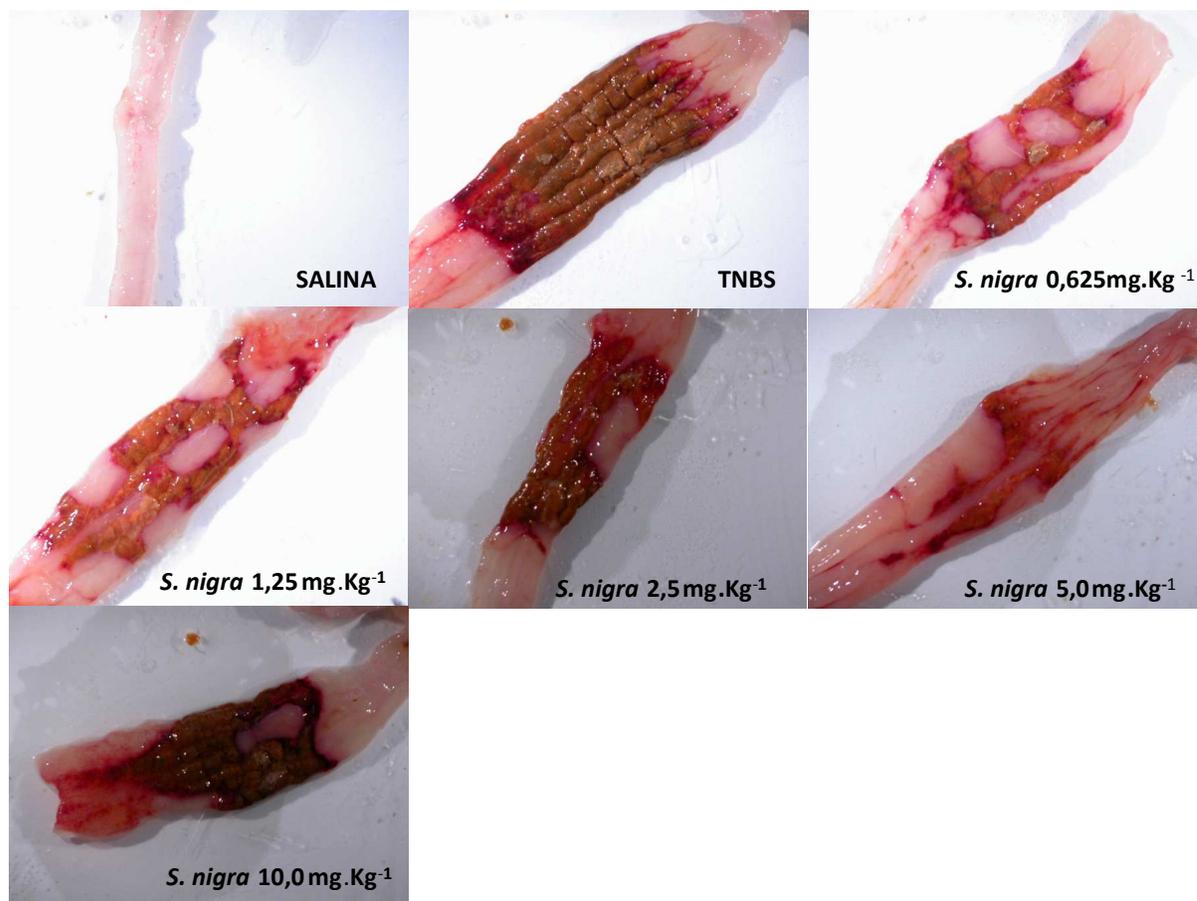


Figura 7. Região cólica após inflamação induzida por TNBS. Os animais receberam solução salina ou tratamento com fração de antocianinas monoméricas de *S nigra*, em diferentes doses, nos tempos 48h, 24h e 1h antes da indução.

4.3. Avaliação da atividade antioxidante *in vivo*

a. Quantificação de Glutathione (GSH)

A figura 8 mostra os resultados obtidos na quantificação de GSH, expressos em nmol/mg de proteína. Este tripeptídeo endógeno é um importante agente de defesa celular contra o estresse oxidativo, sendo vital para a manutenção da integridade do epitélio.

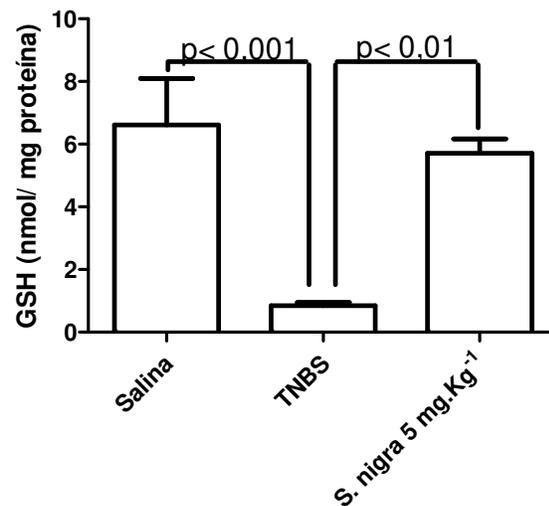


Figura 8. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg⁻¹ das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre a concentração de GSH no intestino de ratos submetidos à modelo de colite induzido por TNBS. Dados expressos em média ± e.p.m. ANOVA, seguido de teste de Tukey.

O teste revelou que a dose de 5 mg.Kg⁻¹ (grupo tratado) elevou de forma estatisticamente significativa os níveis de GSH, que se apresentaram reduzidos nos animais do grupo TNBS, em consequência do estresse oxidativo provocado pelo processo inflamatório. O GSH é produzido pelas células da mucosa que participam de diversos aspectos do metabolismo oxidativo como a participação na remoção de hidroperóxidos e a manutenção dos grupamentos sulfidrilas de proteínas. Em vista disso a manutenção dos níveis do tripeptídeo no grupo tratado com a dose de 5 mg.Kg⁻¹ de antocianinas quando comparado com o grupo TNBS indica um importante aspecto das antocianinas, estimulando a citoproteção.

Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Já a enzima SOD participa da reação de dismutação do O_2^- em H_2O_2 . Em tecidos inflamados essa enzima apresenta redução da atividade dessa enzima, mantendo, dessa forma, altos níveis de O_2^- no tecido cólico. Os resultados obtidos neste teste estão evidenciados na figura 9.

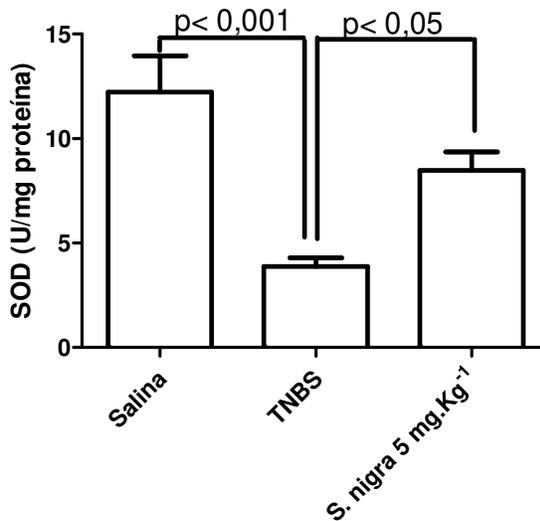


Figura 9. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg⁻¹ das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no intestino de ratos submetidos à modelo de colite induzido por TNBS. Dados expressos em média \pm epm. ANOVA, seguido de teste de Tukey.

O modelo de colite aguda, utilizado neste estudo, revelou uma redução na atividade da enzima SOD no grupo TNBS, quando comparado ao grupo Salina. Já as antocianinas presentes nos frutos de sabugueiro foram eficazes em evitar a queda da atividade da enzima, favorecendo, dessa forma, a produção de H_2O_2 , que por sua vez pode ser consumido em outras reações, aumentando a citoproteção.

Glutationa peroxidase (GPx)

A enzima glutatona peroxidase é utilizada na reação de oxidação do GSH em GSSG, utilizando como substrato, principalmente, o H_2O_2 . Os resultados obtidos estão demonstrados na figura 10.

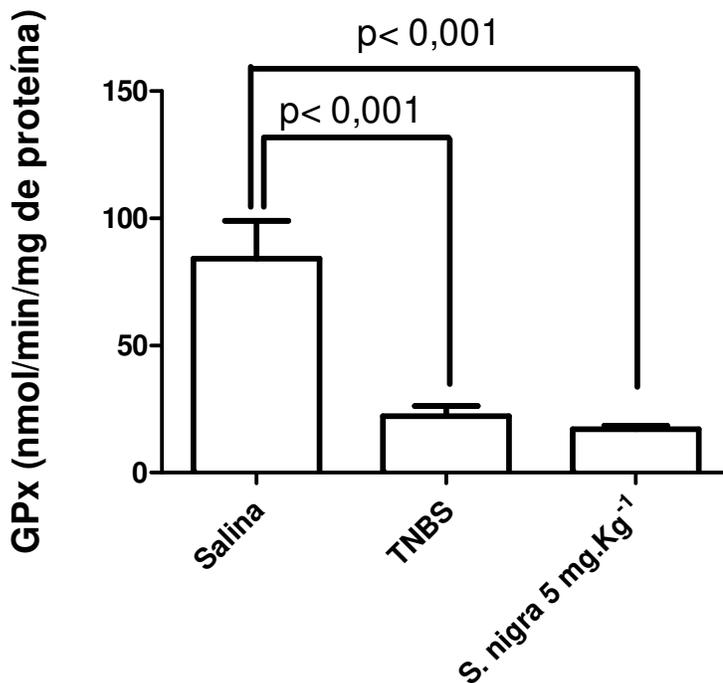


Figura 10. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg^{-1} das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre a atividade da enzima GPx no intestino de ratos submetidos à modelo de colite induzido por TNBS. Dados expressos em média \pm epm. ANOVA, seguido de teste de Tukey.

A atividade da enzima GPx foi avaliada no tecido de animais sadios e animais colícticos, verificando o efeito das antocianinas sobre a atividade da enzima. Um dia após a instauração da doença, verificou-se uma queda da atividade da enzima no grupo TNBS e no grupo tratado, quando comparados com o grupo salina. Tal resultado revela a não ativação da enzima nos grupos que receberam o TNBS. Isso sugere que todo o peróxido formado pela SOD foi consumido em outra reação.

b. Atividade da glutathiona redutase (GR)

A enzima glutathiona redutase participa da reação de redução do GSSG em GSH, utilizando como substrato moléculas de NADPH. Os resultados deste ensaio estão demonstrados na figura 11.

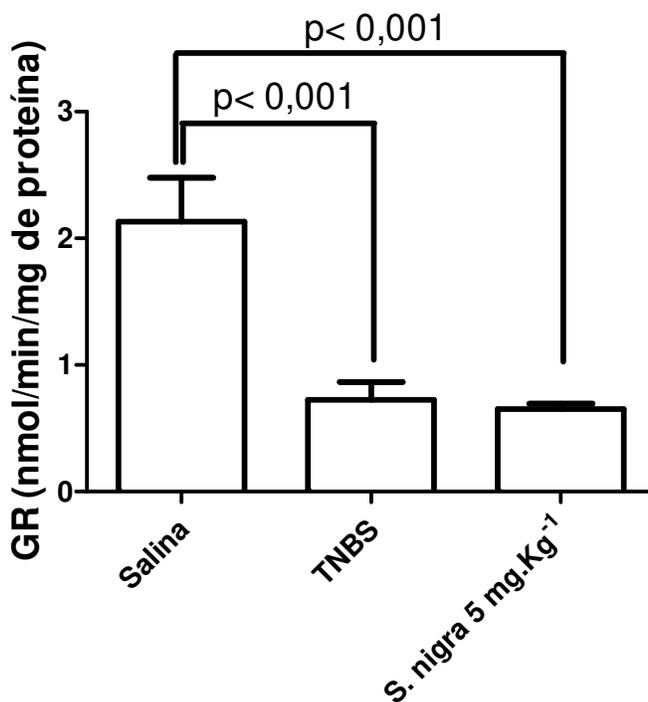


Figura 11. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg⁻¹ das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre a atividade da enzima glutathiona redutase (GR), no intestino de ratos submetidos à modelo de colite induzido por TNBS. Dados expressos em média ± epm. ANOVA, seguido de teste

A atividade da enzima GR foi avaliada nos tecidos intestinais de animais sadios e colícticos. Assim como no caso da enzima GPx, GR apresentou atividade reduzida nos animais colícticos (grupo TNBS e grupo tratado) um dia após a instauração do processo inflamatório. Este resultado se revela congruente com os resultados obtidos no ensaio da atividade da enzima GPx, já que houve redução na produção de GSSG.

c. Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Outra enzima que utiliza o H_2O_2 como substrato é a MPO. Entretanto, nesta reação, o peróxido formado pela SOD é convertido em ácido hipocloroso (HOCl). Este ácido é um potente agente causador de danos teciduais produzido, principalmente, por neutrófilos. O aumento da atividade dessa enzima indica um aumento na população de células inflamatórias em tecidos afetados. Os resultados deste teste estão evidenciados na figura 12.

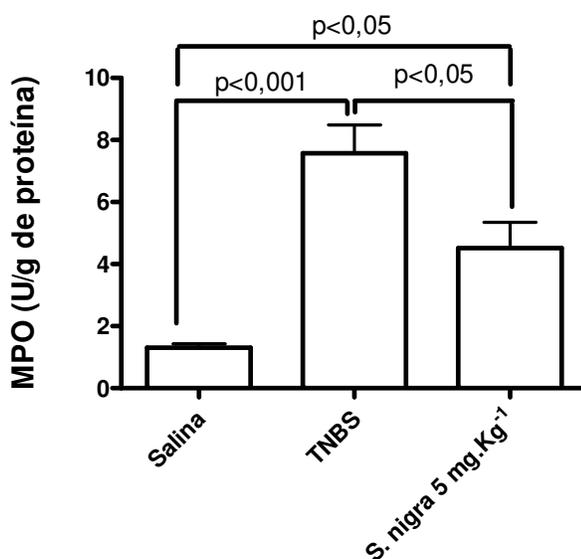


Figura 12. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg^{-1} das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre a atividade da enzima MPO no intestino de ratos submetidos à modelo de colite induzido por TNBS. Dados expressos em média \pm epm. ANOVA, seguido de teste de Tukey.

Neste estudo verificou-se que o dano inflamatório induzido por TNBS foi caracterizado por aumento na atividade da enzima MPO, o que indicaria acúmulo de neutrófilos. O que sugere maior produção de HOCl. Verificou-se também que as antocianinas do fruto do sabugueiro, utilizadas no tratamento do grupo que recebeu a dose de 5 mg.Kg^{-1} foram eficazes em reduzir a atividade da enzima. Entretanto tal redução, embora significativa, não restabeleceu a atividade da enzima àquela obtida no grupo salina.

d. Catalase

Outra enzima que participa na redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 é a catalase. Em tecidos inflamados a atividade dessa enzima é aumentada devido à maior oferta de H_2O_2 . Os resultados obtidos neste teste estão evidenciados na figura 13.

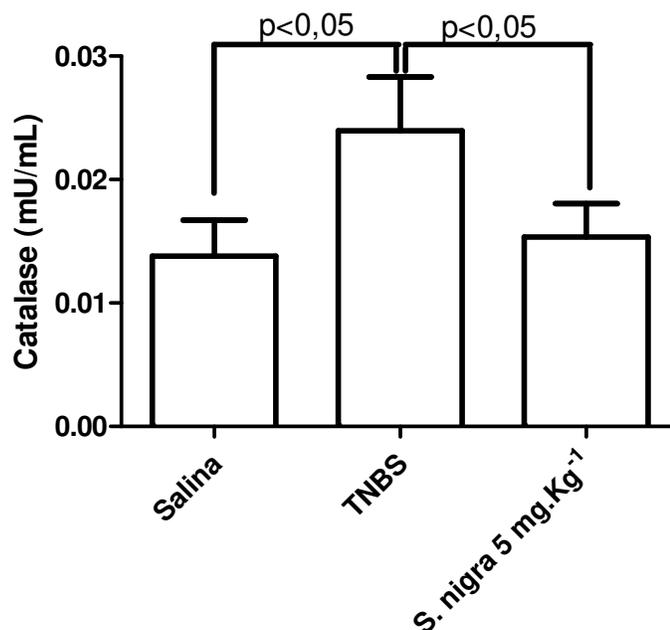


Figura 13. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg^{-1} das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre a atividade da enzima catalase no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS. Dados expressos em média e.p.m. ANOVA seguida de teste de Tukey.

O modelo de colite aguda, utilizado neste estudo, revelou aumento da atividade da enzima catalase no grupo TNBS, quando comparado ao grupo salina. Já as antocianinas presentes nos frutos de sabugueiro (grupo tratado) foram eficazes em evitar o aumento da atividade desta enzima, deixando-a com atividade próxima àquela encontrada nos animais não-colícticos (grupo salina).

e. Determinação do índice de peroxidação lipídica (LPO)

A concentração de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi avaliada no processo de peroxidação lipídica. O efeito das antocianinas do fruto de sabugueiro sobre a peroxidação na mucosa intestinal de ratos submetidos ao modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS está demonstrado na figura 14.

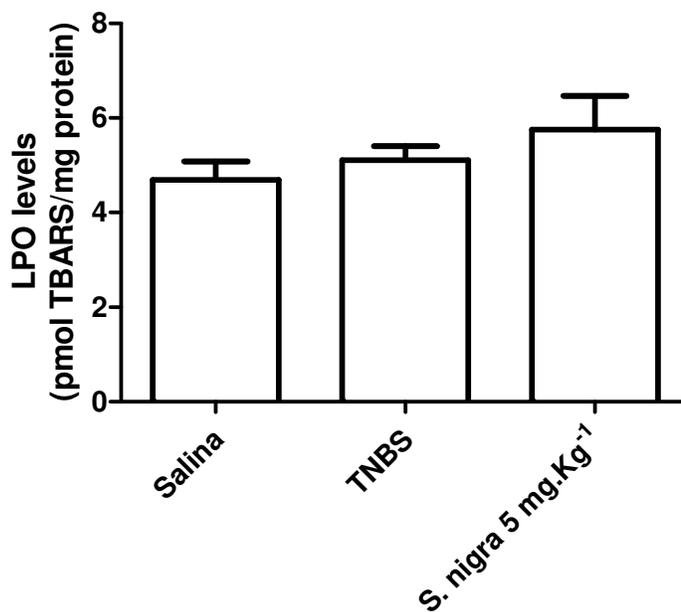


Figura 14. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg⁻¹ das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre os níveis de peróxido lipídico, avaliados nos termos de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), no intestino de ratos submetidos à modelo de colite induzido por TNB. Dados expressos em média e.p.m. ANOVA seguida de teste de Tukey.

Neste ensaio verificou-se que a produção de TBARS não foi aumentada no grupo TNBS e no grupo tratado, quando comparados com o grupo Salina, um dia depois de instaurado o processo inflamatório. Tal resultado indica não haver alteração dos níveis basais destas espécies, o que sugere que o H₂O₂ formado pela SOD não participa da reação de Fenton, não participando, dessa forma, do processo de peroxidação lipídica.

4.4. Quantificação de citocinas

a. Interleucina 10 (IL-10)

A produção da citocina IL-10 foi avaliada na mucosa cólica tanto de animais não colíticos quanto de animais colíticos. Os resultados encontram-se na figura 15.

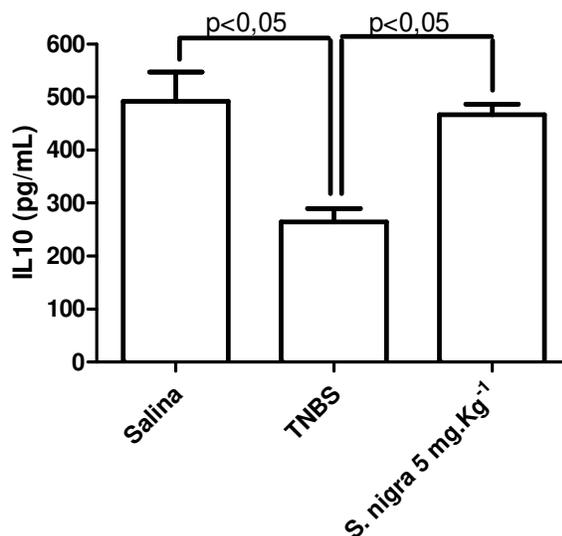


Figura 15. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg⁻¹ das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre a produção de IL-10 no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS. Dados expressos em média \pm e.p.m. ANOVA seguido de teste de Tukey.

Os resultados obtidos revelam que o grupo que recebeu TNBS (grupo controle) apresentou diminuição dos níveis de IL-10 produzida na mucosa, quando os mesmos foram comparados aos dos animais do grupo salina. Em contrapartida, foi evidenciada a manutenção dos níveis basais dessa citocina no grupo que recebeu a dose de 5 mg.Kg⁻¹ de antocianinas dos frutos de sabugueiro. Tal resultado indica o efeito anti-inflamatório das antocianinas do fruto do sabugueiro, visto que esta interleucina apresenta um amplo espectro de atividades biológicas, sendo o mais evidente a inibição de citocinas pró-inflamatórias.

b. Interleucina 12 (IL-12)

A produção da citocina IL-12 foi avaliada na mucosa cólica tanto de animais não colíticos quanto de animais colíticos. Os resultados encontram-se na figura 16.

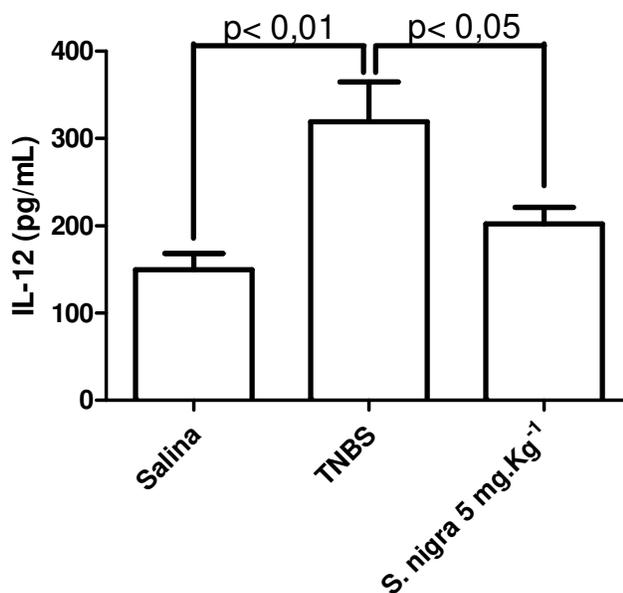


Figura 16. Efeito do tratamento com a dose de 5 mg.Kg⁻¹ das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro sobre a produção de IL-12 no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS. Dados expressos em média \pm e.p.m. ANOVA seguido de teste de Tukey.

O ensaio revelou aumento na produção de IL-12 no intestino de ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS. Entretanto, o tratamento com a dose de 5 mg.Kg⁻¹ das antocianinas presentes no fruto de sabugueiro se mostrou efetivo em reduzir, de forma estatisticamente significativa, a produção da citocinas, aproximando seus níveis àqueles obtidos no grupo salina. Tal resultado sugere o efeito anti-inflamatório das antocianinas da fruta de sabugueiro através da inibição da citocina pró-inflamatória IL-12.

5. Discussão

A inflamação intestinal induzida por TNBS, em ratos, é citada como importante modelo experimental de colite ulcerativa, principalmente quando se deseja avaliar os efeitos do processo inflamatório sobre as funções gastrintestinais. Perda de peso, diarreia e sangramento retal são evidências do início do processo inflamatório nos dias posteriores à indução (Moreels et al., 2001; Paiotti et al., 2009). Este modelo é caracterizado por uma resposta inflamatória aguda, acompanhada de espessamento da parede do cólon, ulcerações e infiltração da mucosa e submucosa por neutrófilos, macrófagos e mastócitos e, posteriormente, leucócitos polimorfonucleares e fibroblastos. Devido ao aumento da infiltração celular, há produção de citocinas pró-inflamatórias via células T_H1, como o IFN- γ , TNF- α e IL-12, e aumento do metabolismo do ácido aracdônico, via COX-2 (Paiotti et al., 2009; te Velde et al., 2006; Hoffmann J.C. 2001).

De acordo com a avaliação da relação peso/comprimento e do índice de danos macroscópicos descrita por Bell e colaboradores (1995), os dados apresentados na tabela 4 confirmaram que a administração intracólica de TNBS foi eficaz em induzir dano inflamatório. Tal modelo inflamatório tem relativa importância devido à elaboração de diversas teorias referentes à patogênese das DII, em especial quanto à participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) no desenvolvimento do processo inflamatório cólico. Além disso, a relação peso/comprimento e o índice de danos macroscópicos indicaram possível efeito preventivo no grupo que recebeu a dose de 5 mg.Kg⁻¹ da fração de antocianinas monoméricas de *Sambucus nigra*, visto que a lesão induzida por TNBS foi menos agressiva neste grupo.

Uma das características histológicas mais proeminentes observada na retocolite ulcerativa idiopática é a infiltração de células do sistema imune na mucosa inflamada

nos estágios iniciais da inflamação. A ativação de neutrófilos e macrófagos e suas migrações para o cólon são fatores fundamentais para a patogênese da lesão tecidual na RCU; essa ativação resulta na formação de espécies altamente reativas, como as EROs, radicais de nitrogênios, proteínas citotóxicas, enzimas líticas e citocinas, exercendo efeitos deletérios sobre a integridade epitelial (Baskol et al., 2008; Giris et al., 2008; Roessner et al., 2008).

Quando EROs são formadas em locais próximos às membranas celulares induzem oxidação dos fosfolipídios de membrana, que pode seguir na forma de uma reação em cadeia. Essas biomembranas contêm, em seus fosfolipídios, grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, compostos por duas ou mais ligações duplas de carbono em sua estrutura, o que os torna susceptíveis aos danos oxidativos causados pela ação de radicais livres (Naito et al., 2007). Além disso, esses agentes oxidantes podem sobrecarregar as defesas antioxidantes, causando danos teciduais através da oxidação de proteínas, peroxidação lipídica, quebras na fita de DNA e pela depleção de ATP. As causas exatas desses danos não estão totalmente estabelecidas, mas a infiltração maciça de leucócitos fagocitários polimorfonucleares e mononucleares parece contribuir para este dano, devido à capacidade dessas células produzirem grandes quantidades de EROs, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso (Baskol et al., 2007; Damiani et al., 2007).

Dentre os compostos fenólicos presentes nas frutas de *Sambucus nigra*, destacam-se as antocianinas cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-sambubiosídeo, encontradas em maior concentração, além de cianidina 3-sambubiosídeo-5-glucosídeo, cianidina 3-glucosídeo e pelargodina 3-glucosídeo (Wu et al., 2004; Mateus et al., 2004; Vlachojannis et al., 2010). Dentre as antocianinas citadas, cianidina 3-glucosídeo é aquele que apresenta maior capacidade antioxidante, tendo

capacidade 3,5 vezes maior quando comparado a um análogo da vitamina E (Wang et al., 1997).

Através da análise cromatográfica da fração monomérica, obtida de extrato de *S. nigra*, verificou-se que as mesmas antocianinas puderam ser encontradas e que cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-sambubiosídeo estavam presentes em maiores concentrações como descritas na literatura, o mesmo ocorreu, com cianidina 3-sambubiosídeo-5-glucosídeo, cianidina 3-glucosídeo em menores concentrações. Estas antocianinas são absorvidas pelo trato gastrointestinal, sendo encontradas nas membranas e no citosol de células endoteliais vasculares, conferindo-lhes proteção contra agressões oxidativas (Youdim et al., 2000).

A capacidade antioxidante de frutas, vegetais e suplementos dietéticos é comumente avaliada por ensaios *in vitro* em sistemas de monitoramento de reação entre radicais e compostos antioxidantes. Os métodos mais comumente empregados na determinação da capacidade antioxidante incluem absorção de radicais de oxigênio (ORAC) e sequestro do radical DPPH (Roy et al., 2010), sendo estes métodos classificados em dois grupos, de acordo com seus mecanismo de reação: transferência de átomos de hidrogênio (TAH) e transferência de elétrons (Te), respectivamente (Huang et al., 2005). O ensaio ORAC representa o mecanismo de reação por transferência de átomos de hidrogênio, através da reação entre os compostos antioxidantes e uma sonda fluorescente perante um radical peroxila (Cao et al., 1993; Roy et al., 2010). Já em métodos de transferência de elétrons, como o ensaio de sequestro do radical DPPH, a capacidade antioxidante na redução do oxidante 2,2-difenil-1-picrilhidrazil é acompanhada através da medição da mudança de cor do radical (Roy et al., 2010; Goupy et al., 2009).

Verificou-se que a atividade antioxidante *in vitro* da fração de antocianinas monoméricas de *S. nigra*, avaliada pelo ensaio DPPH (figura 5) e pelo ensaio de ORAC (figura 6), se mostrou eficaz, sendo equivalente àqueles obtidos com antioxidantes conhecidos como quercetina e trolox. Tal resultado sugeriu a investigação *in vivo* da atividade antioxidante desta fração, tanto os sistemas enzimáticos quanto os não-enzimáticos.

Nos humanos, o tripeptídeo endógeno glutathiona (GSH) é um dos mais importantes agentes de defesa celular nos órgãos e tecidos, incluindo o intestino. Esse tripeptídeo apresenta papel importante na citoproteção da mucosa contra o dano oxidativo, sendo responsável pela síntese e enovelamento de proteínas, bem como pela sinalização intracelular (Oz *et al.*, 2007; Ardite *et al.*, 2000). É um importante agente redutor e antioxidante, com a função de desintoxicar metabólitos de oxigênio reativo de origem endógena ou exógena, e por isso, encontrado em grandes concentrações nas células. Em estado de estresse oxidativo, GSH é convertido em sua forma oxidada (GSSG), pela ação da enzima glutathiona peroxidase (GPx). O balanço entre os níveis de GSH e GSSG garante à célula um ambiente redutor, prevenindo o dano oxidativo às macromoléculas celulares (Aw, 2005; Blair, 2010). Durante o processo inflamatório, nota-se uma queda nos níveis de GSH associada com a grande quantidade de EROs no sítio inflamatório.

O modelo de indução de colite por TNBS, juntamente com a ação oxidante de flavoproteínas específicas, gera grandes quantidades de EROs, incluindo o peróxido de hidrogênio. Esta característica do TNBS, juntamente com sua capacidade de reduzir os níveis de GSH, demonstra que este promove dois mecanismos independentes de lesão: limitação dos níveis de GSH e aumento dos níveis de EROs, que em conjunto

desencadeiam diversas reações que resultam em dano celular (Oz *et al.*, 2005; Mustafa *et al.*, 2006; Ardite *et al.*, 2000).

Os dados obtidos na indução de retocolite ulcerativa por TNBS (fig. 8) mostraram que houve depleção dos níveis de GSH no grupo TNBS, quando comparado aos do grupo salina. Além disso, foi possível observar que no grupo tratado com a fração de antocianinas monoméricas dos frutos de *S. nigra* a queda nos níveis de GSH foi evitada e, em conseqüência, houve redução da severidade da ação do TNBS sobre o sítio inflamatório e da geração de EROs, como foi observado na figura 7.

Em tecidos saudáveis as concentrações da enzima SOD são altas, sendo depletadas de acordo com a progressão de processos inflamatórios. Seguí e colaboradores (2004) relataram queda dos níveis da enzima em pacientes com RCU e DC. Além disso, um estudo piloto realizado pelos autores revelou significativa resposta clínica ao tratamento com um análogo de SOD. Yavuz e colaboradores (1999) documentaram significativa redução nos índices macroscópicos e microscópicos das lesões, após sete dias de tratamento com SOD em modelo experimental de colite induzido por TNBS.

Em nossos estudos observou-se queda nos níveis da enzima SOD no grupo TNBS, quando comparado ao grupo Salina, ao passo que a dose de 5 mg.Kg⁻¹ de antocianinas foi efetiva prevenindo a depleção dos níveis desta enzima. Tal ação pode contribuir para a proteção da mucosa contra os danos oxidativos causados pelo TNBS (figura 9). A queda da atividade da enzima durante o processo inflamatório pode estar relacionada com a baixa expressão de seu RNA mensageiro (Yao *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2009), ao passo que o tratamento com as antocianinas presentes nos frutos de *S. nigra* seria eficaz em evitar a queda da expressão deste RNAm.

GPx é uma das enzimas responsáveis por reduzir os níveis de peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos orgânicos, ácidos graxos livres e os hidroperóxidos fosfatidilcolina (Tham *et al.*, 2002). São encontradas níveis mensuráveis de GPx em todos os tecidos, mas a maior concentração de RNAm para a enzima se encontra nos rins. Diversos estudos relatam alterações nos níveis de GPx durante processos inflamatórios. O aumento da atividade da enzima está relacionado às elevadas concentrações de peróxido de hidrogênio presentes no tecido inflamado, sendo esse peróxido também consumido pela enzima catalase ou pela MPO. Rannem e colaboradores (1992) observaram que pacientes com DC apresentaram níveis reduzidos de GPx, tanto no plasma quanto nos eritrócitos.

Os resultados mostrados na figura 10 corroboraram com o referido autor. Neste estudo foi observado que, com 24 horas de indução por TNBS, os níveis da enzima se encontravam reduzidos, tanto no grupo TNBS quanto no grupo tratado com a fração de antocianinas dos frutos de *S. nigra*, quando os mesmos foram comparados com o grupo Salina. Tal resultado sugere que o H₂O₂ formado pela superóxido dismutase (SOD) é utilizado em outra reação, provavelmente pela reação da MPO (Rannem *et al.*, 1999).

Ao contrário da enzima GPx, a glutathiona redutase (GR) tem seu papel na restauração dos níveis de glutathiona através da redução da GSSG. Para tal esta enzima utiliza como cofator o NADPH e íons H⁺. Tal reação tem como finalidade garantir o balanço GSH/GSSG ao passo que durante o processo inflamatório os níveis de GSH são reduzidos e os níveis de GSSG aumentados, deixando a mucosa intestinal susceptível à danos oxidativos (Carlberg & Mannervik, 1986; Kim *et al.*, 2010).

Na figura 11 foi evidenciada queda dos níveis de GR, tanto no grupo TNBS, quanto nos grupos tratados com a fração de antocianinas de *S. nigra*, quando

comparados ao grupo salina. Os resultados obtidos foram semelhante àqueles obtidos na avaliação da atividade da enzima GPx. Tais resultados podem sugerir que o H_2O_2 gerado pela reação catalisada por SOD esteja sendo consumido por outra reação, assim como a GSH, que é depletada sob a influência do TNBS. Nieto e colaboradores (2000) e Sido e colaboradores (1998) relatam que GSH também pode ser consumida a partir de interação direta com compostos ativos do TNBS, um mecanismo conhecido como inativação de xenobióticos. Neste caso, a queda da atividade da γ -glutamilcisteína sintase, enzima-chave limitante da síntese de GSH em ratos, acompanhada pela diminuição da disponibilidade de cisteína, contribuem para a deficiência de GSH durante o processo inflamatório.

Aparentemente, tanto o oxigênio reativo quanto os radicais livres, parecem estar associados ao processo de envelhecimento, além de alguns processos patológicos como é o caso das inflamações. Para controlar e minimizar os efeitos desses agentes, os organismos se valem de sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. O desbalanço entre concentrações de agentes oxidantes e sistema antioxidante é extremamente importante na fisiopatologia das DII e na progressão do dano tecidual (Ek *et al.*, 2008; Baba *et al.*, 2009).

O mesmo H_2O_2 produzido pela SOD pode ainda ser reduzido à ácido hipocloroso (HOCl) e radical hidroxila ($\bullet OH$) em reação catalisada pela enzima mieloperoxidase (MPO). Esse HOCl, por sua vez, é dissociado em OCl^- e H^+ , sendo potencialmente perigosos ao tecido. Esta enzima é sintetizada por neutrófilos sendo, desse modo, bom indicador da infiltração deste tipo celular. Devido a isso, a quantificação dessa enzima é amplamente usada para avaliar processos inflamatórios intestinais (Witaicenis *et al.*, 2010; Kurutas *et al.*, 2005; Anezaki *et al.*, 1998; Kruidenier *et al.*, 2003). Massodi e colaboradores (2009), Witaicenis e colaboradores (2010) e Kruidenier e colaboradores

(2003) verificaram aumento da atividade de MPO em tecido cólico de pacientes com RCUI; verificaram ainda, a atividade da MPO em modelo de colite experimental induzido por TNBS, situação em que foi evidenciado aumento significativo da atividade da enzima nos animais que receberam uma dose de TNBS.

Verificou-se um aumento da atividade da enzima MPO no grupo TNBS decorridos 24h da indução (figura 12). A dose testada da fração de antocianinas dos frutos de sabugueiro foi eficaz em reduzir a ativação da enzima com conseqüente diminuição da produção de HOCl. Isso, em última análise, implica em redução dos danos teciduais causados pelo TNBS.

Por sua vez, a enzima catalase (CAT) participa, também, no processo de desintoxicação do H_2O_2 . Esta enzima, juntamente com GPx, tem por função evitar a formação de radicais livres e o início da peroxidação lipídica (Dost *et al.*, 2009). Cetinkaya e colaboradores (2005) e Bitiren e colaboradores (2010) demonstraram o aumento da atividade desta enzima em animais colíticos, ao passo que os animais tratados apresentaram queda de atividade da mesma. Estudo semelhante, realizado por Kruidenier e colaboradores (2003) também revelou aumento da atividade da enzima em pacientes que desenvolveram a inflamação intestinal, demonstrando uma maior atividade da enzima na lâmina própria do tecido intestinal.

Os resultados demonstrados na figura 13 revelam o aumento da atividade da enzima nos animais do grupo TNBS, ao passo que os animais que receberam a dose de 5 mg.Kg^{-1} de antocianinas presentes nos frutos de sabugueiro tiveram a atividade da mesma próxima àquela obtida nos animais não-colíticos (grupo salina). Tal resultado esta de acordo com resultados encontrados na literatura e demonstra uma possível melhora no processo inflamatório do grupo tratado, em virtude da redução da oferta de H_2O_2 . Em virtude do consumo de H_2O_2 pela CAT, houve redução da oferta de

peróxido para neutrófilos, reduzindo dessa forma a ativação destas células imunes e consequentemente a severidade do processo inflamatório.

Outras EROs importantes são os radicais peroxila ($\text{ROO}\bullet$), sendo a forma mais simples ($\text{HOO}\bullet$), a forma protonada do $\bullet\text{O}_2^-$, denominado radical hidroperóxido ou radical perhidroxila (Valko *et al.*, 2007). Aikens e Dix (1991) demonstraram que esse $\text{HOO}\bullet$ é responsável por iniciar a peroxidação de ácidos graxos por duas possíveis vias relacionadas com a presença de $\text{HOO}\bullet$. A via dependente de $\text{HOO}\bullet$ inicia a peroxidação de ácidos graxos, sendo relevante para os mecanismos de peroxidação lipídica *in vivo*. Através da reação de Fenton o H_2O_2 é convertido em radical hidroxila que, por sua vez, ao absorver um elétron de um ácido graxo poli-insaturado (LH), produz um radical lipídico ($\text{L}\bullet$). A interação desse radical com O_2 resulta na produção de $\text{LOO}\bullet$ que, por sua vez, se não for reduzido pela ação de agentes antioxidantes, dá início ao processo de peroxidação lipídica (Valko *et al.*, 2007). Diversos autores relatam o aumento dos níveis de malondialdeído (MDA), o indicador de peroxidação lipídica pela via do $\text{LOO}\bullet$, em modelos de retocolite ulcerativa induzidos por TNBS ou DSS (Lee *et al.*, 2010; Çetinel *et al.*, 2010; Abdolghaffari *et al.*, 2010). Tais resultados indicam que as EROs produzidas tanto por TNBS quanto por DSS não são reduzidas pelo sistema antioxidante, deixando o tecido cólico susceptível aos danos causados pelo composto MDA, molécula essa que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) no processo de peroxidação lipídica.

Verificou-se em mucosa intestinal que não houve alteração dos níveis de TBARS tanto no grupo TNBS quanto no grupo tratado, o que indica que as espécies reativas foram reduzidas antes da reação com os ácidos graxos poli-insaturados (figura 14). Provavelmente, a reação oxidativa foi desviada pela enzima MPO, através da produção de HOCl; com isso, o H_2O_2 produzido pela SOD não reage com metais de

transição (reação de Fenton) e dessa forma, não ocorre produção de $\text{OH}\cdot$, e nem formação de $\text{LOO}\cdot$.

Estudos anteriores com camundongos deficientes na produção de IL-10 ou naquela produção do receptor-2 para IL-10 (IL10R2) relatam que estes camundongos desenvolvem inflamação intestinal mediada por células $\text{T}_\text{H}1$, indicando que a citocina tem importante papel na regulação do sistema imune da mucosa (Zhou *et al.*, 2010; Lindsay *et al.*, 2002; Rennick and Fort, 2000; Sanchez-Muñoz *et al.*, 2008). IL-10 foi identificada pela primeira vez em 1989 como inibidor da síntese de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células $\text{T}_\text{H}1$, sendo produzida por diversas células, como monócitos, macrófagos, linfócitos T, células B, células dendríticas, mastócitos e por algumas linhagens de células tumorais (Li and He, 2004; Leach *et al.*, 1999).

No presente estudo, foi evidenciada a queda dos níveis de IL-10 no grupo TNBS, ao passo que o pré-tratamento com a dose de 5 mg.Kg-1 de antocianinas foi efetivo em evitar a queda dos níveis desta citocina, diminuindo dessa forma, a severidade do processo inflamatório (figura 15).

Com a queda dos níveis de citocinas anti-inflamatórias durante o processo inflamatório, há aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Uma dessas citocinas, a IL-12, é responsável pela regulação de células $\text{T}_\text{H}1$ e pelo aumento de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e da própria IL-12, potencializando dessa forma a resposta pró-inflamatória (Neuman M.G., 2007; Benjamini, Coico & Sunshine, 2002; Jyonouchi *et al.*, 2009; Fuss, I.J., 2008). Guan e colaboradores (2009), Becker e colaboradores (2006) e Carvalho e colaboradores (2007) observaram aumento dos níveis da IL-12 e queda dos níveis de citocinas anti-inflamatórias em tecido cólico, apontando as duas situações como importantes na retocolite ulcerativa induzida por TNBS.

Os resultados mostrados na figura 16 estão de acordo com aqueles obtidos pelos autores, apresentando aumento nos níveis de IL-12 no grupo TNBS. Já o grupo que recebeu a dose De 5 mg.Kg-1 de antocianinas, a exemplo do grupo salina apresentou níveis reduzidos da citocina.

Os dados obtidos na quantificação das duas enzimas, juntamente com o resultado da atividade da enzima MPO, sugerem aumento da expressão das células T_H2 e redução na expressão das células T_H1, além da menor concentração das células do sistema imune no sítio inflamatório. O aumento de IL-10, principalmente, é um efeito interessante apresentado por essas antocianinas, podendo justificar os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios apresentados ao longo deste trabalho. Esta interleucina apresenta um amplo espectro de atividades biológicas, especialmente aquele relativo à função inibitória sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, esta citocina diminui a formação de EROs e metabólitos de nitrogênio (Kawachi *et al.*, 2000).

6. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios bioquímicos realizados pode-se concluir que:

- Os resultados dos testes *in vitro* sugerem uma atividade antioxidante promissora para as antocianinas presentes nas frutas do *Sambucus nigra*;
- Além disso, estas antocianinas apresentaram atividade anti-inflamatória ao prevenir a mucosa cólica em modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS, através da manutenção dos níveis de IL-10 e redução dos níveis de IL-12;
- Os ensaios antioxidantes *in vivo* revelaram manutenção dos níveis de GSH e a modulação da enzima SOD, enquanto que não foi observado a modulação da atividade das enzimas GPx e GR. O resultado obtido no ensaio de peroxidação lipídica sugere a não participação deste mecanismo nas primeiras 24h de inflamação;
- A melhora no quadro inflamatório foi associada à diminuição de mediadores pró-inflamatórios como o MPO e a IL-12.
- Estas antocianinas foram eficazes no aumento da produção da interleucina anti-inflamatória IL-10, que por sua vez, participa na redução dos níveis de IL-12, agindo sobre a diferenciação de células T_{H0} em células T_{H1}.

Segundo os resultados obtidos neste trabalho e, considerando a necessidade de se obter tratamentos mais seguros para as DII, o tratamento com as antocianinas presentes nos frutos de *Sambucus nigra* é promissor, principalmente na prevenção da retocolite ulcerativa idiopática.

7. Perspectivas

- Analisar a participação de cada uma das antocianinas presentes nas frutas de *Sambucus nigra* nos receptores do tipo toll (TLR) e NOD no tecido inflamado;
- Avaliar a ação destas antocianinas sobre nociceptores presentes no tecido cólico inflamado;
- Avaliar sua ação sobre as atividades dos mediadores COX, TNF- α e NF κ B.
- Verificar os mediadores envolvidos na atividade cicatrizante.
- Histologia e Imunohistoquímica.
- Testar as frutas do sabugueiro como alimento adicional na dieta de pacientes com DII.

8. Bibliografia

1. Abbas, A. K. and Lichtman, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5° Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
2. Abdolghaffari, A. H., Baghaei, A., Moayer, F., Esmaily, H., Baeeri, M., Monsef-Esfahani, H. R., Hajiaghaee, R., and Abdollahi, M. On the benefit of Teucrium in murine colitis through improvement of toxic inflammatory mediators. **Hum. Exp. Toxicol.**, 29 (4), 287-295, 2010.
3. Aebi, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, 105, 121-126, 1984.
4. Aikens, J. and Dix, T. A. Perhydroxyl Radical (Hoo.) Initiated Lipid-Peroxidation-the Role of Fatty-Acid Hydroperoxides. **Journal of Biological Chemistry**, 266 (23), 15091-15098, 15-8-1991.
5. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **Nature**, 413 (6857), 732-738, 18-10-2001.
6. Allgayer, H. Clinical relevance of oxygen radicals in inflammatory bowel disease—facts and fashion. **Klin. Wochenschr.**, 69 (21-23), 1001-1003, 15-12-1991.
7. Anezaki, K., Asakura, H., Honma, T., Ishizuka, K., Funakoshi, K., Tsukada, Y., and Narisawa, R. Correlations between interleukin-8, and myeloperoxidase or luminol-dependent chemiluminescence in inflamed mucosa of ulcerative colitis. **Intern. Med.**, 37 (3), 253-258, 1998.
8. Ardite, E., Sans, M., Panes, J., Romero, F. J., Pique, J. M., and Fernandez-Checa, J. C. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. **Laboratory Investigation**, 80 (5), 735-744, 2000.

9. Ardizzone, S., Puttini, P. S., Cassinotti, A., and Porro, G. B. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. **Dig. Liver Dis.**, 40 Suppl 2 (S253-S259), 2008.
10. Ardizzone, S., Puttini, P. S., Cassinotti, A., and Porro, G. B. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. **Dig. Liver Dis.**, 40 Suppl 2 (S253-S259), 2008.
11. Aw, T. Y. Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 204 (3), 320-328, 1-5-2005.
12. Baba, H., Ohtsuka, Y., Haruna, H., Lee, T., Nagata, S., Maeda, M., Yamashiro, Y., and Shimizu, T. Studies of anti-inflammatory effects of Rooibos tea in rats. **Pediatr. Int.**, 51 (5), 700-704, 2009.
13. Balandrin, M. F., Klocke, J. A., Wurtele, E. S., and Bollinger, W. H. Natural Plant-Chemicals-Sources of Industrial and Medicinal Materials. **Science**, 228 (4704), 1154-1160, 1985.
14. Banning, A., Florian, S., Deubel, S., Thalmann, S., Muller-Schmehl, K., Jacobasch, G., and Brigelius-Flohe, R. GPx2 counteracts PGE2 production by dampening COX-2 and mPGES-1 expression in human colon cancer cells. **Antioxid. Redox. Signal.**, 10 (9), 1491-1500, 2008.
15. Bartsch, H. and Nair, J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. **Langenbecks Arch.Surg.**, 391 (5), 499-510, 2006.
16. Bartunkova, J., Tesar, V., and Sediva, A. Diagnostic and pathogenetic role of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. **Clin. Immunol.**, 106 (2), 73-82, 2003.

17. Baskol, M., Baskol, G., Kocer, D., Ozbakir, O., and Yucesoy, M. Advanced oxidation protein products-A novel marker of oxidative stress in ulcerative colitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, 42 (6), 687-691, 2008.
18. Becker, C., Dornhoff, H., Neufert, C., Fantini, M. C., Wirtz, S., Huebner, S., Nikolaev, A., Lehr, H. A., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Galle, P. R., Karow, M., and Neurath, M. F. Cutting edge: IL-23 cross-regulates IL-12 production in T cell-dependent experimental colitis. **J. Immunol.**, 177 (5), 2760-2764, 1-9-2006.
19. Bell, C. J., Gall, D. G., and Wallace, J. L. Disruption of Colonic Electrolyte Transport in Experimental Colitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 31 (4), G622-G630, 1995.
20. Bellido, G. G. and Beta, T. Anthocyanin composition and oxygen radical scavenging capacity (ORAC) of milled and pearled purple, black, and common barley. **J. Agric. Food Chem.**, 57 (3), 1022-1028, 11-2-2009.
21. Benjamini, E., Coico, R. Shunshine G. **Imunologia**, 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2002
22. Biesalski, H. K. Polyphenols and inflammation: basic interactions. **Curr. Opin.Clin. Nutr. Metab. Care**, 10 (6), 724-728, 2007.
23. Birrenbach, T. and Bocker, U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. **Inflamm. Bowel Dis.**, 10 (6), 848-859, 2004.
24. Bitiren, M., Karakilcik, A. Z., Zerir, M., Ozardali, I., Selek, S., Nazligul, Y., Ozgonul, A., Musa, D., and Uzunkoy, A. Protective effects of selenium and vitamin e combination on experimental colitis in blood plasma and colon of rats. **Biol. Trace Elem. Res.**, 136 (1), 87-95, 2010.

25. Bitiren, M., Karakilcik, A. Z., Zerin, M., Ozardali, I., Selek, S., Nazligul, Y., Ozgonul, A., Musa, D., and Uzunkoy, A. Protective Effects of Selenium and Vitamin E Combination on Experimental Colitis in Blood Plasma and Colon of Rats. **Biological Trace Element Research**, 136 (1), 87-95, 2010.
26. Blair, I. A. Analysis of endogenous glutathione-adducts and their metabolites. **Biomedical Chromatography**, 24 (1), 29-38, 2010.
27. Blair, I. A. Analysis of endogenous glutathione-adducts and their metabolites. **Biomed. Chromatogr.**, 24 (1), 29-38, 2010.
28. Blois, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of A Stable Free Radical. **Nature**, 181 (4617), 1199-1200, 1958.
29. Botos, I., Liu, L., Wang, Y., Segal, D. M., and Davies, D. R. The toll-like receptor 3:dsRNA signaling complex. **Biochim. Biophys. Acta**, 1789 (9-10), 667-674, 2009.
30. Byron, K. A., Varigos, G. A., and Wootton, A. M. Il-4 Production Is Increased in Cigarette Smokers. **Clinical and Experimental Immunology**, 95 (2), 333-336, 1994.
31. Cai, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. **Cardiovasc. Res.**, 68 (1), 26-36, 1-10-2005.
32. Camara, R. J., Ziegler, R., Begre, S., Schoepfer, A. M., and von, Kanel R. The role of psychological stress in inflammatory bowel disease: quality assessment of methods of 18 prospective studies and suggestions for future research. **Digestion**, 80 (2), 129-139, 2009.
33. Cao, G., Alessio, H. M., and Cutler, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radic. Biol. Med.**, 14 (3), 303-311, 1993.
34. Cario, E. Therapeutic impact of toll-like receptors on inflammatory bowel diseases: a multiple-edged sword. **Inflamm. Bowel Dis.**, 14 (3), 411-421, 2008.

35. Carlberg, I. and Mannervik, B. Glutathione-Reductase. **Methods in Enzymology**, 113 (484-490, 1985).
36. Carlberg, I. and Mannervik, B. Reduction of 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonate by Glutathione-Reductase and the Effect of Nadp+ on the Electron-Transfer. **Journal of Biological Chemistry**, 261 (4), 1629-1635, 5-2-1986.
37. Carrier, J., Aghdassi, E., Platt, I., Cullen, J., and Allard, J. P. Effect of oral iron supplementation on oxidative stress and colonic inflammation in rats with induced colitis. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 15 (12), 1989-1999, 2001.
38. Carvalho, A. T., Souza, H., Carneiro, A. J., Castelo-Branco, M., Madi, K., Schanaider, A., Silv, F., Pereira Junior, F. A., Pereira, M. G., Tortori, C., Dines, I., Carvalho, J., Rocha, E., and Elia, C. Therapeutic and prophylactic thalidomide in TNBS-induced colitis: synergistic effects on TNF-alpha, IL-12 and VEGF production. **World J. Gastroenterol.**, 13 (15), 2166-2173, 21-4-2007.
39. Cetinel, S., Hancioglu, S., Sener, E., Uner, C., Kilic, M., Sener, G., and Yegen, B. C. Oxytocin treatment alleviates stress-aggravated colitis by a receptor-dependent mechanism. **Regul. Pept.**, 160 (1-3), 146-152, 25-2-2010.
40. Cetinkaya, A., Bulbuloglu, E., Kurutas, E. B., Ciralik, H., Kantarceken, B., and Buyukbese, M. A. Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, 206 (2), 131-139, 2005.
41. Chan, A. C. and Carter, P. J. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, 10 (5), 301-316, 2010.
42. Cho, C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **J. Physiol Paris**, 95 (1-6), 253-256, 2001.
43. Cho, J. H. and Abraham, C. Inflammatory bowel disease genetics: Nod2. **Annual Review of Medicine**, 58 (401-416, 2007).

44. Coquerelle, C., Oldenhove, G., Acolty, V., Denoed, J., Vansanten, G., Verdebout, J. M., Mellor, A., Bluestone, J. A., and Moser, M. Anti-CTLA-4 treatment induces IL-10-producing ICOS⁺ regulatory T cells displaying IDO-dependent anti-inflammatory properties in a mouse model of colitis. **Gut**, 58 (10), 1363-1373, 2009.
45. Crohn's & Colitis Foundation of America.(www.ccfa.org)
46. Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., and Dyatmiko, W. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. **Helvetica Chimica Acta**, 80 (4), 1144-1152, 1997.
47. Damiani, C. R., Benetton, C. A., Stoffel, C., Bardini, K. C., Cardoso, V. H., Di, Giunta G., Pinho, R. A., Dal-Pizzol, F., and Streck, E. L. Oxidative stress and metabolism in animal model of colitis induced by dextran sulfate sodium. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, 22 (11), 1846-1851, 2007.
48. de Araujo Burgos, M. G., Salviano, F. N., da Silva Belo, G. M., and Bion, F. M. Intestinal inflammatory diseases: what is new in nutritional therapy? **Ver. Bras. Nutr. Clin.**, 23 (3), 184-189, 2008.
49. Dechairo, B., Dimon, C., van, Heel D., Mackay, I., Edwards, M., Scambler, P., Jewell, D., Cardon, L., Lench, N., and Carey, A. Replication and extension studies of inflammatory bowel disease susceptibility regions confirm linkage to chromosome 6p (IBD3). **Eur. J. Hum. Genet.**, 9 (8), 627-633, 2001.
50. Dost, T., Ozkayran, H., Gokalp, F., Yenisey, C., and Birincioglu, M. The Effect of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) on Experimental Colitis in Rat. **Digestive Diseases and Sciences**, 54 (6), 1214-1221, 2009.
51. Dryden, G. W., Jr., Deaciuc, I., Arteel, G., and McClain, C. J. Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, 7 (4), 308-316, 2005.

52. Du, C. T., Wang, P. L., and Francis, F. J. Anthocyanins of Ornamental Cherries. *Journal of Food Science*, 40 (6), 1142-1144, 1975.
53. Du, C. T., Wang, P. L., and Francis, F. J. Anthocyanins of Pomegranate, *Punica-Granatum*. *Journal of Food Science*, 40 (2), 417-418, 1975.
54. Duarte, F. A. L., As antocianinas da boga do sabugueiro como corantes de alimentos. 1987. 112f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Tecnologia de Indústrias Químicas, Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial, Lisboa, 1987.
55. Dudhgaonkar, S. P., Tandan, S. K., Kumar, D., Raviprakash, V., and Kataria, M. Influence of simultaneous inhibition of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in experimental colitis in rats. ***Inflammopharmacology.***, 15 (5), 188-195, 2007.
56. Eastwood, M. A. A molecular biological basis for the nutritional and pharmacological benefits of dietary plants. ***Qjm-An International Journal of Medicine***, 94 (1), 45-48, 2001.
57. Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. F., and Nabavi, S. M. Antioxidant activities of methanol extract of *Sambucus ebulus* L. flower. ***Pak. J. Biol. Sci.***, 12 (5), 447-450, 1-3-2009.
58. Ek, R. O., Serter, M., Ergin, K., Yildiz, Y., Cecen, S., Kavak, T., and Yenisey, C. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on TNBS-induced colitis in ovariectomized rats. ***Dig. Dis. Sci.***, 53 (6), 1609-1617, 2008.
59. El-Abhar, H. S., Hammad, L. N., and Gawad, H. S. Modulating effect of ginger extract on rats with ulcerative colitis. ***J. Ethnopharmacol.***, 118 (3), 367-372, 13-8-2008.

60. Elliott, M., Benson, J., Blank, M., Brodmerkel, C., Baker, D., Sharples, K. R., and Szapary, P. Ustekinumab: lessons learned from targeting interleukin-12/23p40 in immune-mediated diseases. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1182 (97-110), 2009.
61. Engel, M. A. and Neurath, M. F. New pathophysiological insights and modern treatment of IBD. **J. Gastroenterol.**, 45 (6), 571-583, 2010.
62. Faure, P. & Lafond, J.L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Analysis of free radicals in biological systems. FAVIER A. E. et al. Eds. Verla Bostonp, p. 237-248, 1995.
63. Feagins, L. A. and Cryer, B. L. Do non-steroidal anti-inflammatory drugs cause exacerbations of inflammatory bowel disease? **Dig. Dis. Sci.**, 55 (2), 226-232, 2010.
64. Fuss, I. J. Is the Th1/Th2 paradigm of immune regulation applicable to IBD? **Inflamm. Bowel Dis.**, 14 Suppl 2 (S110-S112), 2008.
65. Fuss, I. J. Is the Th1/Th2 paradigm of immune regulation applicable to IBD? **Inflamm. Bowel Dis.**, 14 Suppl 2 (S110-S112), 2008.
66. Fuss, I. J., Boirivant, M., Lacy, B., and Strober, W. The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis. **J. Immunol.**, 168 (2), 900-908, 15-1-2002.
67. Garrett, W. S., Gordon, J. I., and Glimcher, L. H. Homeostasis and inflammation in the intestine. **Cell**, 140 (6), 859-870, 19-3-2010.
68. Geerling, B. J., Dagnelie, P. C., Badart-Smook, A., Russel, M. G., Stockbrugger, R. W., and Brummer, R. J. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. **Am. J. Gastroenterol.**, 95 (4), 1008-1013, 2000.
69. Giris, M., Depboylu, B., Dogru-Abbasoglu, S., Erbil, Y., Olgac, V., Alis, H., Aykac-Toker, G., and Uysal, M. Effect of taurine on oxidative stress and apoptosis-related

- protein expression in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. **Clin. Exp. Immunol.**, 152 (1), 102-110, 2008.
70. Goupy, P., Bautista-Ortin, A. B., Fulcrand, H., and Dangles, O. Antioxidant activity of wine pigments derived from anthocyanins: hydrogen transfer reactions to the dpph radical and inhibition of the heme-induced peroxidation of linoleic acid. **J. Agric. Food Chem.**, 57 (13), 5762-5770, 8-7-2009.
71. Guan, Q., Ma, Y., Hillman, C. L., Ma, A., Zhou, G., Qing, G., and Peng, Z. Development of recombinant vaccines against IL-12/IL-23 p40 and in vivo evaluation of their effects in the downregulation of intestinal inflammation in murine colitis. **Vaccine**, 27 (50), 7096-7104, 23-11-2009.
72. Guiducci, C., Coffman, R. L., and Barrat, F. J. Signalling pathways leading to IFN-alpha production in human plasmacytoid dendritic cell and the possible use of agonists or antagonists of TLR7 and TLR9 in clinical indications. **Journal of Internal Medicine**, 265 (1), 43-57, 2009.
73. Gulec, B., Yasar, M., Yildiz, S., Oter, S., Akay, C., Deveci, S., and Sen, D. Effect of hyperbaric oxygen on experimental acute distal colitis. **Physiol Res.**, 53 (5), 493-499, 2004.
74. Hager, A., Howard, L. R., Prior, R. L., and Brownmiller, C. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed black raspberry products. **J. Food Sci.**, 73 (6), H134-H140, 2008.
75. Harborne, J. B. Anthocyanins and their sugar components. *Fortschr.Chem.Org.Naturst.*, 20, 165-199, 1962.

76. Harisa, G. E., Abo-Salem, O. M., El-Sayed, el, Taha, E. I., and El-Halawany, N. L-arginine augments the antioxidant effect of garlic against acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. **Pak. J. Pharm. Sci.**, 22 (4), 373-380, 2009.
77. Head, K. A. and Jurenka, J. S. Inflammatory bowel disease Part 1: ulcerative colitis—pathophysiology and conventional and alternative treatment options. **Altern. Med. Rev.**, 8 (3), 247-283, 2003.
78. Head, K. and Jurenka, J. S. Inflammatory bowel disease. Part II: Crohn's disease—pathophysiology and conventional and alternative treatment options. **Altern. Med. Rev.**, 9 (4), 360-401, 2004.
79. Hoffmann, J. C., Peters, K., Henschke, S., Herrmann, B., Pfister, K., Westermann, J., and Zeitz, M. Role of T lymphocytes in rat 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) induced colitis: increased mortality after gammadelta T cell depletion and no effect of alphabeta T cell depletion. **Gut**, 48 (4), 489-495, 2001.
80. Hou, J. K., El-Serag, H., and Thirumurthi, S. Distribution and manifestations of inflammatory bowel disease in Asians, Hispanics, and African Americans: a systematic review. **Am. J. Gastroenterol.**, 104 (8), 2100-2109, 2009.
81. Huang, D. J., Ou, B. X., and Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53 (6), 1841-1856, 23-3-2005.
82. Huang, D., Ou, B., and Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, 53 (6), 1841-1856, 23-3-2005.
83. Ishihara, T., Tanaka, K., Tasaka, Y., Namba, T., Suzuki, J., Ishihara, T., Okamoto, S., Hibi, T., Takenaga, M., Igarashi, R., Sato, K., Mizushima, Y., and Mizushima, T. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase against colitis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 328 (1), 152-164, 2009.

84. Ishihara, T., Tanaka, K., Tasaka, Y., Namba, T., Suzuki, J., Ishihara, T., Okamoto, S., Hibi, T., Takenaga, M., Igarashi, R., Sato, K., Mizushima, Y., and Mizushima, T. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase against colitis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 328 (1), 152-164, 2009.
85. Iskratsch, T., Braun, A., Paschinger, K., and Wilson, I. B. Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. **Anal. Biochem.**, 386 (2), 133-146, 15-3-2009.
86. Jyonouchi, H., Geng, L., Cushing-Ruby, A., and Monteiro, I. M. Aberrant responses to TLR agonists in pediatric IBD patients; the possible association with increased production of Th1/Th17 cytokines in response to candida, a luminal antigen. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 21 (4 Pt 2), e747-e755, 2010.
87. Karban, A. and Eliakim, R. Effect of smoking on inflammatory bowel disease: Is it disease or organ specific? **World J. Gastroenterol.**, 13 (15), 2150-2152, 21-4-2007.
88. Karlinger, K., Gyorke, T., Mako, E., Mester, A., and Tarjan, Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Eur. J. Radiol.**, 35 (3), 154-167, 2000.
89. Kawachi, S., Jennings, S., Panes, J., Cockrell, A., Laroux, F. S., Gray, L., Perry, M., Van der Heyde, H., Balish, E., Granger, D. N., Specian, R. A., and Grisham, M. B. Cytokine and endothelial cell adhesion molecule expression in interleukin-10-deficient mice. **Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol**, 278 (5), G734-G743, 2000.
90. Kefalakes, H., Stylianides, T. J., Amanakis, G., and Kolios, G. Exacerbation of inflammatory bowel diseases associated with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: myth or reality? **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, 65 (10), 963-970, 2009.

91. Kim, S. J., Jung, H. J., Hyun, D. H., Park, E. H., Kim, Y. M., and Lim, C. J. Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells. **Biochimie**, 17-3-2010.
92. Kitahora, T., Suzuki, K., Asakura, H., Yoshida, T., Suematsu, M., Watanabe, M., Aiso, S., and Tsuchiya, M. Active oxygen species generated by monocytes and polymorphonuclear cells in Crohn's disease. **Dig. Dis. Sci.**, 33 (8), 951-955, 1988.
93. Kitani, A., Fuss, I. J., Nakamura, K., Schwartz, O. M., Usui, T., and Strober, W. Treatment of experimental (Trinitrobenzene sulfonic acid) colitis by intranasal administration of transforming growth factor (TGF)-beta1 plasmid: TGF-beta1-mediated suppression of T helper cell type 1 response occurs by interleukin (IL)-10 induction and IL-12 receptor beta2 chain downregulation. **J. Exp. Med.**, 192 (1), 41-52, 3-7-2000.
94. Ko, J. K., Sham, N. F., Guo, X., and Cho, C. H. Beneficial intervention of experimental colitis by passive cigarette smoking through the modulation of cytokines in rats. **J. Investig. Med.**, 49 (1), 21-29, 2001.
95. Krawisz, J. E., Sharon, P., and Stenson, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, 87 (6), 1344-1350, 1984.
96. Kruidenier, L. and Verspaget, H. W. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous? **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 16 (12), 1997-2015, 2002.
97. Kruidenier, L., Kuiper, I., van Duijn, W., Marklund, S. L., van Hogezaand, R. A., Lamers, C. B. H. W., and Verspaget, H. W. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. **Journal of Pathology**, 201 (1), 7-16, 2003.

98. Kruidenier, L., Kuiper, I., van Duijn, W., Mieremet-Ooms, M. A. C., van Hogezaand, R. A., Lamers, C. B. H. W., and Verspaget, H. W. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. **Journal of Pathology**, 201 (1), 17-27, 2003.
99. Kruidenier, L., Kulper, I., Lamers, C. B. H. W., and Verspaget, H. W. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. **Journal of Pathology**, 201 (1), 28-36, 2003.
100. Kruidenier, L., Van Meeteren, M. E., Kuiper, I., Jaarsma, D., Lamers, C. B. H. W., Zijlstra, F. J., and Verspaget, H. W. Attenuated mild colonic inflammation and improved survival from severe DSS-colitis of transgenic Cu/Zn-SOD mice. **Free Radical Biology and Medicine**, 34 (6), 753-765, 15-3-2003.
101. Krzystek-Korpacka, M., Neubauer, K., Berdowska, I., Zielinski, B., Paradowski, L., and Gamian, A. Impaired erythrocyte antioxidant defense in active inflammatory bowel disease: Impact of anemia and treatment. **Inflamm. Bowel. Dis.**, 23-2-2010.
102. Kuhbacher, T. and Folsch, U. R. Practical guidelines for the treatment of inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.**, 13 (8), 1149-1155, 28-2-2007.
103. Kurutas, E. B., Cetinkaya, A., Bulbuloglu, E., and Kantarceken, B. Effects of antioxidant therapy on leukocyte myeloperoxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase and plasma malondialdehyde levels in experimental colitis. **Mediators of Inflammation**, (6), 390-394, 2005.
104. Lakner, L., Csongei, V., Sarlos, P., Jaromi, L., Safrany, E., Varga, M., Orosz, P., Magyari, L., Bene, J., Miheller, P., Tulassay, Z., and Melegh, B. IGR2096a_1 T and IGR2198a_1 C alleles on IBD5 locus of chromosome 5q31 region confer risk for Crohn's disease in Hungarian patients. **Int. J. Colorectal Dis.**, 24 (5), 503-507, 2009.

105. Leach, M. W., Davidson, N. J., Fort, M. M., Powrie, F., and Rennick, D. M. The role of IL-10 in inflammatory bowel disease: "of mice and men". **Toxicol. Pathol.**, 27 (1), 123-133, 1999.
106. Lee, I. A., Bae, E. A., Hyun, Y. J., and Kim, D. H. Dextran sulfate sodium and 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid induce lipid peroxidation by the proliferation of intestinal gram-negative bacteria in mice. **J. Inflamm. (Lond)**, 7 (7-2010).
107. Lee, J. S., Park, S. Y., Thapa, D., Choi, M. K., Chung, I. M., Park, Y. J., Yong, C. S., Choi, H. G., and Kim, J. A. Grifola frondosa water extract alleviates intestinal inflammation by suppressing TNF-alpha production and its signaling. **Exp. Mol. Med.**, 42 (2), 143-154, 28-2-2010.
108. Lee, J., Kim, M. S., Kim, E. Y., Park, H. J., Chang, C. Y., Jung, D. Y., Kwon, C. H., Joh, J. W., and Kim, S. J. 15-deoxyspergualin prevents mucosal injury by inhibiting production of TNF-alpha and down-regulating expression of MD-1 in a murine model of TNBS-induced colitis. **Int. Immunopharmacol.**, 7 (8), 1003-1012, 2007.
109. Lesage, S., Zouali, H., Colombel, J. F., Belaiche, J., Cezard, J. P., Tysk, C., Almer, S., Gassull, M., Binder, V., Chamaillard, M., Le, Gall, I, Thomas, G., and Hugot, J. P. Genetic analyses of chromosome 12 loci in Crohn's disease. **Gut**, 47 (6), 787-791, 2000.
110. Levin, A. and Shibolet, O. Toll-like receptors in inflammatory bowel disease—stepping into uncharted territory. **World J. Gastroenterol.**, 14 (33), 5149-5153, 7-9-2008.
111. Lewis, K., Lutgendorff, F., Phan, V., Soderholm, J. D., Sherman, P. M., and McKay, D. M. Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate. **Inflamm. Bowel Dis.**, 16 (7), 1138-1148, 2010.

112. Li, J., Norgard, B., Precht, D. H., and Olsen, J. Psychological stress and inflammatory bowel disease: a follow-up study in parents who lost a child in Denmark. **Am. J. Gastroenterol.**, 99 (6), 1129-1133, 2004.
113. Li, M. C. and He, S. H. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.**, 10 (5), 620-625, 1-3-2004.
114. Lindsay, J., Van, Montfrans C., Brennan, F., Van, Deventer S., Drilenburg, P., Hodgson, H., Te, Velde A., and Sol Rodriguez, Pena M. IL-10 gene therapy prevents TNBS-induced colitis. **Gene Ther.**, 9 (24), 1715-1721, 2002.
115. Loftus, E. V., Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, 126 (6), 1504-1517, 2004.
116. Luchini, A. C., Rodrigues-Orsi, P., Cestari, S. H., Seito, L. N., Witacenis, A., Pellizzon, C. H., and Di Stasi, L. C. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Biol. Pharm. Bull.**, 31 (7), 1343-1350, 2008.
117. Luchini, A. C., Rodrigues-Orsi, P., Cestari, S. H., Seito, L. N., Witacenis, A., Pellizzon, C. H., and Di Stasi, L. C. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 31 (7), 1343-1350, 2008.
118. Martinez-Montiel, M. P. and Munoz-Yague, M. T. Biologic therapies for chronic inflammatory bowel disease. **Rev. Esp. Enferm. Dig.**, 98 (4), 265-291, 2006.
119. Martinon, F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. **Eur. J. Immunol.**, 40 (3), 616-619, 2010.
120. Masoodi, I., Kochhar, R., Dutta, U., Vaishnavi, C., Prasad, K. K., Vaiphei, K., Kaur, S., and Singh, K. Fecal lactoferrin, myeloperoxidase and serum C-reactive are

- effective biomarkers in the assessment of disease activity and severity in patients with idiopathic ulcerative colitis. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, 24 (11), 1768-1774, 2009.
121. Mateus, N., Oliveira, J., Haettich-Motta, M., and de, Freitas, V. New Family of Bluish Pyranoanthocyanins. **J. Biomed. Biotechnol.**, 2004 (5), 299-305, 2004.
122. Matsumoto, M. and Seya, T. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60 (7), 805-812, 29-4-2008.
123. Mayer, L. Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. **J. Gastroenterol.**, 45 (1), 9-16, 2010.
124. Maynard, C. L. and Weaver, C. T. Intestinal Effector T Cells in Health and Disease. **Immunity**, 31 (3), 389-400, 18-9-2009.
125. McCartney SA, Mitchell JA, Fairclough PD, Farthing MJ, Warner TD. Selective COX-2 inhibitors and human inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 13, 1115-57, 1999.
126. McNeilly, T. N., Mitchell, M. C., Nisbet, A. J., McAteer, S., Erridge, C., Inglis, N. F., Smith, D. G., Low, J. C., Gally, D. L., Huntley, J. F., and Mahajan, A. IgA and IgG antibody responses following systemic immunization of cattle with native H7 flagellin differ in epitope recognition and capacity to neutralise TLR5 signalling. **Vaccine**, 28 (5), 1412-1421, 3-2-2010.
127. Millar, A. D., Rampton, D. S., Chander, C. L., Claxson, A. W., Blades, S., Coumbe, A., Panetta, J., Morris, C. J., and Blake, D. R. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. **Gut**, 39 (3), 407-415, 1996.

128. Moghadasian, M. H., Freeman, H. J., and Godin, D. V. Endogenous antioxidant status in neoplastic and adjacent tissues in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats: effects of olsalazine. **Carcinogenesis**, 17 (5), 983-987, 1996.
129. Moreels, T. G., De Man, J. G., De Winter, B. Y., Timmermans, J. P., Herman, A. G., and Pelckmans, P. A. Effect of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS)-induced ileitis on the motor function of non-inflamed rat gastric fundus. **Neurogastroenterol. Motil.**, 13 (4), 339-352, 2001.
130. Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S., Depew, W. T., Szewczuk, M. R., and Wallace, J. L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, 96 (3), 795-803, 1989.
131. Motley, R. J., Rhodes, J., Williams, G., Tavares, I. A., and Bennett, A. Smoking, eicosanoids and ulcerative colitis. **J. Pharm. Pharmacol.**, 42 (4), 288-289, 1990.
132. Moum, B. Medical treatment: does it influence the natural course of inflammatory bowel disease? **Eur. J. Intern. Med.**, 11 (4), 197-203, 2000.
133. Mustafa, A., El-Medany, A., Hagar, H. H., and El-Medany, G. Ginkgo biloba attenuates mucosal damage in a rat model of ulcerative colitis. **Pharmacological Research**, 53 (4), 324-330, 2006.
134. Naito, Y., Takagi, T., and Yoshikawa, T. Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, 41 (1), 18-26, 2007.
135. Nakamura, T., Nagahori, M., Kanai, T., and Watanabe, M. Current pharmacologic therapies and emerging alternatives in the treatment of ulcerative colitis. **Digestion**, 77 Suppl 1 (36-41), 2008.
136. Necefli, A., Tulumoglu, B., Giris, M., Barbaros, U., Gunduz, M., Olgac, V., Guloglu, R., and Toker, G. The effect of melatonin on TNBS-induced colitis. **Dig. Dis. Sci.**, 51 (9), 1538-1545, 2006.

137. Neuman, M. G. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. **Translational Research**, 149 (4), 173-186, 2007.
138. Neuman, M. G. Signaling for inflammation and repair in inflammatory bowel disease. **Rom. J. Gastroenterol.**, 13 (4), 309-316, 2004.
139. Nieto, N., Torres, M. I., Fernandez, M. I., Giron, M. D., Rios, A., Suarez, M. D., and Gil, A. Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. **Dig. Dis. Sci.**, 45 (9), 1820-1827, 2000.
140. Nizamutdinova, I. T., Kim, Y. M., Chung, J. I., Shin, S. C., Jeong, Y. K., Seo, H. G., Lee, J. H., Chang, K. C., and Kim, H. J. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells. **Food Chem.Toxicol.**, 47 (11), 2806-2812, 2009.
141. O'Neill, L. A. J., Bryant, C. E., and Doyle, S. L. Therapeutic Targeting of Toll-Like Receptors for Infectious and Inflammatory Diseases and Cancer. **Pharmacological Reviews**, 61 (2), 177-197, 2009.
142. Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.**, 95 (2), 351-358, 1979.
143. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., and Prior, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **J. Agric. Food Chem.**, 49 (10), 4619-4626, 2001.
144. Oz, H. S., Chen, T. S., and Nagasawa, H. Comparative efficacies of 2 cysteine prodrugs and a glutathione delivery agent in a colitis model. **Translational Research**, 150 (2), 122-129, 2007.
145. Oz, H. S., Chen, T. S., McClain, C. J., and de Villiers, W. J. S. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 16 (5), 297-304, 2005.

146. Paiotti, A. P., Miszputen, S. J., Oshima, C. T., de Oliveira, Costa H., Ribeiro, D. A., and Franco, M. Effect of COX-2 inhibitor after TNBS-induced colitis in Wistar rats. **J. Mol. Histol.**, 40 (4), 317-324, 2009.
147. Persson, P. G., Ahlbom, A., and Hellers, G. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. **Epidemiology**, 3 (1), 47-52, 1992.
148. Pierik, M., Rutgeerts, P., Vlietinck, R., and Vermeire, S. Pharmacogenetics in inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.**, 12 (23), 3657-3667, 21-6-2006.
149. Pineton de, Chambrun G., Peyrin-Biroulet, L., Lemann, M., and Colombel, J. F. Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, 7 (1), 15-29, 2010.
150. Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L. W., Wu, X. L., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D. J., Ou, B. X., and Jacob, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51 (11), 3273-3279, 21-5-2003.
151. Prior, R. L., Wu, X., and Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agric. Food Chem.**, 53 (10), 4290-4302, 18-5-2005.
152. Rahman, I., Biswas, S. K., and Kirkham, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochem.Pharmacol.**, 72 (11), 1439-1452, 30-11-2006.
153. Ran, Z. H., Chen, C., and Xiao, S. D. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates rats colitis induced by acetic acid. **Biomed.Pharmacother.**, 62 (3), 189-196, 2008.

154. Rannem, T., Ladefoged, K., Hylander, E., Hegnhøj, J., and Jarnum, S. Selenium Status in Patients with Crohns-Disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, 56 (5), 933-937, 1992.
155. Reif, S., Klein, I., Lubin, F., Farbstein, M., Hallak, A., and Gilat, T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. **Gut**, 40 (6), 754-760, 1997.
156. Reimund, J. M., Allison, A. C., Muller, C. D., Dumont, S., Kenney, J. S., Baumann, R., Duclos, B., and Poindron, P. Antioxidants inhibit the in vitro production of inflammatory cytokines in Crohn's disease and ulcerative colitis. **European Journal of Clinical Investigation**, 28 (2), 145-150, 1998.
157. Rennick, D. M. and Fort, M. M. Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10(-/-) mice and intestinal inflammation. **Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol**, 278 (6), G829-G833, 2000.
158. Rieger, G., Muller, M., Guttenberger, H., and Bucar, F. Influence of altitudinal variation on the content of phenolic compounds in wild populations of *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra*, and *Vaccinium myrtillus*. **J.Agric.Food Chem.**, 56 (19), 9080-9086, 8-10-2008.
159. Roessner, A., Kuester, D., Malfertheiner, P., and Schneider-Stock, R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. **Pathol.Res.Pract.**, 204 (7), 511-524, 2008.
160. Roozendaal, C., Zhao, M. H., Horst, G., Lockwood, C. M., Kleibeuker, J. H., Limburg, P. C., Nelis, G. F., and Kallenberg, C. G. M. Catalase and alpha-enolase: two novel granulocyte autoantigens in inflammatory bowel disease (IBD). **Clinical and Experimental Immunology**, 112 (1), 10-16, 1998.
161. Roy, M. K., Koide, M., Rao, T. P., Okubo, T., Ogasawara, Y., and Juneja, L. R. ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions:

- relationship between total polyphenol and individual catechin content. **Int.J.Food Sci.Nutr.**, 61 (2), 109-124, 2010.
162. Rugtveit, J., Haraldsen, G., Hogasen, A. K., Bakka, A., Brandtzaeg, P., and Scott, H. Respiratory burst of intestinal macrophages in inflammatory bowel disease is mainly caused by CD14+L1+ monocyte derived cells. **Gut**, 37 (3), 367-373, 1995.
163. Salvador, M. J., Ferreira, E. O., Mertens-Talcott, S. U., De Castro, W. V., Butterweck, V., Derendorf, H., and Dias, D. A. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. **Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences**, 61 (1-2), 19-25, 2006.
164. Sanchez-Munoz, F., Dominguez-Lopez, A., and Yamamoto-Furusho, J. K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. **World J.Gastroenterol.**, 14 (27), 4280-4288, 21-7-2008.
165. Sandborn, W. J. and Targan, S. R. Biologic therapy of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 122 (6), 1592-1608, 2002.
166. Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto R., Filesi, C., and Masella, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Ann. Ist. Super. Sanita**, 43 (4), 394-405, 2007.
167. Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 45 (4), 287-306, 2005.
168. Schmitzer, V., Veberic, R., Slatnar, A., and Stampar, F. Elderberry (*Sambucus nigra* L.) wine: a product rich in health promoting compounds. **J. Agric. Food Chem.**, 58 (18), 10143-10146, 22-9-2010.

169. Schrenk, D. Dietary fiber, low-molecular-weight food constituents and colo-rectal inflammation in animal models—a review. **Mol. Nutr. Food Res.**, 53 (10), 1281-1288, 2009.
170. Schwartz, M. and Cohen, R. Optimizing conventional therapy for inflammatory bowel disease. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, 10 (6), 585-590, 2008.
171. Scopel, M., Mentz, L. A., and Henriques, A. T. Comparative analysis of Sambucus nigra and Sambucus australis flowers: development and validation of an HPLC method for raw material quantification and preliminary stability study. **Planta Med.**, 76 (10), 1026-1031, 2010.
172. Segui, J., Gironella, M., Sans, M., Granell, S., Gil, F., Gimeno, M., Coronel, P., Pique, J. M., and Panes, J. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. **Journal of Leukocyte Biology**, 76 (3), 537-544, 2004.
173. Shanahan, F. and Bernstein, C. N. The evolving epidemiology of inflammatory bowel disease. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, 25 (4), 301-305, 2009.
174. Shen, W. and Durum, S. K. Synergy of IL-23 and Th17 cytokines: new light on inflammatory bowel disease. **Neurochem. Res.**, 35 (6), 940-946, 2010.
175. Sher, M. E., Bank, S., Greenberg, R., Sardinha, T. C., Weissman, S., Bailey, B., Gilliland, R., and Wexner, S. D. The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, 5 (2), 73-78, 1999.
176. Sicilia, B., Vicente, R., and Gomollon, F. [Epidemiology of inflammatory bowel disease: controversies in classical epidemiology]. **Acta Gastroenterol. Latinoam.**, 39 (2), 135-145, 2009.

177. Sido, B., Hack, V., Hochlehnert, A., Lipps, H., Herfarth, C., and Droge, W. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, 42 (4), 485-492, 1998.
178. Sonnenberg, A. Age distribution of IBD hospitalization. **Inflamm. Bowel Dis.**, 16 (3), 452-457, 2010.
179. Souza, M. H., Troncon, L. E., Rodrigues, C. M., Viana, C. F., Onofre, P. H., Monteiro, R. A., Passos, A. D., Martinelli, A. L., and Meneghelli, U. G. [Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospital in southeastern Brazil]. **Arq Gastroenterol.**, 39 (2), 98-105, 2002.
180. Souza, M. M., Belasco, A. G. S., and Aguilar-Nascimento, J. E., and Dock-Nascimento, D. B. The Epidemiological Profile of Patients with Inflammatory Bowel Disease in the State of Mato Grosso. **Rev. Bras. Coloproct.**, 28(3), 324-328, 2008.
181. Stevenson, D. E. and Hurst, R. D. Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more? **Cell Mol. Life Sci.**, 64 (22), 2900-2916, 2007.
182. Su, C. G., Judge, T. A., and Lichtenstein, G. R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, 31 (1), 307-327, 2002.
183. Takagi, T., Naito, Y., Inoue, M., Akagiri, S., Mizushima, K., Handa, O., Kokura, S., Ichikawa, H., and Yoshikawa, T. Inhalation of carbon monoxide ameliorates collagen-induced arthritis in mice and regulates the articular expression of IL-1beta and MCP-1. **Inflammation**, 32 (2), 83-88, 2009.
184. Takeda, K. and Akira, S. TLR signaling pathways. **Semin. Immunol.**, 16 (1), 3-9, 2004.
185. Takeuchi, O. and Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, 140 (6), 805-820, 19-3-2010.

186. te Velde, A. A., Verstege, M. I., and Hommes, D. W. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. **Inflamm. Bowel. Dis.**, 12 (10), 995-999, 2006.
187. Teng, X., Xu, L. F., Zhou, P., Sun, H. W., and Sun, M. Effects of trefoil peptide 3 on expression of TNF-alpha, TLR4, and NF-kappaB in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis mice. **Inflammation**, 32 (2), 120-129, 2009.
188. Testro, A. G. and Visvanathan, K. Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, 24 (6), 943-954, 2009.
189. Tham, D. M., Whitin, J. C., and Cohen, H. J. Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. **Pediatric Research**, 51 (5), 641-646, 2002.
190. Tragnone, A., Valpiani, D., Miglio, F., Elmi, G., Bazzocchi, G., Pipitone, E., and Lanfranchi, G. A. Dietary habits as risk factors for inflammatory bowel disease. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, 7 (1), 47-51, 1995.
191. Tuzun, A., Erdil, A., Inal, V., Aydin, A., Bagci, S., Yesilova, Z., Sayal, A., Karaeren, N., and Dagalp, K. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. **Clin. Biochem.**, 35 (7), 569-572, 2002.
192. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 39 (1), 44-84, 2007.
193. Vatn, M. H. Natural history and complications of IBD. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, 11 (6), 481-487, 2009.
194. Vlachojannis, J. E., Cameron, M., and Chrubasik, S. A Systematic Review on the Sambuci fructus Effect and Efficacy Profiles. **Phytotherapy Research**, 24 (1), 1-8, 2010.

195. Wang, H., Cao, G. H., and Prior, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45 (2), 304-309, 1997.
196. Wang, J. and Slungaard, A. Role of eosinophil peroxidase in host defense and disease pathology. **Arch. Biochem. Biophys.**, 445 (2), 256-260, 15-1-2006.
197. Winterbourn, C. C., Hawkins, R. E., Brian, M., and Carrell, R. W. Estimation of Red-Cell Superoxide-Dismutase Activity. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 85 (2), 337-341, 1975.
198. Witaicenis, A., Seito, L. N., and Di Stasi, L. C. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Chem. Biol. Interact.**, 186 (2), 211-218, 30-7-2010.
199. Wu, X., Gu, L., Prior, R. L., and McKay, S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. **J. Agric. Food Chem.**, 52 (26), 7846-7856, 29-12-2004.
200. Xu, B. and Chang, S. K. Isoflavones, Flavan-3-ols, phenolic acids, total phenolic profiles, and antioxidant capacities of soy milk as affected by ultrahigh-temperature and traditional processing methods. **J. Agric. Food Chem.**, 57 (11), 4706-4717, 10-6-2009.
201. Yao, N., Lan, F., He, R. R., Kurihara, H. Protective effects of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract against endotoxin-induced uveitis in mice. **J. Agric. Food Chem.**, 58(8), 4731-4736, 2010.
202. Yavuz, Y., Yuksel, M., Yegen, B. C., and Alican, I. The effect of antioxidant therapy on colonic inflammation in the rat. **Research in Experimental Medicine**, 199 (2), 101-110, 1999.
203. Yoshikawa, T., Naito, Y., Kishi, A., Tomii, T., Kaneko, T., Inuma, S., Ichikawa, H., Yasuda, M., Takahashi, S., and Kondo, M. Role of Active Oxygen, Lipid-

- Peroxidation, and Antioxidants in the Pathogenesis of Gastric-Mucosal Injury-Induced by Indomethacin in Rats. **Gut**, 34 (6), 732-737, 1993.
204. Yoshitama, K. Caffeic Acid 4-Beta-Glucoside As the Acyl Moiety of the Senecio-Cruentus Anthocyanin. *Phytochemistry*, 20 (1), 186-187, 1981.
205. Youdim, K. A., Martin, A., and Joseph, J. A. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, 29 (1), 51-60, 1-7-2000.
206. Zenewicz, L. A., Antov, A., and Flavell, R. A. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. **Trends Mol. Med.**, 15 (5), 199-207, 2009.
207. Zhang, Z. F., Fan, S. H., Zheng, Y. L., Lu, J., Wu, D. M., Shan, Q., Hu, B. Purple sweet potato color attenuates oxidative stress and inflammatory response induced by d-galactose in mouse liver. **Food. Chem. Toxicol.** 47(2), 496-501, 2009.
208. Zhou, Y. H., Yu, J. P., Liu, Y. F., Teng, X. J., Ming, M., Lv, P., An, P., Liu, S. Q., and Yu, H. G. Effects of Ginkgo biloba extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF-alpha, NF-kappaBp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. **Mediators. Inflamm.**, 2006 (5), 92642-2006.
209. Zhou, Y., Wang, H., Liang, L., Zhao, W. C., Chen, Y., and Deng, H. Z. Total alkaloids of Sophora alopecuroides increases the expression of CD4+ CD25+ Tregs and IL-10 in rats with experimental colitis. **Am. J. Chin Med.**, 38 (2), 265-277, 2010.
210. Zijlstra, F. J., Srivastava, E. D., Rhodes, M., Vandijk, A. P. M., Fogg, F., Samson, H. J., Copeman, M., Russell, M. A. H., Feyerabend, C., Williams, G. T., Pullan, R. D., Thomas, G. A. O., Vanblanckenstein, M., Wilson, J. H. P., Allen, A., and Rhodes, J. Effect of Nicotine on Rectal Mucus and Mucosal Eicosanoids. **Gut**, 35 (2), 247-251, 1994.

211. Zuanazzi JAS, Montanha JA 2007. Flavonóides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, p.577-614.