

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



VINÍCIUS CAMARGO PENTEADO

**"ANÁLISE DA AÇÃO DA MISTURA DE FIBRAS VEGETAIS  
SOBRE A MUCOSA INTESTINAL DE ANIMAIS SUBMETIDOS  
AO MODELO DE COLITE"**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
VINÍCIUS CAMARGO PENTEADO  
Albenteno  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

**Orientadora: Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Elisângela Farias Silva**

**Campinas, 2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**P387a**

Penteado, Vinicius Camargo

Análise da ação da mistura de fibras vegetais sobre a mucosa intestinal de animais submetidos ao modelo de colite / Vinicius Camargo Penteado. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Alba Regina Monteiro Souza Brito, Elisangela Farias Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fibras. 2. Colite. 3. Inflamação. I. Brito, Alba Regina Monteiro Souza. II. Silva, Elisangela Farias. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Analysis of vegetables fibers mixture action on the animals intestinal mucosa under colitis model.

**Palavras-chave em inglês:** Fibers; Colitis; Inflammation.

**Área de concentração:** Fisiologia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Alba Regina Monteiro Souza Brito, Clélia Akiko Hiruma-Lima, Tomomasa Yano.

**Data da defesa:** 20/02/2009.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 20 de fevereiro de 2009

**BANCA EXAMINADORA**

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

  
Assinatura

Prof. Dr. Tomomasa Yano

  
Assinatura

Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima

  
Assinatura

Profa. Dra. Francesco Langone

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Wagner Vilegas

\_\_\_\_\_  
Assinatura



Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

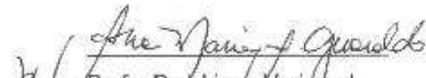
Certificamos que o Protocolo nº 767-1, sobre "DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA (Scfa'S) PROVENIENTES DA FERMENTAÇÃO DE FIBRAS POR BACTÉRIAS ANAERÓBICAS FACULTATIVAS – PARTE FARMACOLÓGICA" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Alba Regina M. Souza Brito / Vinicius Camargo Penteado 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)-IB-UNICAMP em reunião de 17 de fevereiro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 767-1, entitled "DEVELOPMENT OF ANALITICAL METODOLOGY FOR DETERMINATION OF SHORT CHAIN FATTY ACIDS (SCFA'S) OROGINATED FROM FERMENTATION OF FIBERS BY FACULTATIVE ANAEROBIAL BACTERIES – FARMACOLOGY PART", 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 February 17, 2005.

Campinas, 09 de fevereiro de 2009.

2ª. VIA

  
Prof. Dra. Liana Verinaud  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

  
Fátima Alenso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

## Dedicatória

Dedico este trabalho as seguintes pessoas: Ana Cristina Almeida, Anderson Luiz Ferreira, Érika Suzuki, Maíra Cola Miranda e Victor Barbastefano, que me ajudaram nos momentos mais importantes, muito obrigado!

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Alba, por quem eu nutro um carinho especial, que acreditou mais em mim do que eu mesmo, minha madrinha de casamento, uma pessoa que sempre estará nos meus melhores pensamentos;

À Unicamp, instituição onde eu passei momentos muito felizes da minha vida, que me proporcionou um aprendizado incrível;

À Profa. Clélia Akiko Hiruma Lima por aceitar o convite para minha banca e colocar a sua competência na minha história;

Ao Prof. Tomomasa Yano, por estar presente tanto na minha qualificação quanto na minha banca, e por estar presente desde o início do trabalho;

Ao Prof. Francesco Langone, por sua colaboração e boas idéias e ao Prof. Marcos Salvador, por suas sugestões importantes no exame de qualificação;

À Cibele e ao Cinza, que estiveram presentes em momentos importantes, me ajudando de diversas maneiras e me fazendo companhia;

À Cris, Adriana, Patrícia, Priscila, Fabiana, Ricardo, Felipe, Débora, Demétrio, enfim a todos do laboratório de Produtos Naturais, que sempre estiveram dispostos a me ajudar, sem demagogia;

Aos Professores Paulo Mazzafera, Jorge Tamashiro, Wagner Vilegas, Helena Coutinho, Paulo Joazeiro, Gonçalo Amarante, Maria Cristina Marcondes e tantos outros que desempenharam papel importante na minha formação e no desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus amigos, que sempre acreditaram que este trabalho iria se concretizar;

À minha família, minha mãe, meu pai, meu irmão, meus tios, primos e avós que gostam muito de mim e que recebem em troca o mesmo sentimento, todos me ajudaram a ser o que sou hoje;

À Marilene, minha mulher, com quem compartilho um amor duradouro que me faz ser mais feliz e me torna um homem melhor.

## ÍNDICE

1	Introdução	1
1.1	Doenças Inflamatórias Intestinais (DII)	1
1.2	Epidemiologia	2
1.3	Fatores Genéticos	4
1.4	Fatores Ambientais	5
1.5	Terapêutica Fase Experimental E Perspectivas	13
1.6	Fibras Alimentares	16
1.7	Espécies Estudadas	21
2	Objetivos	23
2.1	Geral	23
2.2	Específicos	23
3	Materiais E Métodos	24
3.1	Fibras	24
3.2	Teste <i>In Vitro</i>	24
3.3	HPLC/ Quantificação Dos Ácidos Graxos De Cadeia Curta	26
3.4	Animais	26
3.5	Inflamação Intestinal Induzida Por TNBS	28
3.6	Drogas Utilizadas	29
3.7	Detecção Da Lesão Do Cólon	30
3.8	Avaliação Da Atividade Antioxidante	31
3.8.1	Dosagem De Proteínas Totais	31
3.8.2	Quantificação Dos Grupamentos Sulfidril (GSH)	31
3.8.3	Atividade Da Glutaciona Peroxidase (GPx)	31
3.8.4	Atividade Da Glutaciona Redutase (GR)	32
3.8.5	Determinação Do Índice De Peroxidação Lipídica (LPO)	32
3.8.6	Atividade Da Mieloperoxidase (MPO)	33
3.9	Análise Estatística	33
4	Resultados	34
4.1	Teste <i>In Vitro</i>	34
4.2	Inflamação Intestinal Induzida Por TNBS	35
4.3	Grupamentos Sulfidril (GSH)	37
4.4	Atividade Da Glutaciona Peroxidase (GPx)	38
4.5	Atividade Da Glutaciona Redutase (GR)	39
4.6	Determinação Do Índice De Peroxidação Lipídica (LPO)	40
4.7	Atividade Da Mieloperoxidase (MPO)	41
5	Discussão	42
6	Conclusões	51
7	Perspectivas	52
8	Referências Bibliográficas	53

## RESUMO

A alimentação inadequada contribui para muitas das causas de morte. Mais de 70% dos tipos de câncer podem ser a ela atribuídos. Neste contexto, surge a importância dos nutracêuticos e sua utilidade na prevenção e tratamento de algumas doenças e o interesse, tanto das indústrias farmacêuticas quanto alimentícias para esta categoria de produto, é crescente. O grupo de pesquisa em produtos naturais do IB-UNICAMP pretende desenvolver um nutracêutico útil na prevenção e tratamento de colites inflamatórias. Sabe-se que substâncias antioxidantes, entre outras presentes nas fibras alimentares, podem estar envolvidas na prevenção e tratamento de doenças intestinais, porque os produtos de sua fermentação, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), são substratos para a reparação do tecido inflamado, inibindo fatores pró-inflamatórios. Quantificar estes ácidos é, portanto, imprescindível dado que quanto maior for sua produção, maior será a eficiência da dieta para a recuperação do tecido. Para tanto, foi realizada uma análise *in vitro* que demonstrou qual das associações de banana e laranja era a que produzia maiores quantidades de butirato, o dado foi obtido através da leitura por HPLC. Depois, *in vivo*, através de um grupo controle (salina), grupo não tratado (indução de úlcera na ausência da administração da mistura de fibras) e do grupo tratado (indução de úlcera com administração da mistura de fibras) realizou-se a indução de colite por TNBS e, após a obtenção das amostras cólicas dos diferentes grupos, realizou-se a análise da atividade anti-oxidante (GSH, GPx, GR, MPO e LPO). O grupo não tratado não apresentou diferenças

significativas na comparação com o tratado, o que leva a conclusão de que a mistura de laranja e banana escolhida, nas condições de ulceração por TNBS da metodologia aplicada não é eficiente na prevenção dos danos causados.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	ácidos graxos de cadeia curta
AINE	antiinflamatórios não esteroidais
COX	ciclooxigenase
CRF	fator liberador de corticotrofina
DC	doença de Crohn
DII	doenças inflamatórias intestinais
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FA	fibras alimentares
GPx	glutathiona peroxidase
GR	glutathiona redutase
GSH	glutathiona
IBD	inflammatory bowel disease
IFN- $\gamma$	interferon gama
IL	interleucina
LPO	Peroxidação Lipídica
MPO	mieloperoxidase
NF $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
NOD	intracellular nucleotide oligomerization domain
OCTN	transportador de cátions orgânicos
RCUI	retocolite ulcerativa inespecífica
SP	substância P
TGI	trato gastrointestinal
TLR	toll-like receptor
TNBS	ácido 2, 4, 6-trinitrobenzeno sulfônico
TNF- $\alpha$	fator alfa de necrose tumoral

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 Doenças Inflamatórias Intestinais (DII)**

Retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) e Doença de Crohn (DC) representam os dois principais tipos de doença inflamatória intestinal (DII) (Baumgart e Carding, 2007). A RCUI é uma doença inflamatória não-transmural, restrita ao cólon. Dependendo da extensão anatômica afetada, os pacientes podem ser classificados como tendo proctite ou pancolite. Já a DC é uma doença inflamatória transmural da mucosa gastrointestinal que pode afetar o trato gastrointestinal (TGI) inteiro. Manifestações típicas incluem envolvimento descontínuo de várias porções do TGI e o desenvolvimento de complicações incluindo estreitamento, abscessos ou fístulas (Baumgart e Sandborn, 2007).

Novas evidências experimentais sugerem interação direta do sistema nervoso com o sistema imune (Baumgart e Carding, 2007). Eventos adversos, estresse crônico e depressão parecem aumentar a probabilidade de recidiva em pacientes com a doença (Mawdsley e Rampton, 2005). Estresse psicológico foi relacionado ao aumento da atividade da DII. O tabagismo está associado com menor frequência na exacerbação da RCUI. Em contraste, na DC, o tabagismo agrava o curso da doença promovendo formação de fístula e estreitamento do intestino (Cosnes, 2004). Os dados para fumantes passivos são contraditórios: alguns trabalhos mostram redução no risco de RCUI enquanto outros demonstram que a exposição aumenta os riscos, tanto de RCUI quanto de DC (Baumgart e Carding, 2007).

A etiologia das DII ainda não foi claramente elucidada, mas sugere-se que seja devido a uma complexa relação entre fatores genéticos, ambientais, microbianos e imunes (Podolsky, 2002). Mais especificamente, as DII são uma resposta exacerbada do sistema imune da mucosa do intestino frente aos antígenos luminais, num hospedeiro geneticamente suscetível (Laroux *et al.*, 2001).

Entre as descobertas associadas às DII estão: o aumento de certos mediadores inflamatórios, sinais de estresse oxidativo, desarranjo do ambiente cólico, decréscimo da oxidação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e aumento da permeabilidade intestinal (Head e Jurenka, 2003).

## **1.2 Epidemiologia**

Na Europa e nos Estados Unidos são 2,2 milhões de pessoas que sofrem de DC e 1,4 milhões que sofrem de RCUI, apesar da incidência começar a estabilizar (Loftus *et al.*, 2004).

Em geral, as taxas mais altas de incidência e prevalência, tanto para DC quanto para RCUI, são descritos no norte da Europa, Reino Unido e América do Norte. Entretanto, existe uma incidência e prevalência crescentes em outras áreas como o sul e centro da Europa, Ásia, África e América Latina, indicando que as DII têm um processo dinâmico (Loftus *et al.*, 2004).

No Brasil, os dados epidemiológicos são escassos. Souza *et al.* (2002) estudaram a evolução da ocorrência das DII num hospital universitário do

sudeste do Brasil. A conclusão é de que há um aumento na freqüência das DII nesse hospital, com tendência da DC ser mais prevalente que a RCUI. As características demográficas, clínicas e evolutivas dos pacientes foram, de modo geral, semelhantes às já descritas. Além disso, confirmou-se que manifestações sistêmicas e a ocorrência de pancolite associaram-se à maior gravidade da RCUI, enquanto que idades inferiores a 50 anos e o tabagismo associaram-se à taxas mais altas de complicações da DC.

A freqüência e o tipo da doença são influenciados por uma série de fatores demográficos, como o gênero, a idade e a etnia.

Parece existir uma leve diferença entre os gêneros na incidência das DII. Em geral, encontra-se certo predomínio de DC nas mulheres, ainda que nas áreas de baixa incidência seja mais freqüente nos homens. Este predomínio, especialmente em mulheres no final da adolescência e início da idade adulta, sugere que os fatores hormonais podem desempenhar um papel importante na doença. Por outro lado, se existe algum tipo de influência do sexo na RCUI, parece afetar o homem (Loftus *et al.*, 2000).

Classicamente, na incidência das DII a idade tem uma distribuição bimodal. Há um primeiro pico de incidência entre a segunda e terceira décadas, seguido de um segundo pico menor das décadas posteriores (Bjornsson e Johannsson, 2000).

### 1.3 Fatores Genéticos

A contribuição genética nas DII é evidente; parentes de primeiro grau de indivíduos com DII possuem de 25-50 vezes e de 10-20 vezes mais probabilidade de desenvolver DC e RCUI, respectivamente, comparados à população em geral (Zheng *et al.*, 2003).

Pesquisadores identificaram ao menos 7 loci (*inflammatory bowel disease* 1-7, IBD 1-7) em cromossomos que se relacionam com genes de susceptibilidade, centrando-se nas mutações dos genes NOD2/CARD15 (*intracellular nucleotide oligomerization domain 2/caspase recruitment domain* 15), de MHC II (complexo principal de histocompatibilidade da classe II), de citocinas, de receptores de citocinas e de moléculas de adesão (Duerr, 2003; Sartor, 2003; Zheng *et al.*, 2003). Alguns loci têm mostrado ser específicos para RCUI, como o IBD 2 (Bonen e Cho, 2003) ou para DC, como o IBD 1 (Cho, 2001; Cho, 2003), enquanto que outros conferem uma susceptibilidade comum a ambas.

Recentemente, novos genes associados à DC foram identificados. O primeiro deles encontra-se no cromossomo 5 e codifica o transportador de cátions orgânicos (OCTN) onde suas mutações afetam a capacidade dos transportadores para bombear xenobióticos e aminoácidos através das membranas celulares (Peltekova *et al.*, 2004). No cromossomo 10 encontra-se o segundo gene que faz parte da família da guanilato quinase, cuja mutação dificulta a manutenção da polaridade na célula epitelial (Stoll *et al.*, 2004). Ambos os genes podem ser importantes na permeabilidade epitelial; uma falha

na sua função poderia provocar uma exposição inapropriada do sistema imunitário da mucosa a produtos bacterianos (Peran, 2007).

#### **1.4 Fatores Ambientais**

A influência de fatores ambientais no desenvolvimento das DII tornou-se evidente devido ao grande aumento das incidências tanto de DC quanto de RCUI durante a segunda metade do século XX, como consequência de profundas mudanças no estilo de vida nos países desenvolvidos. Esse fato ficou mais evidente nos países em desenvolvimento que adotaram hábitos ocidentais. De acordo com a chamada “hipótese da higiene” (Wills-Karp *et al.*, 2001), tem ocorrido uma mudança do estilo de vida “sujo” (alta exposição a microorganismos) para um estilo de vida “limpo” (baixa exposição a estes agentes). Mudanças ambientais tais como melhoria no modo de vida e na alimentação, alimentos e água mais seguros, melhoria na higiene e na saúde, e a ampla utilização de antibióticos têm levado a uma diminuição progressiva das doenças infecciosas; no entanto, paralelamente, têm levado ao aumento de doenças alérgicas e autoimunes, incluindo a DC e a RCUI, como resultado de um desenvolvimento reduzido do sistema imunitário nos primeiros anos de vida (Bach, 2002).

A variação na incidência das DII nas populações de mesma etnia mas que habitam lugares distintos, juntamente com a desarmonia existente entre gêmeos monozigóticos, reforça a importância dos fatores ambientais na patogenia da DII crônica. Estes últimos, por sua vez, são numerosos e já são

reconhecidos como de risco para as DII. Tabagismo, estresse, microorganismos, tipo de alimentação, além dos fármacos tem sido os mais citados (Danese *et al.*, 2004).

#### **1.4.1 Tabagismo**

O melhor exemplo de influência do ambiente nas DII é o tabagismo. O tabaco apresenta um efeito inverso na DC e na RCUI, sustentando a idéia de os mecanismos em cada forma de DII que são distintos (Thomas *et al.*, 1998). O fumo é um fator de risco importante para a DC, aumentando a freqüência de recidivas e a necessidade de cirurgia; a interrupção do tabagismo melhora os sintomas da doença (Rubin e Hanauer, 2000). Ao contrário, o abandono do cigarro, em pacientes portadores de RCUI, aumenta o risco de incidência da doença; isto sugere um papel protetor do tabaco na doença (Bridger *et al.*, 2002).

Os mecanismos de ação do tabaco na DC e na RCUI ainda não estão claros, apesar de ter sido comprovado que o cigarro afeta tanto a imunidade sistêmica, quanto a da mucosa intestinal, alterando numerosas funções imunológicas inatas e adaptativas (Sopori, 2002). Dentre as alterações importantes destacam-se modificação da relação entre células T *helper* e T supressoras, redução da proliferação das células T, modulação da apoptose e diminuição significativa dos níveis de imunoglobulinas no soro e mucosas. Além disso, verificou-se que o cigarro aumenta a produção cólica de muco (Cope *et al.*, 1986) e altera o fluxo sanguíneo (Srivastava *et al.*, 1990); por conter nicotina, como ela, o cigarro produz redução da motilidade cólica (Coulie *et al.*, 2001).

Sabe-se que o tabaco inalado possui aproximadamente 4000 compostos; qualquer um deles pode ser responsável pela gênese ou manutenção da doença, apesar da nicotina ser, provavelmente, o agente ativo mais importante. Nesse aspecto, a nicotina transdérmica mostra um efeito benéfico em pacientes com RCUI (Guslandi e Tittobello, 1996; Pullan *et al.*, 1994). Em modelos experimentais distintos de colite, a administração de nicotina melhora o processo inflamatório, coincidindo com a diminuição local das concentrações de várias citocinas pró-inflamatórias (Agrawal e Rhodes, 2003).

#### **1.4.2 Estresse**

Na década de 50, as DII eram consideradas doenças psicossomáticas (Engel *et al.*, 1969); no entanto, hoje já se sabe que estresse crônico e depressão podem causar a recidiva dessas doenças. Assim como em humanos, alguns animais podem desenvolver DII em condições de estresse crônico. Os “*cotton-top tamarins*”, primatas que vivem na América do Sul, podem desenvolver colite quando submetidos a estresse crônico por estar no cativeiro. A remissão é induzida retornando ao habitat natural (Wood *et al.*, 2000).

De acordo com Élson (2002), o estresse experimental em animais aumenta a permeabilidade intestinal da mucosa e altera as interações bactéria-hospedeiro. Essas mudanças parecem contribuir para a inflamação da mucosa intestinal, além de corroborar a hipótese de que a inflamação é coordenada pela flora da mucosa. O estresse pode ativar o Sistema Nervoso Entérico, que liberará neurotransmissores como o fator liberador de corticotrofina (CRF) e substância P (SP). Estes, por sua vez, liberam mediadores de mastócitos

(histamina e interleucina-8) e levam ao aumento da aderência bacteriana, o que pode sensibilizar as células T; a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) pode desencadear a inflamação (Mawdsley e Rampton 2005). O CRF e a SP podem, ainda, agravar os sintomas das DII através do aumento da motilidade cólica, secreção de água, íons e muco. A SP é capaz de afetar linfócitos, macrófagos, neutrófilos e outras células inflamatórias (Mayer, 2000).

Mittermaier *et al.* (2004) relataram também que pacientes com remissão das DII tinham grandes chances de ter recidivas nos 18 meses seguintes devido à depressão.

### **1.4.3 Agentes microbianos**

Durante muito tempo se procurou estabelecer uma relação entre um agente infeccioso específico e DII, mas sem resultados satisfatórios. Atualmente, a flora intestinal comensal recebe sua devida importância no desenvolvimento dessas doenças. Os agentes infecciosos específicos, do tipo microbiano, sugeridos como sendo responsáveis pela DC e RCUI são muitos: *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia tracomatis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium paratuberculosis*; entretanto, o papel etiológico desta última bactéria na DC tem controvérsias, já que essa bactéria é o agente causador da Doença de Johne, uma ileíte granulomatosa crônica em ruminantes que se assemelha à DC (Chiodini *et al.*, 1984).

Antes do nascimento, o TGI do bebê é estéril, mas durante o trabalho de parto ocorre a primeira exposição microbiana através da flora fecal e vaginal da

mãe. Nos meses subseqüentes ao nascimento estabelece-se uma flora comensal estável (Fanaro *et al.*, 2003).

A microflora intestinal cria uma relação simbiótica com as células epiteliais da mucosa. No intestino, as bactérias beneficiam-se do fluxo constante de nutrientes e da temperatura estável. Do mesmo modo, o hospedeiro beneficia-se das bactérias pela capacidade de sintetizar vitamina K, obter energia dos nutrientes não absorvidos, sob a forma de AGCC, inibir o crescimento de patógenos e manter a integridade e a homeostase imunológica da mucosa. Estudos em animais SPF revelam que a ausência da microflora intestinal provoca alterações significativas na estrutura e função intestinal, como redução dos vilos e da densidade das placas de Peyer, criptas pouco profundas (Maeda *et al.*, 2001) e uma estimulação da migração de complexos motores (Husebye *et al.*, 2001).

Em sua convivência com as bactérias, os vertebrados desenvolveram receptores de reconhecimento de indicadores específicos de bactérias, fungos e vírus que não se encontram nos eucariotos. Esses indicadores podem ser o lipopolissacarídeo, o peptidoglicano ou as flagelinas. Dentre os receptores estão os *toll-like receptor* (TLR) e os *nuclear oligomerization domain* (NOD) que são imprescindíveis para o início da resposta inflamatória inata; ativação desses receptores gera uma cascata de sinalização que leva à produção de citocinas pró-inflamatórias. As cascatas de sinalização de TRL proporcionam uma união entre a resposta inflamatória inata e adaptativa, já que a primeira leva à maturação de células dendríticas, as quais ativam a resposta imunológica

adaptativa (Medzhitov, 2001). Apesar da estimulação desses eventos levar à produção das citocinas pró-inflamatórias, tais eventos são essenciais na adaptação das bactérias intestinais e na manutenção da homeostase do hospedeiro (Sansoneetti, 2004). Uma das principais características da flora comensal é que ela não atravessa a barreira epitelial; se, por acaso, alguma bactéria atravessá-la, será rapidamente fagocitada através da resposta imunológica inata (Macpherson *et al.*, 2000).

Atualmente, sabe-se que as bactérias intestinais influem tanto no início quanto na perpetuação das DII. A teoria aceita, até o momento, é de que o desenvolvimento das DII envolve uma resposta imunitária exacerbada pela microflora comensal em indivíduos geneticamente susceptíveis (Bamias *et al.*, 2005). Essa hipótese é sustentada por observações distintas: a área de inflamação é maior onde há maior densidade de bactérias intestinais; o uso de antibióticos melhora a inflamação crônica; a cirurgia que desvia o fluxo fecal pode prevenir a recidiva da DC. Além disso, observa-se que nas DII há presença de bactérias aderentes com capacidade de penetrar na mucosa, como *Bacteróides* sp, *Escherichia coli* e *Enterobacterium* (Swidsinski *et al.*, 2002; Seksik *et al.*, 2003).

#### 1.4.4 Fármacos

Os contraceptivos orais e os antiinflamatórios não esteroidais (AINE) são os dois principais grupos de fármacos que têm sido estudados por sua possível relação uso-desenvolvimento da doença.

Mulheres que utilizam contraceptivos orais apresentam pior evolução clínica nas DII. Considerando o estado de hipercoagulação presente na DII ativa, o uso concomitante de contraceptivos orais pode aumentar o risco de ocorrência de processos tromboembólicos, ainda que faltem dados relacionando esses fatores (Alstead, 1999). Entretanto, outros mecanismos imunomoduladores não se podem descartados como aqueles relacionados ao fator de transcrição NF $\kappa$ B (Evans *et al.*, 2001). Os contraceptivos orais de baixa dosagem parecem não afetar, significativamente, a atividade clínica da enfermidade, pelo menos na DC (Alstead, 1999).

Os AINE estão entre os medicamentos mais prescritos devido às propriedades antiinflamatória e analgésica. Entretanto, seu uso está associado ao alto risco de lesões na mucosa gastrointestinal e complicações associadas (Wolfe *et al.*, 1999). A descoberta de que a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) é a isoforma primária no sítio de inflamação, levou à hipótese de que a inibição dessa isoforma poderia ser a base terapêutica dos AINE como agentes antiinflamatórios (Jackson e Hawkey, 2000).

Evidências indicam que a idéia da enzima ciclooxigenase 1 (COX-1) ser constitutiva e a COX-2 ser induzida é simplista. Na realidade, ambas as COX 's são constitutivas e também induzíveis na inflamação e na citoproteção (Halter *et*

*al.*, 2001). Dois estudos usando ratos mostram que, apesar dos inibidores seletivos de COX-1 ou COX-2 não serem ulcerogênicos, a inibição combinada da COX-1 e da COX-2 induz graves lesões no estômago e no intestino delgado, sugerindo uma importante contribuição da COX-2 na manutenção da integridade da mucosa intestinal (Wallace *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2002). Além disso, inibidores da COX parecem ser lesivos durante a cicatrização da úlcera (Halter *et al.*, 2001); a indometacina e o diclofenaco atrasam a cicatrização da úlcera, tanto na experimentação animal quanto em humanos (Schmassman, 1998).

Os impactos da inibição da COX-2 em modelos animais são controversos (Cipolla *et al.*, 2002). Sabendo do papel central dos eicosanóides na manutenção do processo inflamatório, Karmeli *et al.* (2000) demonstraram que inibidores da COX-2 têm efeito benéfico na colite experimental em ratos, agindo na redução da formação de eicosanóides no cólon. Em contraste, Reuter *et al.* (1996) demonstraram que a inibição do COX-2 pode resultar na exacerbação da inflamação do cólon, concordando com o efeito lesivo dos AINE na úlcera gástrica.

## **1.5 Terapêutica Experimental E Perspectivas**

### **1.5.1 Citocinas e Anticitocinas**

Citocina é um termo genérico e abrangente que se refere, em geral, a mediadores protéicos ou peptídicos liberados por células do sistema imune. Foram identificadas mais de 100 citocinas; a superfamília das citocinas inclui as interleucinas, as quimiocinas, os interferons, os fatores de estimulação de colônias, os fatores de crescimento e de necrose tumorais (Rang *et al.*, 2004). Além das ações diretas sobre as células, algumas citocinas induzem a formação de outras citocinas (o que se constitui numa cascata de amplificação), enquanto outras ativam receptores de outras citocinas; outras apresentam ainda interações sinérgicas ou antagônicas com outras citocinas. As citocinas foram comparadas a uma complexa linguagem de sinalização, sendo a resposta final de uma célula particular determinada por certo número de mensagens diferentes recebidas, de modo concomitante, na superfície da célula (Rang *et al.*, 2004).

As citocinas da fase efetora incluem peptídeos pró-inflamatórios e antiinflamatórios. Citocinas pró-inflamatórias participam de reações inflamatórias agudas e crônicas, bem como nos processos de reparo. As citocinas pró-inflamatórias primárias incluem o TNF- $\alpha$  e a interleucina 1 (IL-1); são liberadas por macrófagos e por outras células podendo desencadear uma cascata de citocinas secundárias, dentre as quais destacam-se as quimiocinas.

Vários fatores de crescimento são importantes no processo de reparo e estão implicados na inflamação crônica. As citocinas antiinflamatórias, por sua vez, inibem aspectos da reação inflamatória, incluindo TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10 e IL-13.

Essas citocinas podem inibir a produção de quimiocinas; as últimas três têm a capacidade de inibir respostas mediadas por células Th1, isto é, as células cuja ativação inapropriada está envolvida em diversas doenças (Rang *et al.*, 2004).

Segundo Biondo-Simões *et al.* (2003), de modo geral, há quatro meios principais para reduzir o efeito de uma citocina:

1) bloqueio de sua produção → drogas como a ciclosporina e tacrolimos interferem na transcrição do gene da IL-2;

2) inibição do processo intracelular que produz a proteína ativa → peptídeos metilcetonas, que inibem a enzima de conversão da IL-1 $\beta$ /ácido hidroxâmico, atuam inibindo a liberação proteolítica de TNF $\alpha$  ligado à célula;

3) neutralização da citocina na circulação → anticorpos e receptores solúveis atuam dessa forma; e

4) bloqueio de receptor → anticorpos e receptores antagônicos também atuam assim.

As citocinas e outras substâncias mais utilizadas terapeuticamente são: proteína antagonista do receptor da Interleucina-1 (IL-1ra) (Henderson, 1997), IL-10 (Steidler *et al.* 2000; Rogler e Andus, 2004), IL-11 (Greenwood-Van *et al.*, 2000), talidomida (Bauditz *et al.*, 2000) e IL-18 (Sivakumar *et al.*, 2002).

### **1.5.2 Antioxidantes**

Um estudo realizado por Reimund *et al.* (1998) em humanos analisou a influência de três antioxidantes (hidroxianisol butirato, tetrahidropapaverolina e ácido nordihidroguaiarético) na inibição de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8; o efeito

inibidor de citocinas pelos antioxidantes mostrou-se mais pronunciado na RCUI que na DC.

A atividade farmacológica antioxidante é relevante considerando-se que o oxigênio é essencial para a vida, mas também pode causar danos celulares graves. Isto é conhecido como “paradoxo do oxigênio”. A redução do oxigênio nos tecidos biológicos produz um elevado número de radicais livres, muito reativos, conhecidos como Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). As ERO são resultantes de um metabolismo incompleto do oxigênio molecular ( $O_2$ ), gerando ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxil ( $OH^\bullet$ ), por possuírem um elétron não pareado na última camada de valência. Por serem extremamente reativas as ERO atacam moléculas biológicas levando a danos celulares como peroxidação lipídica, degradação de proteínas, quebra do DNA e até morte celular. Para controle do processo de ataque oxidativo o organismo possui sistemas de defesa como as enzimas superóxido dismutase, peroxidases e catalase (Thomas, 2000).

Outra fonte de radicais livres é o processo inflamatório. Quando ocorre uma agressão a um determinado tecido, há produção de agentes quimiotáticos como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, produtos bacterianos e virais. Esses agentes quimiotáticos atraem células fagocitárias que reduzem  $O_2$  a  $O_2^-$ , no processo inflamatório, por ação da NADPH oxidase; o objetivo é a destruição dos agentes invasores (Conner e Grishan, 1996).

Experimentalmente, há processos inflamatórios típicos que ocorrem no TGI que são geradores de radicais livres (como o ânion superóxido, o peróxido

de hidrogênio e o radical hidroxil). Bons exemplos são as colites experimentais, ulcerações intestinais em geral e danos à mucosa gástrica em modelos de úlcera experimental como aqueles induzidos por estresse, etanol, AINE e isquemia-reperfusão. Isto foi comprovado através da administração de superóxido dismutase, catalase, vitamina C ou outros antioxidantes, causando uma diminuição no Índice de Lesão Ulcerativa (Das e Banerjee, 1993).

### **1.5.3 Fibras**

Estudos mais recentes têm utilizado suplementação de fibras alimentares e polissacarídeos não-digeríveis, no tratamento e controle das DII como alternativas terapêuticas (Hallert *et al.*, 2003). Essas substâncias apresentam propriedades e efeitos fisiológicos importantes no TGI, como produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) necessários à manutenção da função normal dos colonócitos (Galvez *et al.*, 2005)

## **1.6 Fibras Alimentares**

Fibras alimentares (FA) são substâncias vegetais que resistem à hidrólise pelas enzimas digestivas do intestino. É um grupo muito complexo de substâncias que incluem polissacarídeos não amiláceos, amido resistente (que não é digerido no intestino delgado), celulose e hemicelulose, oligossacarídeos, pectinas, ligninas, gomas e ceras (James *et al.*, 2003). São indigeríveis no intestino delgado e finalmente alcançam o cólon, onde são utilizadas pela microflora do intestino como substrato para fermentação (Mortensen e Clausen, 1996; Velázquez *et al.*, 1997).

O grau de fermentação das FA no intestino grosso varia enormemente. Por exemplo: pectinas, mucilagens e gomas parecem ser completamente fermentadas, enquanto que a celulose o é apenas parcialmente. A fermentação é o processo pelo qual a molécula sofre ação das enzimas bacterianas, sendo parcial ou completamente degradada no intestino grosso, em condições anaeróbicas. A ação bacteriana é mais intensa no intestino grosso, que possui cerca de  $10^{11}$  microorganismos por grama de bolo fecal. De acordo com Campbell *et al.* (1997), esses microorganismos contribuem para a formação de gases ( $H_2$ ,  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$  e  $NH_3$ ), ácidos (lático, acético) e AGCC, principalmente acetato, propionato e butirato. Dentre os AGCC, o butirato é a principal fonte de energia dos colonócitos, diferentemente de outras células que utilizam sempre ATP (Ahmad *et al.*, 2000). Desta forma, quanto maior a disponibilidade destes ácidos graxos melhor seria a integridade da mucosa do cólon e, com isso, poder-se-ia contribuir para a redução da inflamação oriunda das DII (Kanauchi *et al.*, 1998).

Os AGCC são formados da seguinte maneira: hexoses são clivadas a piruvato, que é reduzido, dando origem a propionato ou sendo convertido a acetil-CoA, num processo que gera NADH. A acetil-CoA pode, então, ser reduzida formando butirato ou hidrolizada originando acetato. O acetato é quantitativamente o mais importante produto endógeno da fermentação de polissacarídeos. Apesar de todos os polissacarídeos produzirem acetato como principal produto endógeno, há diferenças na razão propionato/butirato, *in vitro*.

As FA possuem ainda propriedade de se ligar com a água, aumentando o volume e a viscosidade do conteúdo intestinal, sendo responsáveis pelo aumento do volume das fezes, melhora da motilidade intestinal e diminuição do tempo de trânsito (Mortensen e Clausen, 1996; Velázquez *et al.*, 1997). Essa propriedade é relevante e advém da presença de açúcares com grupamentos polares livres que se ligam facilmente à água. Juntas, pectinas, mucilagens e, em menor extensão, hemiceluloses, apresentam grande capacidade de retenção hídrica. A hidratação destas moléculas resulta na formação de uma matriz do tipo gel, que pode levar a uma maior viscosidade do conteúdo do intestino delgado e apresentar, então, efeitos críticos na absorção de nutrientes. Presumivelmente, esta absorção é retardada pela difusão dos nutrientes hidrossolúveis na matriz gelatinosa e pelo aumento da viscosidade do conteúdo intestinal (Eastwood e Morris, 1992).

Ácidos biliares, colesterol e alguns compostos tóxicos são adsorvidos, especialmente, pelas pectinas e outros polissacarídeos ácidos. A adsorção de ácidos biliares por polissacarídeos pode ser medida *in vivo* através da excreção fecal desses ácidos e de esteróides neutros. Essa característica está associada ao efeito hipocolesterolemizante de certos polissacarídeos não-celulósicos, como pectinas e goma guar. A capacidade desses polissacarídeos em captar/adsorver potenciais agentes carcinogênicos tem sido proposta como um dos mecanismos protetores contra câncer de cólon e reto (Eastwood e Morris, 1992).

O uso das FA como tratamento e estratégia preventiva nas DII é bastante atrativo por inúmeros motivos; porém, algumas dificuldades enfrentadas são a

heterogeneidade das FA, o desconhecimento da dose ótima e a duração do tratamento. A maioria dos estudos necessita de parâmetros de comparação entre os tipos de fibras e de métodos para determinar a contribuição da ingestão dessas fibras (James *et al.*, 2003).

Assim, as fibras alimentares, têm sido sugeridas como moduladoras da composição da microflora intestinal através da formação dos AGCC (Steer *et al.*, 2000). Prebióticos são ingredientes não digestíveis que estimulam crescimento e/ou atividade de um limitado número de microorganismos capazes de proporcionar um ambiente intestinal saudável ao hospedeiro (Gibson e Roberfroid, 1995).

Probióticos, por sua vez, são microorganismos vivos que, administrados em dose adequada, conferem ao hospedeiro benefícios à sua saúde (FAO/WHO-Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2002).

A dieta proposta é uma combinação de fibras solúveis (FS), que produzem AGCC e insolúveis (FI), que levam esses ácidos até a região final do intestino, onde se dá a inflamação. (Figura 1).

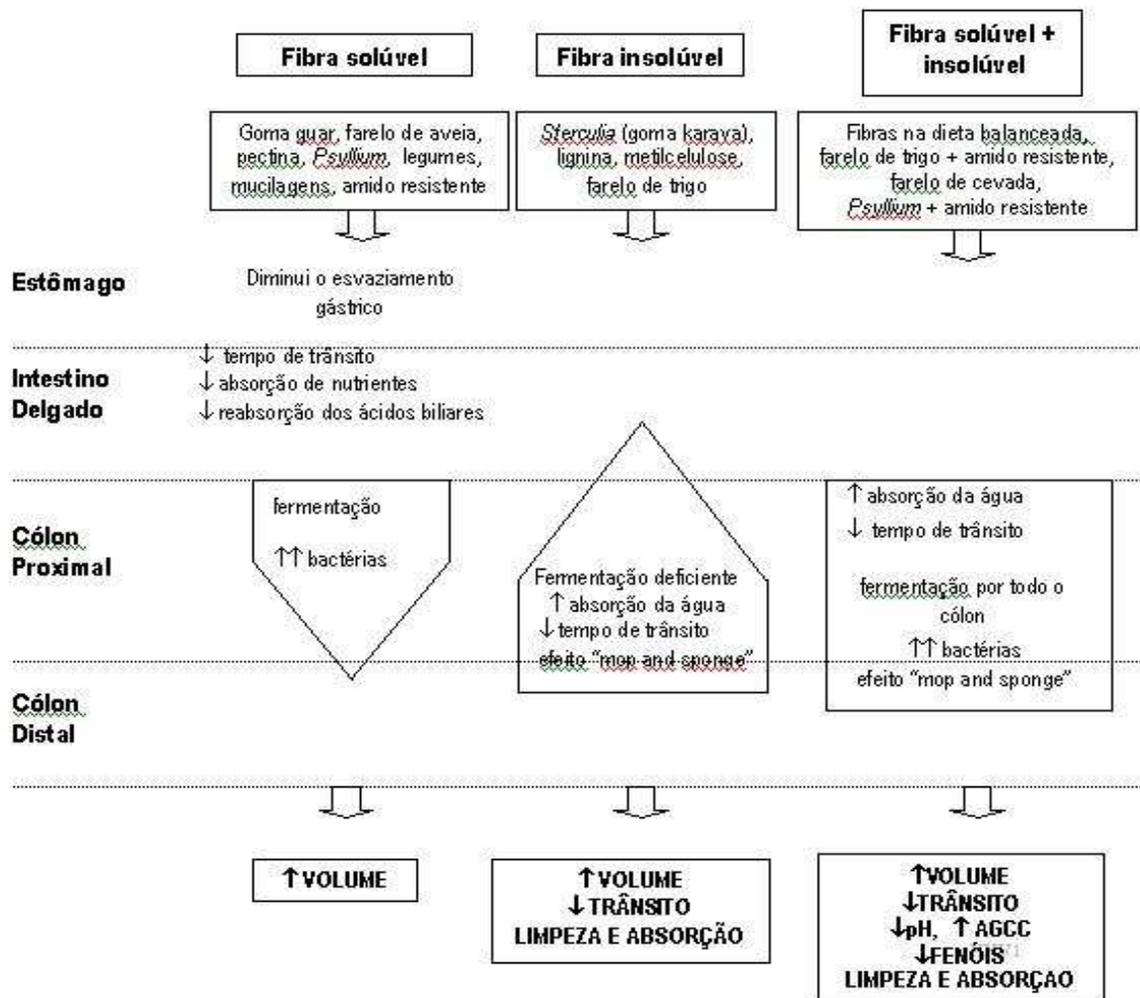


Figura 1 - Efeito das fibras solúveis, insolúveis e a combinação delas no trato gastrointestinal (James *et al.*, 2003).

## 1.7 Espécies Estudadas



Figura 2 – Laranja e Banana

A banana (*Musa paradisiaca* L., Musaceae) faz parte da medicina popular de muitos países. Investigações fitoquímicas prévias em plantas do gênero *Musa* resultaram no isolamento de fenilfenalenonas, como a irenolona e a emenolona (Luis *et al*, 1993), triterpenos (Dutta *et al*, 1983; Banerji *et al*, 1982), flavonóides (Lewis *et al*, 1999; Ali *et al*, 1993) os quais também estão presentes em abundância na banana (Vijayakumar *et al*, 2008) e esteróides (Akihisa *et al*, 1986; Ghosal *et al*, 1895). Várias das substâncias encontradas na banana apresentam propriedades antioxidantes; também foi demonstrado que o pó de banana apresenta propriedades antiulcerogênicas (Costa *et al.*, 1997).

A laranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) possui flavonóides de duas classes: flavonas e flavanonas; as flavonas são glicosiladas e das polimethoxi flavonas, a hesperetina é a mais abundante (Shiming *et al*, 2006). Também já foram

isoladas de *Citrus* apigeninas, diosmetinas, hesperitinas, ferulatos, cumaratos entre outras substâncias (Lin *et al*, 2007), algumas delas apresentando atividade antioxidante (Crespo *et al*, 1999; Mizoyama *et al*, 2004). A laranja, quando associada à goma guar, também apresenta atividade anti-ulcerôgenica (Magri *et al*, 2007).

A quantidade de fibras totais, assim como os teores e tipos de fibras solúveis e insolúveis nas frutas é bastante variável. Nas frutas estudadas, uma banana média de 100g tem 2.39g de fibras totais, sendo 1.79g de fibras insolúveis e 0.6g de fibras solúveis; já uma laranja média de 100g possui 2.39g de fibras totais, sendo 1g de fibras insolúveis e 1.39g de fibras solúveis (Spiller, 2001).

O interesse desse tipo de pesquisa relaciona-se à necessidade da descoberta de novas substâncias de origem natural com ação comprovada e pouca toxicidade para os humanos. Nesse sentido, o uso medicinal de algumas plantas, freqüentemente consolidado por uma longa tradição popular, pode fornecer indicações úteis para possíveis aplicações terapêuticas após terem sido farmacologicamente avaliadas (Guarrera, 1999).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Desenvolver uma combinação de fibras alimentares de banana e laranja e avaliá-la na inflamação intestinal induzida por TNBS.

### **2.2 Específicos**

a) Quantificar a produção dos AGCC produzidos *in vitro*, principalmente butirato, a partir de diferentes combinações de banana e laranja;

b) Suplementar a dieta de ratos com a mistura que produziu a maior quantidade de butirato para observar seu possível efeito protetor na inflamação intestinal induzida por TNBS;

c) Analisar as lesões, algumas enzimas antioxidantes (GSH, GPx e GR), atividade da mieloperoxidase e peroxidação lipídica, das porções cólicas dos animais submetidos à inflamação por TNBS.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Fibras**

A banana, proveniente de cultivo orgânico, foi lavada e seca em estufa à 40°C. Após a secagem, a casca foi retirada ficando somente a polpa que foi triturada em moinho de facas e armazenada em pequenas frações no congelador a -18°C. A banana preparada foi usada como fonte de fibras solúveis.

A polpa de laranja, como fonte de fibra, foi obtida como subproduto na produção de suco de laranja e fornecida pela CITROSUCO PAULISTA –S/A, Limeira, São Paulo, Brasil.

Esse material foi separado no finisher após a extração do suco sendo constituído pelas membranas das vesículas que armazenam o suco e pela membrana maior que separa as vesículas em gomos. Inicialmente, a polpa de laranja foi lavada, seca em secador de bandeja com circulação de ar a 70°C e, após este período, moída em moinho martelo.

#### **3.2 Teste *In Vitro***

Na etapa experimental *in vitro*, foram realizadas diferentes combinações ou proporções de banana e laranja. As combinações testadas, numeradas de (1 a 9), foram:

(1) salina

(2) salina + fezes

- (3) 0,5 g banana + fezes;
- (4) 0,4 g banana + 0,1 g laranja+ fezes;
- (5) 0,3 g banana+ 0,2 g laranja+ fezes;
- (6) 0,25 g banana + 0,25 g laranja+ fezes;
- (7) 0,2 g banana + 0,3 g laranja+ fezes;
- (8) 0,1 g banana + 0,4 g laranja+ fezes,
- (9) 0,5 g laranja+ fezes.

Cada uma das misturas foi colocada em garrafa de plástico e hidratada com PBS pH 7,4 e Oxyrase<sup>®</sup> por 12 a 16 horas à 4°C. Oxyrase<sup>®</sup> é uma enzima que retira o oxigênio do ambiente onde se encontra para permitir o crescimento das bactérias anaeróbicas, no caso as intestinais. Após hidratação das fibras, 10 mL de suspensão fecal de rato (suspendido em PBS pH 7,4 acrescido de Oxyrase<sup>®</sup> na proporção de 1:6) foram adicionados a essas fibras e incubadas por 24 horas, à 37°C, sob suave agitação. Durante essas 24 horas foram retiradas alíquotas de 2 mL nos tempos 0 (momento da incubação), 2, 4, 8, 12 e 24 horas. Foi adicionado 1 mL de solução de sulfato de cobre (10 g/L) em cada alíquota para inibir o crescimento microbiano. Essas amostras foram armazenadas em freezer a -20°C para posterior quantificação dos AGCC de acordo com o método descrito por Velázquez *et al.* (2000), como apresentado na Figura 3.

Os AGCC foram analisados por HPLC no Laboratório do Prof. Dr. Paulo Mazzafera, no Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da

UNICAMP, com a finalidade de determinar qual mistura produziu a maior quantidade de butirato, de acordo com o esquema apresentado na Figura 3.

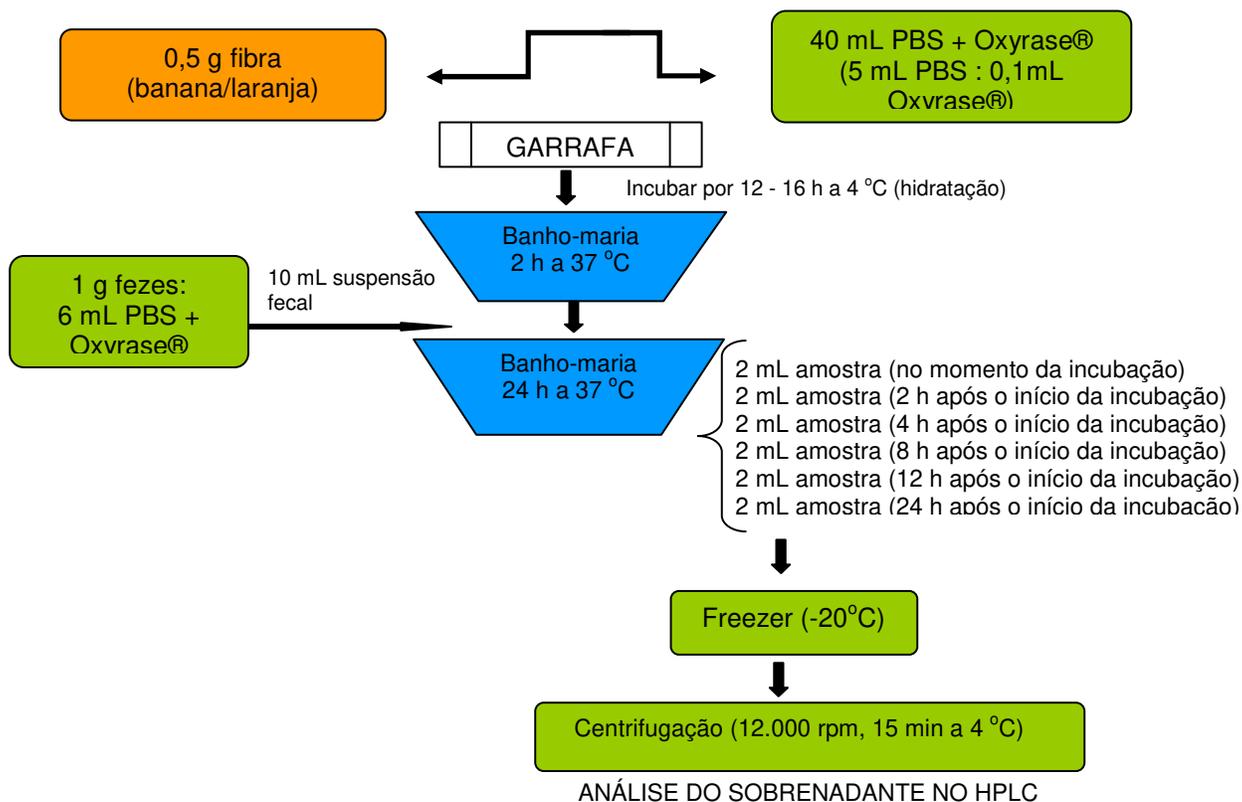


Figura 3 - Teste *in vitro*

### 3.3 HPLC/ Quantificação Dos Ácidos Graxos De Cadeia Curta

Os AGCC foram identificados e quantificados simultaneamente por CLAE (cromatógrafo VARIAN, modelo 9012; detector UV modelo: 9050) no comprimento de onda 210 nm, utilizando coluna Varian Micropak de troca catiônica (300 x 6,5mm, nº11418926). O volume de amostra injetada foi de 20 µL. Utilizou-se, como fase móvel, ácido sulfúrico 2,5 mM, em temperatura

ambiente, com fluxo de 0,4mL/min (Canale, Valente e Ciotti, 1984; Guerrant, Lambert e Moss,1982).

### 3.4 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 180 e 250 g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram aclimatados às condições do biotério local, por cerca de 15 dias, antes dos ensaios experimentais, sob temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro-escuro controlado de 12 h, e alimentados com ração Nuvital (Nuvilab) e água *ad libitum*. A composição da ração, fornecida pelo, fabricante é: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos. Os níveis de garantia por kg do produto são:

<i>Umidade (máx)</i>	12,50 %
<i>Proteína bruta (mín)</i>	22,00 %
<i>Extrato etéreo (mín)</i>	4,5 %
<i>Matéria mineral (máx)</i>	10,00 %
<i>Matéria fibrosa (máx)</i>	8,00 %
<i>Cálcio (máx)</i>	1,40 %
<i>Fósforo (mín)</i>	0,80 %

Os protocolos experimentais dos testes realizados nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UNICAMP (Protocolo nº767-1).

### **3.5 Inflamação Intestinal Induzida Por TNBS**

A indução da inflamação foi baseada no método descrito por Morris *et al.* (1989). Após jejum de 24 horas, os animais foram sedados com halotano e, através de sonda retal inserida por 8 cm no reto do animal (cânula de Teflon de diâmetro exterior de 2 mm), foi administrada uma dose única de 10 mg de TNBS (ácido 2, 4, 6-trinitrobenzeno sulfônico) dissolvido em 0,25 mL de etanol 50% v/v. Os animais foram mantidos de cabeça para baixo até a recuperação total da anestesia.

Os grupos, randomicamente distribuídos em 10 animais/grupo, foram:

- ◇ controle (solução salina, 9 g/L sem indução por TNBS),
- ◇ não-tratado (solução salina + indução por TNBS), e
- ◇ tratado (mistura 0,1 g de banana + 0,4 g de laranja/kg + indução por TNBS).

Durante os 15 dias que antecederam a indução da inflamação e 7 dias após a indução, os grupos controle e não-tratado receberam, além da alimentação habitual, solução salina por gavagem (10 mL/kg). O grupo tratado recebeu a mistura de fibras que produziu *in vitro* a maior quantidade de butirato, isto é, 0,1 g de banana e 0,4 g de laranja/kg em solução salina (Figura 3).

Durante todo o experimento, o peso dos animais foi registrado e a presença ou não de diarreia (dado qualitativo), após a indução da inflamação por TNBS, foi verificada. A eutanásia de todos os animais foi realizada no 24º dia.

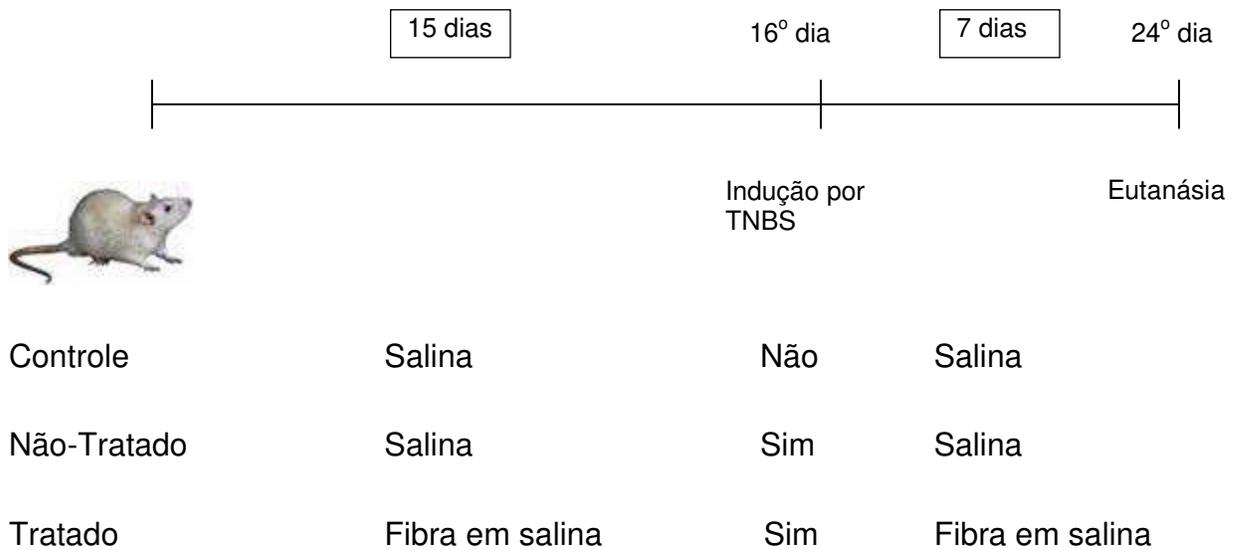


Figura 4 - Inflamação intestinal induzida por TNBS.

### 3.6 Drogas Utilizadas

As drogas utilizadas para a colite induzida por TNBS foram: TNBS (solução de ácido picrilsulfônico, 5% (w/v) – (SIGMA Chemical Co, St. Louis, USA), halotano (CRISTÁLIA, Itapira, Brasil).

### 3.7 Detecção Da Lesão Do Cólon

Após a eutanásia dos animais, a porção cólica (8 cm a partir do ânus) foi retirada e colocada rapidamente em placas de vidro resfriadas, removendo-se o mesentério e depósitos lipídicos aderidos. O cólon foi aberto em seu sentido longitudinal, lavado, fotografado; em seguida, dois observadores independentes, ambos desconhecedores dos tratamentos empregados em cada grupo, atribuíram diferentes graus (numa escala variando de 0 a 10) de danos macroscópicos visíveis (Bell *et al.*, 1995).(Figura 5) Após este procedimento, o segmento cólico foi dividido em 3 partes e estas foram congeladas a 80 °C negativos, para determinações das enzimas antioxidantes (dosagem de grupamentos sulfidril, glutaciona peroxidase e redutase) da atividade da mieloperoxidase e determinação do índice de peroxidação lipídica.

<b>0 pontos</b>	Cólon normal
<b>1 ponto</b>	Hiperemia localizada, sem úlcera
<b>2 pontos</b>	Ulceração sem hiperemia nem engrossamento da parede intestinal
<b>3 pontos</b>	Ulceração com 1 ponto de inflamação
<b>4 pontos</b>	Dois ou mais sítios de inflamação
<b>5 pontos</b>	Zonas grandes de danos, inflamação e ulceração com uma extensão maior do que 1 cm
<b>6-10 pontos</b>	Zonas grandes de dano tecidual com uma extensão maior do que 2 cm, adicionando 1 ponto (até10) por cada cm adicional de extensão

Figura 5 – escala de valores do índice de danos macroscópicos no modelo de colite experimental por TNBS induzido em ratos.

### **3.8 Avaliação Da Atividade Antioxidante**

Porções cólicas dos diferentes grupos foram homogeneizadas com tampão Fosfato de Sódio 0,1 M, pH 7,4 usando o Polytron (PT - 1035 Kinematica, AG – Switzerland). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 12.000 rpm a 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante analisado.

#### **3.8.1 Dosagem De Proteínas Totais**

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford (1976). A absorbância foi lida no espectrofotômetro VersaMax microplate reader (Molecular Devices, USA) com o programa SoftMax® Pro a 600 nm.

#### **3.8.2 Quantificação Dos Grupamentos Sulfidrila (GSH)**

O método utilizado na quantificação dos GSH foi descrito por Faure e Lafond (1995), e sofreu algumas modificações. Em 100 µl de meio constituído de Tris 1 mM e EDTA 2 mM, com pH 8,2, foi adicionado 100 µL de homogenato. A absorbância da solução inicial (A1) foi determinada em espectrofotômetro a 412 nm. À mistura foram adicionados 20 µL de ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), 10 mM (diluído em metanol). Após 15 minutos foi feita a segunda leitura (A2). Para zerar o aparelho, o meio de reação (Tris-EDTA) foi utilizado e, como branco, o DTNB diluído no mesmo tampão (B). Para calcular a concentração de grupamentos sulfidrila, a seguinte equação foi aplicada:  $(A1-A2-B) \times 1,57 \text{ mM}$ .

#### **3.8.3 Atividade Da Glutathiona Peroxidase (GPx)**

A atividade da GPx foi determinada de acordo com o método de Yoshikawa *et al.* (1993). Aos sobrenadantes foram adicionados 25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 mM de glutathiona reduzida, 0,8 mM de NADPH e 1 U de enzima glutathiona

redutase em PBS, pH 7,4. A absorvância foi lida em espectrofotômetro a 365 nm, entre 3 a 10 minutos. Os resultados foram expressos em nmol/min por mg de proteína.

#### **3.8.4 Atividade Da Glutathiona Redutase (GR)**

Para tanto utilizou-se o método de Carlberg e Mannervik (1985). A reação enzimática foi constituída de: 0,1 M de tampão fosfato, pH 7,4, 0,2 mM de EDTA, 1 mM de GSSG e 0,1 mM de NADPH. A absorvância foi medida em espectrofotômetro a 365 nm. A atividade da enzima foi definida como nmol NADPH consumido/min/mg. O coeficiente de extinção para o NADPH utilizado foi  $6,22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### **3.8.5 Determinação Do Índice De Peroxidação Lipídica (LPO)**

O sobrenadante foi diluído em KCl 0,15M (relação 1:10). Em seguida, a 0,5 mL deste homogenato foram adicionados 0,2 mL do dodecil sulfato de sódio (8,1%); 1,5 mL de ácido acético (20%, solução ajustada com NaOH a pH 3,5); 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,8% p/v) e 0,3 mL de água destilada. Todas as amostras foram colocadas em banho-maria, com termostato ajustado para 95°C por 1 hora. Após este período, as amostras foram retiradas do banho-maria. Uma vez frias, foram adicionados 1 mL de água destilada e 5 mL de n-butanol às amostras. Os tubos foram agitados por 1 minuto e centrifugados a 1400 G por 15 minutos. A absorvância da capa orgânica foi determinada, a 532 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como nmol de TBARS por mg de proteínas (nmol TBARS/ mg de proteínas) (Ohkawa *et al.*, 1979).

### **3.8.6 Atividade Da Mieloperoxidase (MPO)**

A atividade da MPO foi determinada de acordo com o método de Krawisz *et al.*, (1984). À 6,7 µL da amostra diluída 10 vezes foram adicionados 193,3 µL de tampão Fosfato de Sódio 0,05 M, pH 6,8 contendo dihidroclorato de o-dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 460 nm entre 0 e 10 minutos. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

### **3.9 Análise Estatística**

A avaliação estatística dos resultados foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA) de uma via, com nível crítico igual ou menor a 0,05 para rejeição da hipótese de nulidade. Na presença de significância na ANOVA, foi procedida a análise de contraste entre as médias aplicando-se o teste *a posteriori* de Dunnett com nível de significância igual ou menor a 0,05. Também foi utilizada a análise da mediana com nível crítico igual ou menor a 0,05 para rejeição da hipótese de nulidade. Na presença de significância, foi procedida a análise de contraste entre as médias aplicando-se o teste *a posteriori* de Mann-Whitney U-test com nível de significância igual ou menor a 0,05

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Teste *In Vitro*

No teste *in vitro*, a mistura que mais produziu AGCC (acetato, propionato e butirato) em 8 horas de fermentação foi a mistura 0,1 g de banana + 0,4 g de laranja. Neste tempo, como pode ser visto na Figura 6, a mistura acima referida produziu 8,567 mg/ml acetato, 0,849 mg/ml de propionato e 9,304mg/ml de butirato. Os grupos: 18 (apenas salina), 28 (salina+amostra fecal), 38 ( amostra fecal + 0,5 g banana), 48 (amostra fecal + 0,4 g banana + 0,1 g laranja), 58 (amostra fecal + 0,3 g banana+ 0,2 g laranja), 68 (amostra fecal + 0,25 g banana + 0,25 g laranja), 78 (amostra fecal + 0,2 g banana + 0,3 g laranja), 88 (amostra fecal + 0,1 g banana + 0,4 g laranja) e 98 ( amostra fecal + 0,5 g laranja).

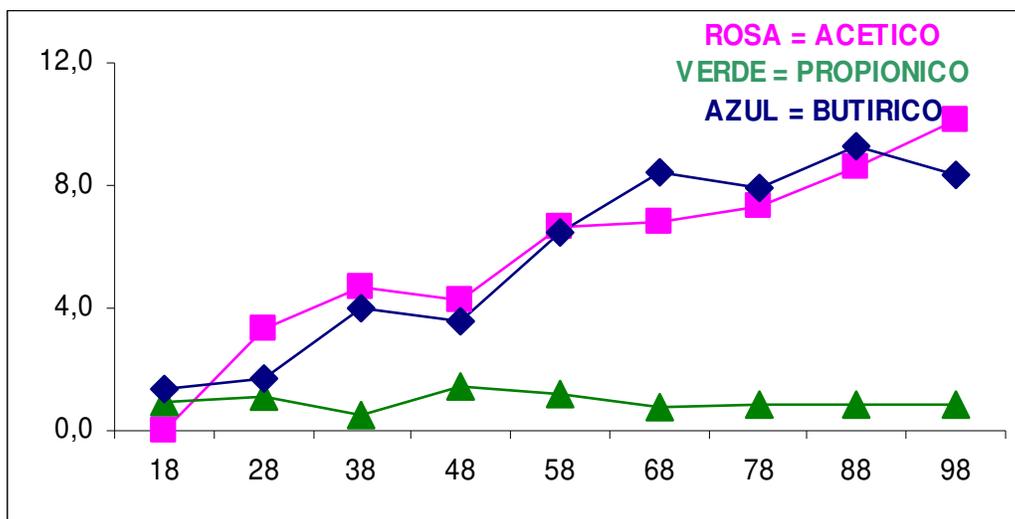


Figura 6 - Produção dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta (□: ác. acético; △: ác. propiônico; ◇: ác. butírico), no teste *in vitro*, produzidos durante 8 horas de

fermentação de fibras alimentares pelas bactérias intestinais de rato a partir de diferentes proporções de banana e laranja. (mg/ml).

#### 4.2 Inflamação Intestinal Induzida Por TNBS

Na avaliação macroscópica, tanto o grupo tratado quanto o grupo não tratado apresentaram lesões bastante semelhantes, de acordo com o método descrito por Bell *et al.* (1995) (Figuras 7 e 8). Metade dos 10 ratos do grupo tratado não apresentou diarreia.

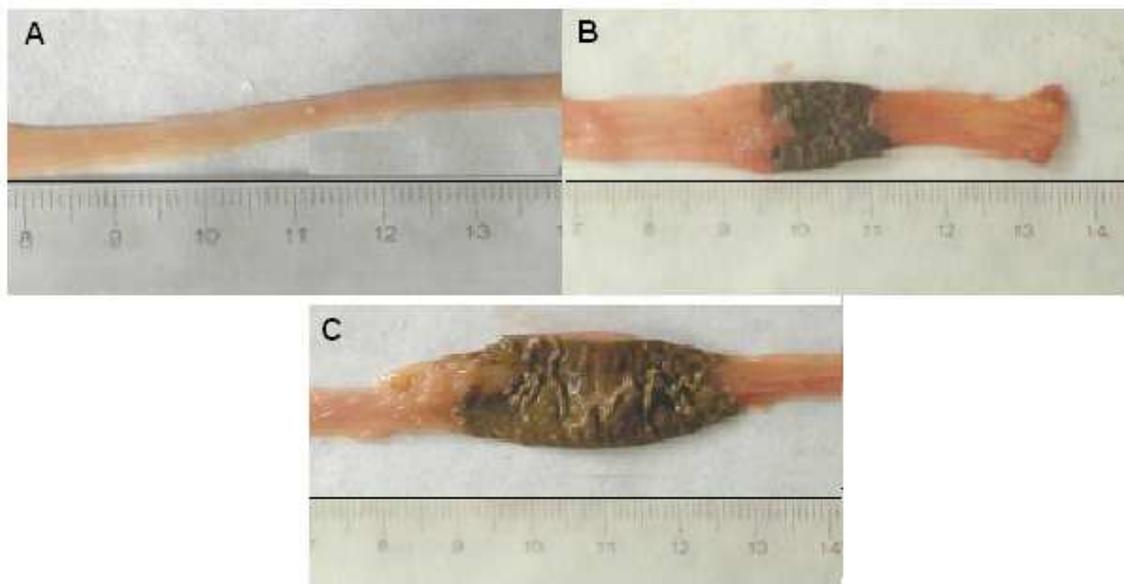


Figura 7 – Lesões visualizadas após a indução de colite por TNBS, ao término do tratamento. A: grupo controle; B: grupo não tratado; C: grupo tratado.

Grupos	n	Danos macroscópicos (score 0 -10)
Salina	10	0.0 (0)
Não tratado	10	7.2 (3 - 9)
Tratado	10	7.0 (4 - 7)

Figura 8 – Escores ou graus de danos macroscópicos observados na porção cólica dos animais dos diferentes grupos. Dados expressos em mediana com pós teste ( $p < 0.01$ ) Mann-Whitney U-test ( $n=10$ )

Embora na Figura 9 pareça, claramente, ter ocorrido um menor ganho de peso para os animais não tratados, não houve diferença estatisticamente significativa na evolução ponderal dos três grupos analisados.

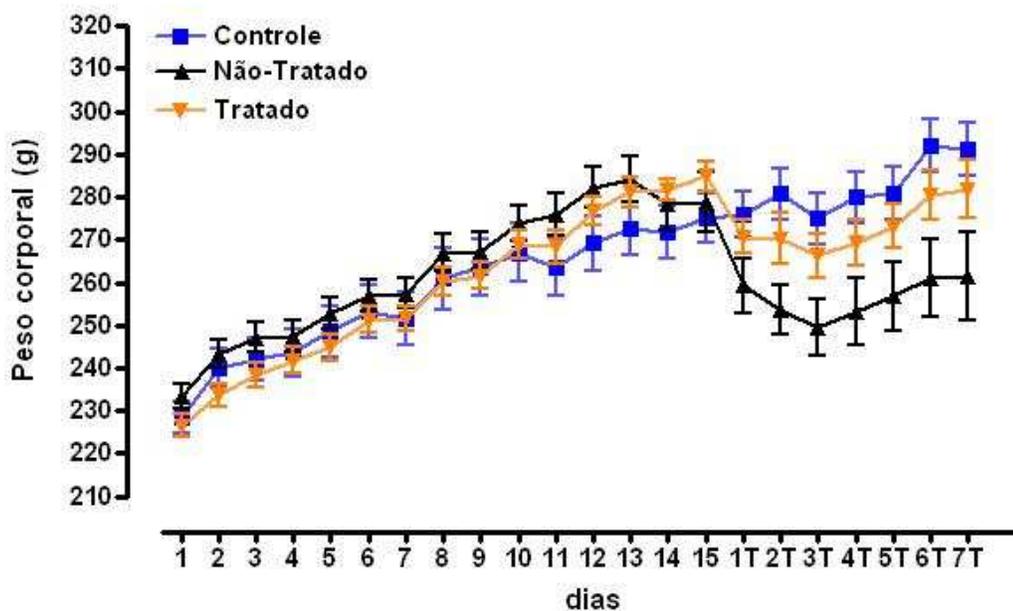


Figura 9 - Peso dos animais durante o experimento. A inflamação intestinal induzida por TNBS foi realizada no 15º dia. Dados expressos em média  $\pm$  d.p.. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett ( $p > 0,05$  comparados ao grupo controle).

### 4.3 Grupamentos Sulfidrila (GSH)

Houve diferença estatisticamente significativa na concentração de GSH entre os grupos controle ( $32,2 \pm 2,3$  nmol/mg proteína), que não recebeu TNBS, e aqueles que receberam TNBS e foram tratados com salina ( $7,2 \pm 2,1$  nmol/mg proteína) e com a mistura de fibras ( $10,1 \pm 2$  nmol/mg proteína), como pode ser visto na Figura 10. É possível verificar também que o grupo tratado com a mistura de banana e laranja (fibra) apresentou um leve aumento em relação aos níveis de GSH que aquele que recebeu apenas salina; entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles.

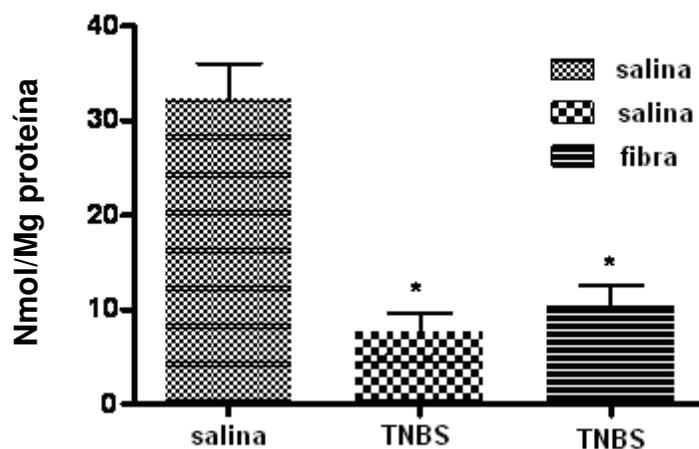


Figura 10- Concentração dos Grupamentos Sulfidrila (GSH). Dados expressos em média  $\pm$  e.p.m. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett ( $p < 0,05$  comparados ao grupo controle). (n=10)

#### 4.4 Atividade Da Glutaciona Peroxidase (GPx)

Como pode ser verificado na Figura 11, houve diferenças estatisticamente significativas na atividade da GPx entre os grupos que receberam TNBS e foram tratados com salina ( $22 \pm 1,2$  nmol/min/mg proteína) e com a mistura de fibras de banana e laranja ( $18,7 \pm 1,3$  nmol/min/mg proteína), quando comparados ao grupo controle que não recebeu TNBS ( $40,4 \pm 7,1$  nmol/min/mg proteína). Entretanto, os dois grupos que receberam TNBS não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si.

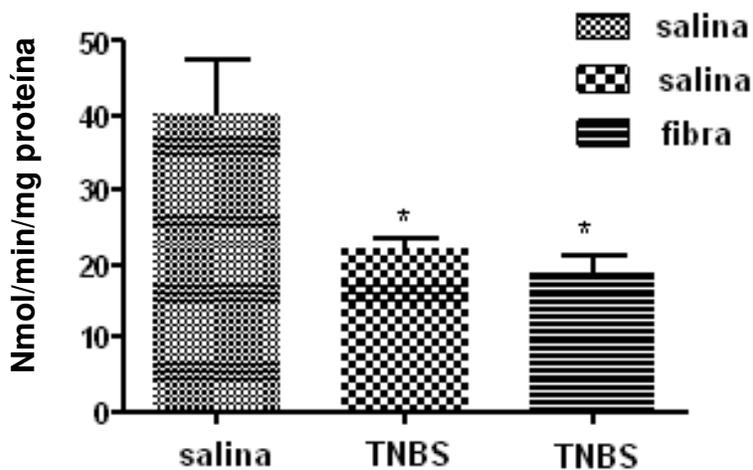


Figura 11 - Concentração da enzima Glutaciona Peroxidase (GPx). Dados expressos em média  $\pm$  e.p.m.. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett ( $p < 0,05$  comparado ao grupo controle). (n=10)

#### 4.5 Atividade Da Glutathione Redutase (GR)

Assim como em GSH e GPx, a Figura 12 mostra que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem TNBS - controle ( $70,1 \pm 5,7$  nmol/min/mg proteína) e aqueles grupos com TNBS tratados com salina ( $29,2 \pm 2$  nmol/min/mg proteína) e tratados com a mistura de banana e laranja ( $25 \pm 1,4$  nmol/min/mg proteína). Novamente, não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre ambos grupos que receberam TNBS.

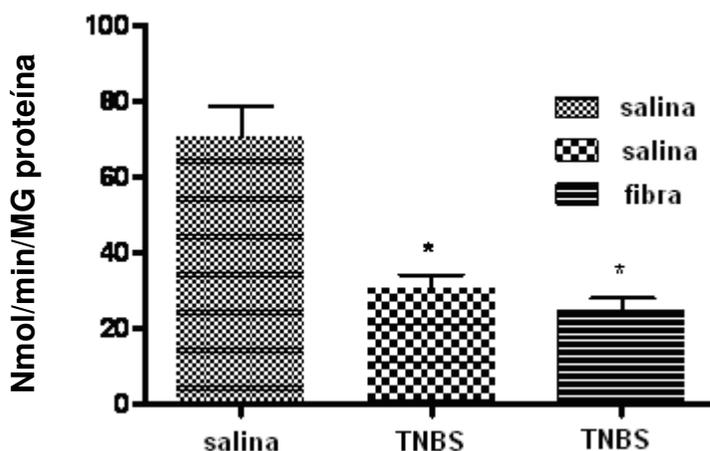


Figura 12 - Concentração da enzima Glutathione Redutase (GR). Dados expressos em média  $\pm$  e.p.m.. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett ( $p < 0,05$  comparados ao grupo controle). (n=10)

#### 4.6 Determinação Do Índice De Peroxidação Lipídica (LPO)

Não houve aumento significativo nos índices de peroxidação lipídica entre os grupos controle sem TNBS ( $0.058 \pm 0,02$  pmol/mg proteína) e aqueles que receberam TNBS e foram grupo tratados com salina ( $0,077 \pm 0,018$  pmol/mg proteína) e com a mistura das fibras de banana e laranja ( $0,05 \pm 0,01$  pmol/mg proteína) como pode ser melhor visualizado na Figura 13.

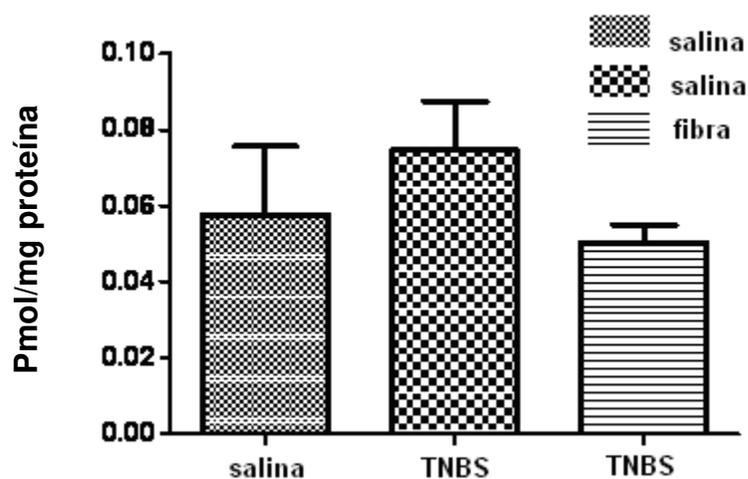


Figura 13 - Níveis de Peroxidação Lipídica (LPO). Dados expressos em média  $\pm$  e.p.m.. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett ( $p < 0,05$  comparado ao grupo controle). (n=10)

#### 4.7 Atividade Da Mieloperoxidase (MPO)

Na Figura 14 é possível notar que não houve aumento significativo entre a atividade da MPO entre os grupos controle sem TNBS ( $0.058 \pm 0,02$  U/g proteína) e aqueles que receberam TNBS e foram tratados com salina ( $0,077 \pm 0,02$  U/g proteína) e com a mistura de fibras de banana e laranja ( $0,082 \pm 0,03$  U/g proteína).

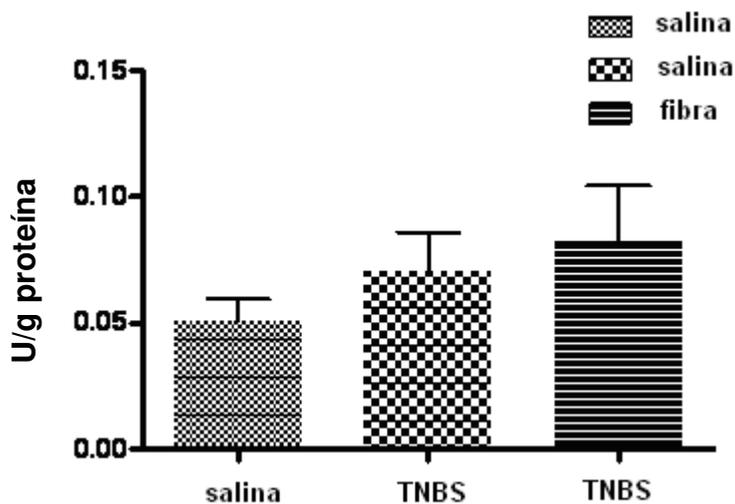


Figura 14 - Atividade da Mieloperoxidase (MPO). Dados expressos em média  $\pm$  e.p.m.. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  comparados ao grupo controle). (n=10)

## 5. DISCUSSÃO

A idéia original do trabalho com fibras alimentares no Laboratório de Produtos Naturais do IB da Unicamp sempre foi obter um alimento funcional utilizando frutas e verduras *in natura* que fazem parte da dieta usual da população, para prevenção e/ou tratamento das DII. Sendo assim, nunca houve intenção de utilizar extratos ou substâncias ativas deles isoladas. Assim, o objetivo é obter resultados que comprovem que a utilização de determinadas frutas e verduras na dieta usual pode prevenir/tratar DII.

Para tanto, basicamente, é necessário que além de prevenir/curar lesões intestinais induzidas experimentalmente, a utilização de uma dada mistura de fibras deve apresentar atividade antioxidante significativa devido a importância das ERRO nas DII, como já citado anteriormente. Especificamente, as fibras da banana e da laranja utilizadas neste trabalho, já se haviam mostrado eficazes nas análises antioxidantes, devido aos diversos componentes nelas presentes. Assim sendo, neste trabalho era necessário demonstrar que *in natura* também era possível observar a eficácia das fibras em mistura na prevenção/cura das lesões intestinais.

Por último, sempre houve a certeza de que a mistura das fibras selecionadas que produzisse *in vitro* a maior quantidade de butirato garantiria adicionalmente que a mesma tinha grande potencial de atuar na cura/prevenção das lesões induzidas experimentalmente em animais de laboratório. Esta é a razão pela qual este trabalho inicia-se com a dosagem de AGCC após sua produção por fermentação.

É conhecido que polissacarídeos (fibras) que chegam ao intestino grosso alteram a fisiologia cólica de duas maneiras: fisicamente (ao aumentar o volume das fezes, promovendo um efeito laxativo e diminuindo o tempo de trânsito intestinal), e quimicamente através da fermentação (Cummings, 1997). A fermentação, por sua vez, gera energia - para o crescimento e manutenção da flora microbiana - e produtos finais como: AGCC, gases (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>) e um pouco de calor (Topping e Clifton, 2001). No cólon proximal, onde os substratos são abundantes, ocorrem elevação do número de bactérias benéficas (como *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*), da proliferação bacteriana e do grau de fermentação dos carboidratos; esses substratos são depletados à medida em que o bolo fecal percorre o cólon, refletindo-se em menor produção de AGCC no cólon transversal e distal (MacFarlane e Gibson, 1995).

Estudo *in vitro* demonstrou que o butirato é a principal fonte energética dos colonócitos (Ahmad *et al.*, 2000). Grande parte do butirato (aproximadamente 90%) e do propionato (entre 10 e 50%) é metabolizada pela mucosa cólica. Alguns autores têm sugerido que pacientes com colite ulcerativa têm quantidades de AGCC diminuída nas fezes (Stein *et al.*, 1992; Araki *et al.*, 2002, Marchesi *et al.*, 2007), sugerindo que a restauração dos níveis luminiais de butirato pode facilitar a recuperação da mucosa inflamada (Kanauchi *et al.*, 1998). Enemas de AGCC, especialmente o butirato, tem sido usados como tratamento para inflamação do intestino, incluindo colite ulcerativa (Wong *et al.*, 2006). O butirato aumenta a atividade de enzimas antioxidantes, incluindo glutatona redutase, glutatona peroxidase e catalase (Louis *et al.*, 2004) e

exerce uma atividade protetora sobre o dano oxidativo do DNA induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rosignoli *et al.*, 2001). Estes efeitos podem ser importantes para mecanismos patogênicos mediados por ERO (Rosignoli *et al.*, 2001), como as DII, considerando que AGCC protege as células epiteliais da mucosa contra danos oxidativos (Ren *et al.*, 2001). Acredita-se que o butirato, em particular, mantenha equilibrada a regeneração dos colonócitos (Topping e Clifton, 2001).

Sabe-se que, de modo geral, as FS produzem AGCC e as FI levam esses ácidos até a região final do intestino, onde se dá a inflamação. Uma vez que as quantidades de butirato produzidas na mistura 0,1 g de banana + 0,4 g de laranja foram elevadas, optou-se pela utilização da mistura, de tal modo que os ácidos produzidos no cólon ascendente fossem conduzidos até o cólon distal.

Para investigar a imunopatogênese das DII, modelos murinos de colite experimental têm sido desenvolvidos, sendo freqüentemente usados para avaliar novas estratégias antiinflamatórias (Bouma e Strober, 2003; Pizarro *et al.*, 2003; Andreakos *et al.*, 2004). Um dos modelos mais utilizados é o da colite induzida pelo TNBS (Te Velde *et al.*, 2006). O etanol utilizado para a diluição do TNBS tem a função de quebrar a barreira da mucosa, expondo o sistema imune à microflora intestinal (Te Velde *et al.*, 2006). O efeito antiinflamatório almejado então dever-se-ia, provavelmente, ao butirato, que pode inibir a ativação da transcrição do NF-κB, reduzindo a formação de citocinas pró-inflamatórias (Segain *et al.*, 2000).

Na avaliação macroscópica (Figuras 7 e 8), quando a colite ulcerativa foi induzida por TNBS, tanto o grupo tratado com a mistura de fibras de laranja e

banana, quanto o grupo não tratado apresentaram lesões bastante semelhantes, de acordo com o método descrito por Bell *et al.* (1995). Apesar disso, metade dos 10 ratos do grupo tratado não apresentou diarreia.

A Figura 9 mostra uma rápida recuperação do peso corporal nos grupos com lesão induzida por TNBS, indicando que o agente lesivo não foi tóxico para os ratos. A perda de peso é o principal e mais importante indício de toxicidade de determinada substância (Souza Brito, 1994).

Na tentativa de explicar o mecanismo das FA de banana e laranja na inflamação intestinal induzida por TNBS, analisou-se a participação de algumas enzimas do sistema antioxidante. Acredita-se que os radicais de oxigênio sejam fatores patogênicos nas DII. Evidências experimentais sugerem que os efeitos mediados por ERO sejam importantes, tanto primária quanto secundariamente, nos mecanismos inflamatórios intestinais (Kruidenier e Verspaget, 2002).

Assim como em artrite reumatóide, nas DII a associação entre tecido lesionado e inflamação envolve um grande recrutamento e ativação de neutrófilos, monócitos, linfócitos e a superprodução de citocinas como TNF- $\alpha$ , eicosanóides, proteinases e espécies reativas, incluindo HOCl e ONOO $\cdot$ . Peróxido de hidrogênio, HOCl e cloraminas são capazes de aumentar a permeabilidade da parede intestinal e promover secreção de eletrólitos, provavelmente contribuindo para a diarreia. É comum haver sangramento na mucosa inflamada, fornecendo o ferro necessário à geração de OH $\cdot$  (Keshavarzian *et al.*, 2003).

Em humanos com DII, os níveis de GSH são baixos, sendo esse tripeptídeo o mais abundante antioxidante sintetizado pelas células animais; ele apresenta um papel essencial na modulação da resposta celular das mudanças redox associadas às ERO, além de ser importante para a integridade funcional do intestino (Oz *et al.*, 2005). Animais deficientes em GSH apresentaram degradação severa da mucosa cólica, perda de peso e diarreia (Martensson *et al.*, 1990). A administração de N-acetilcisteína no modelo de colite induzida por TNBS diminui os danos produzidos na mucosa (Ardite *et al.*, 2000), sugerindo que precursores de GSH possam ser benéficos no tratamento das DII.

S-adenosilmetionina, outro precursor de GSH, é necessário ao metabolismo dos ácidos nucleicos, reações de metilação, produção de poliamina e manutenção da estrutura e funções de membranas (Lu, 2000). O GSH pode ser consumido por uma reação indireta com compostos ativados pelo TNBS, conhecidos como mecanismo de inativação xenobiótica (Nieto *et al.*, 2000).

Houve diferença estatisticamente significativa na concentração de GSH entre os grupos controle, que não recebeu TNBS, e aqueles que receberam TNBS e foram tratados com salina e com a mistura de fibras. Apesar do fato de que o grupo tratado com a mistura de banana e laranja (fibra) apresentou leve aumento em relação aos níveis de GSH que aquele que recebeu apenas salina, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles. Estes dados demonstram que a mistura de fibras não foi capaz de restaurar os níveis basais de GSH após a indução de colite com TNBS (Figura 10).

Além disso, é descrito que o cólon humano tem pequenas quantidades de enzimas antioxidantes como catalase, superóxido dismutase e GPx. O desequilíbrio entre essas enzimas seqüestradoras de radicais livres e a produção de ERO pode levar a danos no tecido (Nieto *et al.*, 2000). Um aumento da GPx, enzima que metaboliza peróxidos no epitélio cólico (Drew *et al.*, 2005), foi observado em ratos com colite induzida por TNBS (Nieto *et al.*, 2000). Os resultados obtidos indicaram que diferenças estatisticamente significativas na atividade da GPx entre os grupos que receberam TNBS e foram tratados com salina e com a mistura de fibras de banana e laranja foram observadas, quando os valores foram comparados aos níveis basais do grupo controle que não recebeu TNBS; entretanto, os dois grupos que receberam TNBS não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si. Estes dados demonstram que a mistura de fibras não foi capaz de restaurar os níveis basais de GPx após a indução de colite com TNBS (Figura 11).

A enzima glutathiona redutase (GR), utilizando como co-fator NADPH, converte a GSH à sua forma reduzida, já que a enzima GPx converte  $H_2O_2$  em  $H_2O$ , a partir da oxidação da glutathiona (Kwiecien *et al.*, 2002). O ciclo “redox” da glutathiona desempenha um papel importante na integridade da mucosa. GR está aumentada em DII, o que promoveria proteção antioxidante porque GSH serve como redutor no metabolismo de vários hidroperóxidos (ex:  $H_2O_2$ ) gerados pela peroxidação de membranas lipídicas (reação catalisada pela GPx). Esse aumento de GPx também foi observado em ratos tratados com TNBS (Nieto *et al.*, 2000). A elevada atividade da GR pode aumentar o total da GSH celular;

contudo, os altos níveis de hidroperóxidos gerados pelos metabólitos do TNBS e, paralelamente, o aumento na GPx pode contribuir para as baixas concentrações de GSH. Assim como para GSH e GPx, a Figura 12 mostra que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle (sem TNBS) e aqueles grupos que receberam TNBS e foram tratados com salina e com a mistura de banana e laranja. Novamente, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre ambos grupos que receberam TNBS, ou seja, a mistura das fibras não foi capaz de restaurar os níveis controle de GR.

ERO podem atacar componentes celulares e extracelulares. É conhecido o fato de que ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares da bicamada lipídica são os principais alvos das ERO (Gutteridge, 1995). Uma vez que o processo de LPO é iniciado, normalmente pelo OH, ele continua numa reação em cadeia gerando hidroperóxidos lipídeos e aldeídos. O acúmulo de hidroperóxidos na membrana celular tem efeito profundo em sua fluidez e atividade das enzimas transmembranas, transportadores, receptores e outras proteínas de membrana (Jourdain *et al.*, 1993). Como consequência, a LPO pode causar mudanças na seletividade e permeabilidade da membrana, levando a alterações no volume e no metabolismo celular (Chen *et al.*, 1995).

Além disso, hidroperóxidos e aldeídos são tóxicos para as células e suas organelas (Aw, 1998), possuem propriedades quimiotáticas de neutrófilos e podem regular a produção de citocinas (Jayatilake e Shaw, 1998). Quando o sistema de detoxificação celular falha na remoção dos precursores de OH, em

particular os hidroperóxidos, a LPO acelera o processo de detoxificação. Uma vez iniciada a detoxificação, a ação da LPO pode ser interrompida por antioxidantes lipossolúveis, como o tocoferol (vitamina E) e o NO, que também mostrou ser um antioxidante capaz de interromper esse processo (Hogg e Kalyanaraman, 1999).

Não houve aumento significativo nos índices de peroxidação lipídica entre os grupos controle sem TNBS e aqueles que receberam TNBS e foram tratados com salina e com a mistura das fibras de banana e laranja (Figura 13). Os dados demonstraram que a LPO não parece participar, de modo significativo, na colite induzida por TNBS, já que os três grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si.

Um dos principais aspectos patológicos das DII é a infiltração de neutrófilos polimorfonucleares e células mononucleares dentro do tecido cólico (Cho *et al.*, 2007). Os leucócitos entram na mucosa durante a inflamação gastrointestinal, levando à produção exacerbada de EROs (Grisham e Granger, 1988 e Lu *et al.*, 2003). Infiltração neutrofílica dentro tem papel crucial na destruição de antígenos e na reconstrução do tecido inflamado. Uma medida da infiltração de neutrófilos é a atividade da mieloperoxidase cólica, que está relacionada à severidade das lesões na colite induzida por TNBS (Han *et al.*, 2006).

Observou-se que não houve aumento significativo da atividade da MPO entre os grupos controle sem TNBS e aqueles que receberam TNBS e foram tratados com salina e com a mistura de fibras de banana e laranja. É difícil

imaginar, entretanto, que não ocorra migração de neutrófilos para o sítio da inflamação induzida pelo TNBS; porém, o aumento verificado nos níveis de MPO, embora não significativo, foi maior no grupo tratado com a mistura de fibras do que naquele que recebeu apenas salina (Figura 14).

## 6. CONCLUSÕES

- A suplementação de fibras alimentares de banana e laranja na proporção 0,1 g de banana + 0,4 g de laranja/kg por 15 dias antes e 7 dias após a inflamação intestinal induzida por TNBS não atenuou as lesões produzidas;
- Os grupamentos sulfidríla, glutathione redutase, glutathione peroxidase, MPO e LPO do ponto de vista estatístico, mantiveram-se nos mesmos níveis daqueles que não receberam a mistura de fibras;
- As fibras alimentares de laranja e banana, nas condições de lesões severas induzidas por TNBS, não se mostraram eficazes para prevenção/cura dos danos causados pela indução de colite;

## 7. PERSPECTIVAS

- Aumentar (dobrar), na mesma proporção usada, a dose administrada de fibras aos ratos objetivando a busca de resultado positivo.
- Analisar, isoladamente, as substâncias purificadas a partir das fibras estudadas e que ainda não tenham sido testadas em colite para inferir sua possível atividade anti-inflamatória.
- Utilizar a mistura original de fibras no modelo de Dextrana (DSS), que induz lesões mais brandas, no sentido de mostrar uma atividade preventiva/curativa não observada.
- Investigar o mecanismo de ação das fibras alimentares de banana e laranja na inflamação. Isso poderá ser realizado através da quantificação de interleucinas, como a IL-6, IL-10 e IL-23 e fatores pró-inflamatórios como o TNF- $\alpha$  e o NF $\kappa$ B.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL A, RHODES JM. Smoking and IBD. *IBD Monitor* 2003; 4: 114-119.
- AHMAD MS, KRISHNAN S, RAMAKRISHNA BS, MATHAN M, PULIMOOD AB, MURTH SN. Butyrate and glucose metabolism by colonocytes in experimental colitis in mice. *Gut* 2000; 46: 493-499.
- AKIHISA T, SHIMIZU N, TAMURA T, MATSUMOTO T. (24S)-14R,- 24-Dimethyl-9 $\alpha$ ,19-cyclo-5R-cholest-25-en-3 $\alpha$ -ol: A new sterol and other sterols in *Musa sapientum*. *Lipids* 1986; 21: 494-497.
- ALI M, BHUTANI KK. Flavan-3,4-diols from *Musa sapientum* seeds. *Pharmazie* 1993; 48: 455-456.
- ALSTEAD EM. The pill: safe sex and Crohn's disease? *Gut* 1999; 45(2): 165-166.
- ANDREAKOS E, FOXWELL B, FELDMANN M. Is targeting Toll-like receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to modulating cytokine-driven inflammation? *Immunol Rev* 2004; 2002: 250-265.
- ARAKI Y, ANDOH A, FUJIYAMA Y, ITOH A, BAMBATA T. In vitro alterations in fecal short chain fatty acids and organic anions induced by the destruction of intestinal microflora under hypotonic and aerobic conditions. *Int. J. Mol. Med.* 2002; 9: 627-631.
- ARDITE E, SANS M, PANES J, ROMERO FJ, PIQUE JM, FERNANDEZ-CHECA JC. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. *Lab Invest* 2000; 80: 735-744.
- ARGENT GCG. Musaceae. In *The European Garden Flora. Volume II, Monocotyledons (Part II) Juncaceae to Orchidaceae*; Cambridge, U.K. Eds.; Cambridge University Press; 1984. p.117-119.
- AW TY. Determinants of intestinal detoxification of lipid hydroperoxides. *Free Rad Res* 1998; 28: 637-646.
- BACH JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347(12): 911-920.
- BAMIAS G, NYCE MR, DE LA RUE SA, COMINELLI F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ann Inter Med* 2005; 143: 895-904.
- BANERJI N, SEN AK, DAS AK. A new 9,19-cyclotriterpene from flowers of *Musa paradisiaca* (banana). *Indian J. Chem., Sect. B* 1982; 21: 387-388.
- BAUDITZ J, WEDEL S, LOCHS H. 1,25-dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *J Nutr* 2000; 130: 2648-2652.

- BAUDITZ J, WEDEL S, LOCHS H. Thalidomide reduces tumours necrosis factor (alpha) and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease. *Gut* 2002; 50: 196-200.
- BAUMGART DC, CARDING SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369: 1627-1640.
- BAUMGART DC, SANDBORN WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007; 369: 1641-1657.
- BELL CJ, GALL DG, WALLACE JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol* 1995; 268: 622-630.
- BIONDO-SIMÕES MLP, MANDELLI KK, PEREIRA MAC, FATURI JL. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. *Rev Bras Coloproct* 2003; 23(3): 172-182.
- BJORNSSON S, JOHANSSON JH. Inflammatory bowel disease in Iceland, 1990-1994: a prospective, nationwide, epidemiological study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12(1): 31-38.
- BONEN DK, CHO JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003; 124(2): 521-536.
- BOUMA G, STROBER W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 521-533.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 172: 248-254.
- BRIDGER S, LEE JC, BJARNASON I, JONES JE, MACPHERSON AJ. In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Gut* 2002; 51(1): 21-25.
- CAMPBELL JM, FAHEY JR GC, WOLF BW. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J Nutr* 1997; 127: 130-136.
- CANALE A, VALENTE ME, CIOTTI A. Determination of volatile carboxylic-acids (c1-c5i) and lactic-acid in aqueous acid-extracts of silage by high-performance liquidchromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1984; 35(11): 1178-1182.
- CARLBERG I, MANNERVIK B. Glutathione reductase. *Meth Enzymol* 1985; 113: 484-499.
- CHEN JJ, BERTRAND H, YU BP. Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products. *Free Rad Biol Med* 1995; 19: 583-590.

- CHIODINI RJ, VAN KRUININGEN HJ, THAYER WR, MERCAL RS, COUTU JA. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1984; 29(12): 1073-1079.
- CHO JY, CHANG HJ, LEE SK, KIM HJ, HWANG JK, CHUN HS. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of  $\beta$ -caryophyllene, a sesquiterpene. *Life Science* 2007; 80: 932-939.
- CHO JH. The nod2 gene in Crohn's disease: implications for future research into the genetics and immunology of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7(3): 271-275.
- CHO JH. Significant role of genetics in IBD: the nod2 gene. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; 3(1): S18-S22.
- CIPOLLA G, CREMA F, SACCO S, MORO E, DE PONTI F, FRIGO G. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and inflammatory bowel disease: current perspectives. *Pharmacol Res* 2002; 46(1): 1-6.
- CONNER EM, GRISHAN MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 1996; 12(4): 274-277.
- COPE GF, HEATLEY RV, KELLEHER JK. Smoking and colonic mucus in ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; 293(6545): 481.
- COSNES J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 481-496.
- COSTA M, ANTÔNIO MA, SOUZA BRITO ARM. Effects of prolonged administration of *Musa paradisiaca* L. (banana), an antiulcerogenic substance, in rats. *Phytotherapy Research* 1997; 11; 28-31.
- COULIE B, CAMILLERI M, BHARUCHA AE, SANDBORN WJ, BURTON D. Colonic motility in chronic ulcerative proctosigmoiditis and the effect of nicotine on colonic motility in patients and healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15(5): 653-663.
- CRESPO ME, GÁLVEZ J, CRUZ T, OCETE MA, ZARZUELO A. Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS. *Planta Med* 1999; 65(7): 651-653.
- CUMMINGS JH. *The large intestine in nutrition and disease*. Brussels: Institute Danone, 1997.
- DANESE S, SANS M, FIOCCHI C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 2004; 3(5): 394-400.
- DAS D, BANERJEE RK. Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. *Mol Cel Biochem* 1993; 125: 115-125.
- DREW JE, FARQUHARSON AJ, ARTHUR JR, MORRICE PC, DUTHIE GG. Novel sites of cytosolic GSH peroxidase expression in colon. *FEBS Lett*. 2005; 579: 6135-6139.
- DREWE E, POWELL RJ. Clinically useful monoclonal antibodies in treatment. *J Clin Pathology* 2002; 55: 81-85.

- DUERR RH. Update on genetics of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37(5): 358-367.
- DUTTA PK, DAS AK, BANERJI N. A tetracyclic triterpenoid from *Musa paradisiaca*. *Phytochemistry* 1983; 22: 2563-2564.
- EASTWOOD MA, MORRIS ER. Physical properties of dietary fiber that influence physiological function: a model for polymers along the gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1992, 55: 436-442.
- ELSON CO. Genes, microbes, and T cells – new therapeutic targets in Crohn’s disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 614-616.
- ELSON CO. The basis of current and future therapy for inflammatory bowel disease. *Am J Med* 1996; 100: 656-662.
- ENGEL GL. Psychological factors in ulcerative colitis in man and gibbon. *Gastroenterology* 1969; 57: 362-365.
- EVANS MJ, ECKERT A, LAI K, ADELMAN SJ, HARNISH DC. Reciprocal antagonism between estrogen receptor and NF-kappaB activity in vivo. *Circ Res* 2001; 89(9): 823-830.
- FANARO S, CHIERICI R, GUERRINI P, VIGI V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 2003; 91: 48-55.
- FAO/WHO – Food and Agriculture Organization of the United Nations e World Health Organization [acesso em 14 de nov de 2007]. Disponível em: URL:<http://www.sbafo.org.br>
- FAURE P, LAFOND JL. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. *Anal Free Rad Biol Syst* 1995; 237-248.
- GALVEZ J, RODRIGUEZ-CABEZAS ME, ZARZUELO A. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 601-608.
- GHOSAL S. Steryl glycosides and acyl steryl glycosides from *Musa paradisiaca*. *Phytochemistry* 1985; 24: 1807-1810.
- GIBSON GR, ROBERFROID MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concepts of prebiotics. *J Nutr* 1995; 125: 1401-1412.
- GREENWOOD-VAN MB, TYLER K, KEITH JR JC. Recombinant human interleukin-11 modulates ion transport and mucosal inflammation in the small intestine and colon. *Lab Invest* 2000; 80: 1269-1280.
- GRISHAM MB, GRANGER DN. Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig. Dis. Sci* 1988; 33: 6S–15S.

- GUARRERA PM. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *J Ethnopharmacol* 1999; 68: 183-192.
- GUERRANT GO, LAMBERT MA, MOSS CW. Analysis Of Short-Chain Acids From Anaerobic-Bacteria by High-Performance Liquid-Chromatography, *Journal of Clinical Microbiology* 1982; 16(2): 355-360.
- GUSLANDI M, TITTOBELLO A. Pilot trial of nicotine patches as an alternative to corticosteroids in ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1996; 31(4): 627-629.
- GUTTERIDGE JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.
- HALLERT C, BJORCK I, NYMAN M. *et al.* Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet: controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9(2): 116-121.
- HALTER F, TARNAWSKI AS, SCHMASSMANN A, PESKAR BM. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. *Gut* 2001; 49: 443-453.
- HAN W, MERCENIER A, AIT-BELGNAOUI A, PAVAN S, LAMINE F, VAN SWAM II, KLEEREBEZEM M, SALVADOR-CARTIER C, HISBERGUES M, BUENO L, THEODOROU V, FIORAMONTI J. Improvement of an experimental colitis in rats by lactic acid bacteria producing superoxide dismutase. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 1044-1052.
- HEAD KA, JURENKA JS. Inflammatory bowel disease part I: Ulcerative colitis – Pathophysiology and Conventional and Alternative Treatment Options. *Alt Med Rev* 2003; 8: 247-279.
- HENDERSON AD. Gene delivery. *J Control Release* 1997; 46: 75-87.
- HOGG N, KALYANARAMAN B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 378-384.
- HUSEBYE E, HELLSTROM PM, SUNDLER F, CHEN J, MIDTVEDT. Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G368-G380.
- JACKSON LM, HAWKEY CJ. COX-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs: do they really offer any advantages? *Drugs* 2000; 59: 1207-1216.
- JAMES SL, MUIR JG, CURTIS SL, GIBSON PR. Dietary fibre: a roughage guide. *Int Med J* 2003; 33: 291-296.
- JAYATILLEKE A, SHAW S. Stimulation of monocyte interleukin-8 by lipid peroxidation products: a mechanism for alcohol-induced liver injury. *Alcohol* 1998; 16: 119-123.

- JOURD'HEUIL D, VAANANEN P, MEDDINGS JB. Lipid peroxidation of the brush-border membrane: membrane physical properties and glucose transport. *Am J Physiol* 1993; 264: G1009-1015.
- KANAUCHI O, NAKAMURA T, AGATA K, MISSUYAMA K, IWANAGA T. Effects of germinated barley foodstuff on dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *J Gastroenterol* 1998; 33: 179-188.
- KARMELI F, COHEN P, RACHMILEWITZ D. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors ameliorate the severity of experimental colitis in rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 223-231.
- KESHAVARZIAN A, BANAN A, FARHADI A, KOMANDURI S, MUTLU E, ZHANG Y *et al.* Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; 52: 720-728.
- KRAWISZ JE, SHARON P, STENSON WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984; 87: 1344-1350.
- KRUIDENIER L, VERSPAGET HW. Oxydative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease – radical or ridiculous? *Alim Pharmacol Ther* 2002; 16 (12), 1997-2015.
- KWIECIEN S, BRZOZOWSKI T, KONTUREK SJ. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J.Physiol Pharmacol* 2002; 53: 39-50.
- LAROUX FS, PAVLICK KP, WOLF RE, GRISHAM MB. Dysregulation of intestinal mucosal immunity: implications in inflammatory bowel disease. *News Physiol Sci* 2001; 16: 272-277.
- LEWIS DA, FIELDS WN, SHAW GP. A natural flavonoid present in unripe plantain banana pulp (*Musa sapientum* L. var. *paradisica*) protects the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. *J. Ethnopharmacol* 1999; 65: 283-288.
- LIN L, HARNLY JM. A Screening Method for the Identification of Glycosylated Flavonoids and Other Phenolic Compounds Using a Standard Analytical Approach for All Plant Materials. *J. Agric. Food Chem* 2007; 55: 1084-1096.
- LOFTUS EV JR. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126: 1504-1517.
- LOFTUS EV JR, SILVERSTEIN MD, SANDBORN WJ, TREMAINE WJ, HARMSEN WS, ZINSMEISTER AR. Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gut* 2000; 46(3): 336-343.
- LOUIS M, ROSATO RR, BRAULT L, OSBILD S, BATTAGLIA E, YANG XH, GRANT S, BAGREL D. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate induces breast cancer cell

- apoptosis through diverse cytotoxic actions including glutathione depletion and oxidative stress. *Int. J. Oncol.* 2004; 25: 1701-11.
- LU J, WANG A, ANSARI S, HERSHBERG RM, MCKAY DM. Colonic bacterial superantigens evoke an inflammatory response and exaggerate disease in mice recovering from colitis. *Gastroenterology* 2003; 125: 1785–1795.
- LU SC. S-adenosylmethionine. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 391-395.
- LÜHRS H, GERKE T, MÜLLER JG, MELCHER R, SCHAUBER J, BOXBERGER F *et al.* Butyrate inhibits NF- $\kappa$ B activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 458-466.
- LÜHRS H, GERKE T, SCHAUBER J, DUSEL G, SCHEPPACH W, MENZEL T. Cytokine-activated degradation of inhibitory kappa B protein alpha is inhibited by the short chain fatty acid butyrate. *Int J Colorect Dis* 2001; 16: 195-201.
- LUIS JG, ECHEVERRI F, QUINONES W, BRITO I, LOPEZ M, TORRES F, CARDONA G, AGUIAR Z, PELAEZ C, ROJAS M. Irenolone and emenolone: Two new types of phytoalexin from *Musa paradisiaca* J. *Org. Chem.* 1993; 58: 4306-4308.
- MACFARLANE GT; GIBSON GR. Microbial aspects of the production of short-chain fatty acids in the large bowel. In: *Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids.* Cummings JH, Rombeau JL, Sakata S. Cambridge, UK: Cambridge Univ Press 1995, 87.
- MACPHERSON AJ, GATTO D, SAINSBURY E, HARRIMAN GR, HENGARTNER H, ZINKERNAGEL RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to comensal bacteria. *Science* 2000; 288: 2222-2226.
- MAEDA Y, NODA S, TANAKA K, SAWAMURA S, AIBA Y, ISHIKAWA H *et al.* The failure of oral tolerance induction is functionally coupled to the absence of T cells in Peyer's patches under germfree conditions. *Immunobiology* 2001; 204: 442-457.
- MAGRI LDP, BATISTA LM, ALMEIDA ABA, FARIAS-SILVA E, AREAS MA, SOUZA BRITO AR. Dietary fibers prevent ethanol and nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric mucosal damage in rats. *Nutrition Research* 2007; 27: 109–112 .
- MARCHESI JR, HOLMES E, KHAN F, KOCHHAR S, SCANLAN P, SHANAHAN F, WILSON ID, WANG Y. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J. Proteome Res.* 2007; 6: 546-551.
- MARTENSSON J, JAIN A, MEISTER A. Glutathione is required for intestinal function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 5: 1715-1759.
- MAWDSLEY JE, RAMPTON DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 2005; 54: 1481-1491.
- MAYER EA. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut* 2000; 47: 861-869.
- MEDZHITOV R. Toll-like receptor and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 135-145.

- MITTERMAIER C, DEJACO C, WALDHOER T, OEFFERLBAUER-ERNST A, MIEHSLER W, BEIER M *et al.* Impact of depressive mood on relapse in patients with inflammatory bowel disease: a prospective 18-month follow-up study. *Psychosom Med* 2004; 66: 79-84.
- MIZOYAMA Y, TAKAKI H, SUGIHARA N, FURUNO K. Inhibitory Effect of Flavonoids on *N*-Acetylation of 5-Aminosalicylic Acid in Cultured Rat Hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull* 2004; 27(9): 1455-1458 .
- MORRIS GP, BECK PL, HERRIDGE MS, DEPEW WT, SZEWCZUK MR, WALLACE JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803.
- MORTENSEN PB, CLAUSEN MR. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31(216): 132-148.
- NIETO N, TORRES MI, FERNANDEZ MI, GIRON MD, RIOS A, SUAREZ MD, GIL A. Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1820-1827.
- OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2): 351-358.
- OZ HS, CHEN TS, MCCLAIN CJ, DE VILLIERS WJ. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 297-304.
- PELTEKOVA VD, WINTLE RF, RUBIN LA, AMOS CI, HUANG Q, GU X *et al.* Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004; 36(5): 471-475.
- PERAN L, CAMUESCO D, COMALADA M, BAILON E, HENRIKSSON A, XAUS J, ZARZUELO A, GALVEZ J. A comparative study of the preventative effects exerted by three probiotics, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. *Journal of Applied Microbiology* 2007; 103: 836–844.
- PERAN L. Efecto antiinflamatorio intestinal de probióticos em el modelo de colitis experimental inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico em ratas [Tese-Doutorado]. Granada, Espanha: Universidad de Granada; 2007.
- PIZARRO TT, Arseneau KO, Bamias G, Cominelli F. Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol Med* 2003; 9: 218-222.
- PODOLSKY DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347(6): 417-429.
- PULLAN RD, RHODES J, GANESH S, MANI V, MORRIS JS, WILLIAMS GT *et al.* Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Engl J Med* 1994; 330(12): 811-815.
- RANG HP, DALE MM, RITTER JM, MOORE PK. Hormônios locais, inflamação e reações imunológicas. In: *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p. 246-276.

- REIMUND JM, ALLISON AC, MULLER CD, DUMONT S, KENNEY JS, BAUMANN R *et al.* Antioxidants inhibit the in vitro production of inflammatory cytokines in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 145-150.
- REN H, MUSCH MW, KOJIMA K, BOONE D, MA A, CHANG EB. Short-chain fatty acids induce intestinal epithelial heat shock protein 25 expression in rats and IEC 18 cells. *Gastroenterology* 2001; 121: 631-9.
- REUTER BK, ASFAHA S, BURET A, SHARKEY KA, WALLACE JL. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1996; 98: 2076-2085.
- ROGLER G, ANDUS T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *W J Surg* 2004; 22: 382-389.
- ROSIGNOLI P, FABIANI R, DE BARTOLOMEO A, SPINOZZI F, AGEA E, PELLI MA, MOROZZI G. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1675-1680.
- RUBIN DT, HANAUER SB. Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12(8): 855-862.
- SAFAYHI H, SAILER ER. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Plant Med* 1997; 63: 487-493.
- SANSONETTI PJ. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 953-964.
- SARTOR RB. Clinical applications of advances in the genetics of IBD. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; 3(1): S9-S17.
- SARTOR RB. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 1994; 106: 533-539.
- SCHMASSMAN A. Mechanisms of ulcer healing and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998; 104: 43S-51S, discussion 79S-80S.
- SEGAIN JP, DE LA BLETIERE DR, BOUREILLE A, LERAY V, GERVOIS N, ROSALES C *et al.* Butyrate inhibits inflammatory responses through NF- $\kappa$ B inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000; 47: 397-403.
- SEKSIK P, RIGOTTIER-GOIS L, GRAMET G, SUTREN M, POCHART P, MARTEAU P *et al.* Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003; 52: 237-242.
- SHIMING L, HAIQING Y, CHI-TANG HO. Nobiletin: efficient and large quantity isolation from orange peel extract. *Biomed. Chromatogr* 2006; 20: 133-138.
- SIVAKUMAR PV, WESTRICH GM, KANALY S, GARKA K, BORN TL, DENY JM *et al.* Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage. *Gut* 2002; 50: 812-820.

- SOPORI M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(5): 372-377.
- SOUZA BRITO. Manual de ensaios toxicológicos in vivo. Campinas: Editora Unicamp 1994.
- SOUZA MHLR, TRONCON LEA, RODRIGUES CM, VIANA CFG, ONOFRE PHC, MONTEIRO RA *et al.* Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retoretocolite ulcerativa inespecífica idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudeste do Brasil. *Arq Gastroenterol* 2002; 39(2): 98-105.
- SPILLER GA. Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition: Dietary fiber values for common foods. Flórida: CRC Press; 2001. p. 629-630.
- SRIVASTAVA ED, RUSSELL MA, FEYERABEND C, RHODES J. Effect of ulcerative colitis and smoking on rectal blood flow. *Gut* 1990; 31(9): 1021-1024.
- STEER T, CARPENTER H, TUOHY K, GIBSON GR. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutr Res Rev* 2000; 13: 229-254.
- STEIDLER L, HANS W, SCHOTTE L, NEIRYNCK S, OBERMEIER F, FALK W *et al.* Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000; 289: 352-354.
- STEIN J, KULEMEIER J, LEMBCKE B, CASPARY WF. Simple and rapid method for determination of short-chain fatty acids in biological materials by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.* 1992; 576: 53-61.
- SWIDSINSKI A, LADHOFF A, PERNTHALER A, SWIDSINSKI S, LOENING-BAUCKE V, ORTNER M *et al.* Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 44-54.
- TANAKA A, HASE S, MIYAZAWA T, TAKEUCHI K. Up-regulation of cyclooxygenase-2 by inhibition of cyclooxygenase-1: a key to nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced intestinal damage. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 754-761.
- TE VELDE AA, VERSTEGE MI, HOMMES DW. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12(10): 995-999.
- THOMAS MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 2000; 16(7/8): 716-718.
- THOMAS GA, RHODES J, GREEN JT. Inflammatory bowel disease and smoking – a review. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(2): 144-149.
- TOPPING DL, CLIFTON PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 2001; 81: 1031-1064.
- VELÁZQUEZ M, DAVIES C, MARETT R, SLAVIN JL, FEIRTAG JM. Effect of oligosaccharides and fibre substitutes on short-chain fatty acid production by human faecal microflora. *Anaerobe* 2000; 6: 87-92.

- VELÁZQUEZ OC, LEDERER HM, ROMBEAU JL. Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol* 1997; 427: 123-134.
- VIJAYAKUMAR S, PRESANNAKUMAR G, VIJAYALAKSHMI NR. Antioxidant activity of banana flavonoids. *Fitoterapia* 2008; 79: 279–282.
- WALLACE JL, MCKNIGHT W, REUTER BK, VERGNOLLE N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology* 2000; 119: 706-714.
- WILLS-KARP M, SANTELIZ J, KARP CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 2001; 1(1): 69-75.
- WOLFE, MM, LICHTENSTEIN DR, SINGH G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 1999; 340: 1888-1899.
- WONG JM, DE SOUZA R, KENDALL CW, EMAM A, JENKINS DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.* 2006; 40: 235-43.
- WOOD JD, PECK OC, TEFEND KS, STONEROOK MJ, CANIANO DA, MUTABAGANI KH *et al.* Evidence that colitis is initiated by environmental stress and sustained by fecal factors in the cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*). *Dg Dis Sci* 2000; 45: 385-393.
- YOSHIKAWA T, MINAMIYAMA Y, ICHIKAWA H, TAKAHASHI S, NAITO Y, MOTOHARU K. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indometacin in rats. *Gut* 1993; 3: 732-737.
- ZHENG CQ, HU GZ, ZENG ZS, LIN LJ, GU GG. Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. *World J Gastroenterol* 2003; 9(8): 1646-1656.