

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



ANDERSON LUIZ FERREIRA

**“AVALIAÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE
EM RATOS SUPLEMENTADOS COM UVA (*Vitis vinifera* L.)
NA VIGÊNCIA DE COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO
TRINITROBENZENOSULFÔNICO”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
ANDERSON LUIZ FERREIRA
Anderson Luiz Ferreira
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Campinas, 2009

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

F413a	<p>Ferreira, Anderson Luiz Avaliação antiinflamatória e antioxidante em ratos suplementados com uva (<i>Vitis vinifera</i> L.) na vigência de colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico / Anderson Luiz Ferreira. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientadora: Alba Regina Monteiro Souza Brito. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Uva. 2. Ácidos graxos de cadeia curta. 3. Enzimas antioxidantes. 4. Interleucinas. 5. Intestinos - Doenças inflamatórias. I. Brito, Alba Regina Monteiro Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
--------------	--

Título em inglês: Antiinflammatory and antioxidant evaluation in rats supplemented with grape (*Vitis vinifera* L.) in the presence of colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid.

Palavras-chave em inglês: Grape; Short chain fatty acid; Antioxidant enzymes; Interleukin; Inflammatory bowel diseases.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Alba Regina Monteiro Souza Brito, Clélia Akiko Hiruma-Lima, Cláudio Saddy Rodrigues Coy, Edson Antunes, Alessandra Gambero.

Data da defesa: 02/12/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 17 de dezembro de 2009

BANCA EXAMINADORA

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


Assinatura

Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima


Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Saddy Rodrigues Coy

Assinatura

Assinatura

Prof. Dr. Edson Antunes

Assinatura

Assinatura

Profa. Dra. Alessandra Gambero

Assinatura

Profa. Dra. Leônia Maria Batista

Assinatura

Profa. Dra. Eneida de Paula

Assinatura

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada

DEDICATÓRIA

Este trabalho é, e só poderia ser, dedicado aos MEUS PAIS, MEUS HERÓIS.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força que me move para vencer os obstáculos;

Aos meus irmãos Celso, Sandro e Fabiana eternos companheiros e amigos...EU AMO VOCÊS!!!

À minha Pati, por me fazer feliz. Tenho certeza de que nossa caminhada será longa;

À Dra. Alba pelo apoio excepcional como orientadora e pelo seu constante estímulo e ensinamentos oportunos na minha formação profissional; eu devo muito a senhora!!!!;

A todos os companheiros e amigos do Laboratório de Produtos Naturais; todos foram fundamentais (Aninha, Felipe, Erika, Victor, Ricardo, Cinza, Chris, Bitá, Pati, Cibele, Elis, Camilla, Luis);

À Aninha, uma pessoa honesta sem igual e uma amiga querida por todos... você é meu xodó. Sua amizade é um bem precioso;

À Cibas, minha parceira de viagens e de trabalho, uma pessoa da paz e companheira de todos os momentos;

Ao Prof.Dr. Lauro Tatsuo Kubota, sempre muito solícito, por sua ajuda nas análises das fibras; obrigado por tudo!

Ao Jailson que, juntamente com Dr. Kubota, foi imprescindível para execução desse trabalho;

À Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima, pelo seu vasto conhecimento, eficiência e disponibilidade em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. Edson Antunes que em todos os momentos em que precisei de seu auxílio, ele esteve lá; muito obrigado ao pesquisador pelo qual tenho profunda admiração....quero ser como você quando crescer!!!!

Aos docentes que compuseram a banca do exame de qualificação, Dr. Miguel, Dr. Parada e Dr. Edson; suas observações foram muito importantes;

Aos membros da banca examinadora, pelo interesse e dedicação na análise desta tese e pelas sugestões apresentadas;

Aos vendedores e amigos Tadeu e Lazinho, grandes companheiros...

Aos funcionários do Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica e da Pós graduação em Biologia Funcional e Molecular foi muito bom trabalhar com vocês!!!

Aos animais por exercerem um papel fundamental para o desenvolvimento da ciência;

E por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, que fomentou a realização desta Tese de Doutorado.

DAS UTOPIAS

Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

a presença distante das estrelas!

Mário Quintana

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE FIGURAS	xviii
INTRODUÇÃO.....	1
1. Doença Inflamatória intestinal	1
1.1. Aspectos gerais	1
1.2. Epidemiologia	3
1.3. Etiologia.....	3
1.4. Inflamação e DII.....	9
1.5. Produção de Citocinas.....	13
2. Terapêutica das DII	17
2.1. Terapia Convencional	18
2.2. Terapia não convencional	20
2.3. Antioxidantes.....	22
2.4. Ácidos graxos de cadeia curva (AGCC)	26
OBJETIVOS	28
MATERIAIS E MÉTODOS	29
3. Ensaio <i>in vitro</i>	29
3.1. Cromatografia de íons	30
3.2. Ensaio <i>in vivo</i>	32
3.2.1. Fibras Alimentares	32
3.2.2. Animais de experimentação.....	32

3.2.3.	Indução da colite experimental por TNBS.....	33
3.2.4.	Avaliação macroscópica das lesões.....	34
3.2.5.	Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) cólica	36
3.2.6.	Determinação dos conteúdos cólicos de glutathione total (GSH).....	37
3.2.7.	Atividade da glutathione peroxidase (GSH-PX).....	38
3.2.8.	Atividade da glutathione redutase (GSSG-Rd)	38
3.2.9.	Determinação da concentração de proteína total	38
3.2.10.	Avaliação da expressão de MadCAM-1, COX 1, COX 2 e NF- κ B.....	39
3.2.11.	Determinação das interleucinas 6, 10 e 12	40
3.2.12.	Análise Estatística.....	41
4.	RESULTADOS	42
4.1.	Ensaio <i>in vitro</i>	42
4.2.	Indução de colite experimental por TNBS.....	48
4.3.	Avaliação macroscópica das lesões.....	50
4.4.	Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	51
	DISCUSSÃO	64
	CONCLUSÃO.....	77
	PERSPECTIVAS	78
	PUBLICAÇÕES REFERENTES À TESE	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

RESUMO

Apesar da amplitude de possibilidades terapêuticas, ainda não existe um tratamento ideal para as doenças inflamatórias intestinais (DII), com perfil adequado de eficácia e segurança. Por essa razão, é de grande interesse estudar agentes com poucos efeitos colaterais, que preferencialmente façam parte da dieta, no tratamento/prevenção dessas doenças. Neste contexto, surgiu o interesse em estudar uva, fruta com alto teor de flavonóides e fibras dietéticas, ambas benéficas à saúde. Sabe-se que substâncias antioxidantes e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente o ácido butírico proveniente da fermentação de fibras dietéticas, podem estar envolvidas na prevenção e tratamento de doenças intestinais. O ácido butírico é utilizado como substrato para a reparação do tecido inflamado e inibe fatores pró-inflamatórios; portanto, quantificar a produção desse ácido é 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 que a concentração de 0,5 g de Uva foi a que produziu maiores quantidades de butirato na análise por cromatografia de íons. Após a escolha da concentração da fruta, seguiu-se o estudo *in vivo* utilizando-se a dose de 0,5 g.kg⁻¹. A princípio, verificou-se a ação antioxidante avaliando os níveis de GHS além das atividades das enzimas antioxidantes GSSG-Rd, GSH-Px e SOD em ratos com colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Os animais tratados com Uva apresentaram altos níveis de GSH; as atividades da GSSG-Rd, GSH-Px permaneceram próximas às do grupo sem colite. A atividade da SOD, que também foi drasticamente diminuída no grupo TNBS, foi restabelecida no grupo tratado. O Tratamento com Uva foi capaz de exercer efeito anti-inflamatório intestinal, já que os animais tratados apresentaram menor escore

macroscópico da lesão, além de diminuir alguns mediadores pró-inflamatórios, como (COX-2, NF- κ B e molécula de adesão intestinal MadCAM-1) e a atividade da MPO. A diminuição do dano cólico pela Uva pode ser explicada, em parte, pela diminuição da produção de interleucinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-12) que funcionam como fatores quimiotáticos da inflamação. Por outro lado, a Uva aumentou a produção da citocina antiinflamatória IL-10, sendo que esse aumento foi maior que os valores normais obtidos para o grupo salina. Conclui-se, que a Uva mostrou habilidade em modular enzimas antioxidantes, além de aumentar a produção de IL-10 o que, provavelmente, reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, a expressão de mediadores inflamatórios.

ABSTRACT

Despite the range of therapeutic possibilities, there is still no ideal treatment for inflammatory bowel disease (IBD), with the right profile of efficacy and safety. For this reason, it is of great interest to study agents with little side effect, which preferably form part of the diet and that treats / prevents such diseases. In this context, emerged the interest in studying Grape, fruit with high content of flavonoids and dietary fiber, two compounds that improve the healthy. It is known that antioxidants and short chain fatty acids (SCFA), especially butyric acid, obtained from the fermentation of dietary fiber, may be involved in the prevention and treatment of intestinal diseases. The butyric acid is a substrate for the repair of inflamed tissue and inhibits pro-inflammatory factors; for that reason, to quantify the production of this acid is mandatory, given that the higher the production, the greater the efficiency of the diet for tissue recovery. Therefore, an *in vitro* analysis showed that the concentration of 0.5 g of Grape was the one that produced the greatest amount of butyrate in the analysis by ion chromatography. After choosing the concentration of the fruit, the next step was an *in vivo* study where was used the dose 0,5 g.kg⁻¹. At first, was checked the antioxidant action through the analysis of the levels of GSH and the activity of antioxidants enzymes like GSSG-Rd, GSH-Px and SOD in rats with colitis induced by trinitrobenzenosulfonic acid (TNBS). Animals treated with Grape showed high levels of GSH, the activities of GSSG-Rd, GSH-Px remained close to the group without colitis. The activity of SOD, which was also drastically reduced in the TNBS group, was restored in the treated group. The treatment with Grape was able to exert intestinal anti-inflammatory effect, since the treated animals showed lower scores of the lesion and reduced some pro-inflammatory mediators such as MPO activity, COX-2, NF-κB and the intestinal adhesion

molecule MadCAM-1 expression. The decrease in colonic damage can be explained, partially, by the action of the Grape that decreased the production of pro-inflammatory interleukins (IL-6 and IL-12) that act as chemotactic factors of inflammation. On the other hand, the treatment of Grape increased the production of anti-inflammatory cytokine, such as IL-10, and this increase was higher than normal values showed by the saline group. It can be concluded that the Grape showed ability to modulate the antioxidant enzymes and increased the production of IL-10. Probably, the increased of the levels of this interleukin resulted in a decrease in the production of proinflammatory cytokines and, consequently, in a decrease the expression of inflammatory mediators.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC – Ácido graxo de cadeia curta

CARD – Domínio de recrutamento de caspases (Caspase recruitmeint domain)

CD4 – Grupamento de diferenciação 4

CI – Cromatografia de íons

COX-1 – Ciclooxigenase 1

COX-2 – Ciclooxigenase 2

DAINE – Droga antiinflamatória não esteroideal

DC – Doença de Crohn

EDTA – ácido etilendiaminotetraacético

ERO – Espécies reativas de oxigênio

DII – Doenças inflamatórias intestinais

GlyCAM-1 – Molécula de adesão celular dependente de glicosilação

GSH – Glutathiona total

GSH-Px – Glutathiona peroxidase

GSSG-Rd – Glutathiona redutase

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular-1

I κ B – Subunidade inibidora κ B

I κ K – I κ B quinase

IDM – Índice de dano macroscópico

IBD – Inflammatory bowel disease

IEC – Células epiteliais intestinais

IgG – Imunoglobulina G

IFN- γ - interferon- γ

IL – Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

IRAK – Quinase associada ao receptor da interleucina 1

MadCAM-1 – Molécula de adesão celular a adressina mucosa-1

MAPK – Proteína quinase ativadora de mitógeno

MDP – Muramil dipeptídeo

MHC II – Complexo maior de histocompatibilidade

MPO – Mieloperoxidase

MyD88 – Molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NF- κ B – Fator de transcrição nuclear κ B

NOD – Domínio intracelular de oligomerização de nucleotídeos

PBS – Tampão fosfato salina

PPL – Polifenóis

RCUI – Retrocolite ulcerativa inespecífica

SDS – Dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE – Eletroforese em gel denaturante de poliacrilamida

SOD – Superóxido dismutase

Th – Célula T colaboradora

TLR – Receptor tipo Toll

TNBS – Ácido trinitrobenenosulfônico

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

TRAF-6 – Fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral

VCAM-1 – Molécula de adesão de célula vascular 1

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	2
Tabela 2	35
Tabela 3	46
Tabela 4	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fatores relacionados com a etiologia das DII.....	4
Figura 2. Mecanismos imunológicos da inflamação.	17
Figura 3. Fluxograma do teste <i>in vitro</i>	30
Figura 4. Fluxograma da cromatografia de íons.....	31
Figura 5. Desenho experimental.....	34
Figura 6. Cromatograma dos padrões dos AGCC (acetato, propionato e butirato) usados na quantificação dos mesmos em amostras provenientes da fermentação de Uva 0,5 g.kg ⁻¹ , pelas bactérias cólicas de ratos Unib: WH.....	43
Figura 7. Cromatograma da amostra de Uva (0,5 g.kg ⁻¹) encubada no tempo de 24 horas.	44
Figura 8. Quantificação de butirato (mg.g ⁻¹) proveniente da fermentação de diferentes proporções de ameixa e uva pelas bactérias cólicas de ratos Unib: WH, no tempo de 24 horas.	47
Figura 9. Quantificação de butirato (mg.g ⁻¹) proveniente da fermentação de diferentes proporções de Ameixa e Uva pelas bactérias cólicas de ratos Unib: WH, no tempo de 48 horas.	48
Figura 10: Localização das lesões macroscópicas do intestino de ratos submetidos à indução de colite por TNBS.....	51
Figura 11. Efeito do tratamento com Uva (0,5 g.kg ⁻¹) sobre a atividade da MPO no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS.	52
Figura 12. Efeito do tratamento com Uva (0,5 g.kg ⁻¹) sobre a concentração de GSH no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS	53

Figura 13. Efeito do tratamento com Uva (0,5 g.kg ⁻¹) sobre a atividade da GSH-Px no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS	54
Figura 14. Efeito do tratamento com Uva (0,5 g.kg ⁻¹) sobre a atividade da GSSG-Rd no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS	55
Figura 15. Efeito do tratamento com Uva (0,5 g.kg ⁻¹) sobre a atividade da SOD no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS.	56
Figura 16. Análise representativa Western blot da proteína MadCAM-1 após administração da Uva (0,5 g.kg ⁻¹) em ratos com colite ulcerativa induzida pela instilação do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS, 10 mg/animal).	57
Figura 17. Análise representativa Western blot da proteína COX-1 após administração da Uva (0,5 g.kg ⁻¹) em ratos com colite ulcerativa induzida pela instilação do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS, 10 mg/animal)	58
Figura 18. Análise representativa Western blot da proteína COX-2 após administração da Uva (0,5 g.kg ⁻¹) em ratos com colite ulcerativa induzida pela instilação do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS, 10 mg/animal).	59
Figura 19. Análise representativa Western blot da proteína NF-κB após administração da Uva (0,5 g.kg ⁻¹) em ratos com colite ulcerativa produzida pela instilação do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS, 10 mg/animal)	60
Figura 20. Efeito do tratamento com Uva (0,5 g.kg ⁻¹) sobre a produção de IL-12 no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS	61
Figura 21. Efeito do tratamento com Uva (0,5 g.kg ⁻¹) sobre a produção de IL-6 no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS.	62

Figura 22. Efeito do tratamento com Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) sobre a produção de IL-10 no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS 63

INTRODUÇÃO

1. Doença Inflamatória intestinal

1.1. Aspectos gerais

A doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) constituem duas das doenças inflamatórias intestinais (DII) com etiologia desconhecida, curso crônico e recorrente, além de período de exacerbação dos sintomas (Cho & Abraham, 2007).

A hipótese atual de causa primária de DII é que elas englobam um grupo heterogêneo de doenças com manifestações em comum implicadas em sua fisiopatologia como presença de inflamação, além de fatores genéticos, ambientais e imunológicos (Podolsky, 2002; Cho & Abraham, 2007).

Tanto DC quanto RCUI são caracterizadas por inflamação crônica da mucosa intestinal, que resulta frequentemente em dor abdominal intermitente, febre e diarreia. São diferenciadas pela distribuição da inflamação intestinal com relação à: i) localização geral (RCUI restrita ao cólon e reto enquanto DC pode envolver qualquer porção do trato gastrointestinal), ii) distribuição (contínua em RCUI *versus* irregular e descontínua em DC) e iii) acometimento do tecido (restrito à mucosa e submucosa para RCUI, enquanto DC apresenta envolvimento transmural) (Cho & Abraham, 2007), conforme comparação apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Características diferenciais entre DC e a RCUI (Cho & Abraham, 2007)

DOENÇA DE CROHN	COLITE ULCERATIVA
Desde a boca até o ânus	Reto +/- cólon
Distribuição descontínua	Distribuição contínua
Transmural (afeta todas as camadas do intestino)	Afeta apenas a mucosa
Fístulas e estenoses intestinais frequentes	Estenoses intestinais infrequentes
<i>Anatomia patológica:</i>	<i>Anatomia patológica:</i>
Granulomas	Abscessos de criptas
Agregados linfóides	Depleção da mucina
Fibrose	Distorção glandular

Em ambas, DC e RCUI, podem aparecer manifestações extra-intestinais com acometimento das articulações, dos olhos e da pele, podendo acometer até 40% dos casos (Lichtman & Balfour, 1994). Entre as complicações não autoimunes cabe destacar a aparição de episódios tromboembólicos, anemia e osteoporose (Gasche, 2000; Szulc & Meunier, 2001). Além disso, o risco de câncer aumenta em pacientes com DII, sendo fatores predisponentes: duração e extensão da doença, colangite esclerosante e aparição da doença em idades prematuras; o risco de câncer é maior em pacientes com RCUI do que em pacientes com DC (Pohl *et al.* 2000).

1.2. Epidemiologia

Apesar da incidência e prevalência da DC e RCUI começarem a estabilizar-se em áreas de alta incidência, o número de pessoas é impressionante; são 2,2 milhões de pessoas na Europa e 1,4 milhão nos Estados Unidos (Loftus *et al.*, 2004).

Em geral, as taxas de maior incidência e prevalência (tanto para DC, quanto para a RCUI) estão descritas no norte da Europa, Reino Unido e América do Norte, que são regiões geográficas associadas historicamente às DII. Todavia, existe uma incidência e prevalência crescentes em outras regiões como sul e centro da Europa, Ásia, África e América do Sul (Loftus, 2004). Trabalhos epidemiológicos recentes mostraram que na Índia, Japão e China as DII são doenças emergentes (Ouyang *et al.*, 2005). Na América do Sul estudos mostram aumento dos números de casos diagnosticados nas últimas décadas (Steinwurz, 1998). Estudos apresentaram casos de DC no sudeste do Brasil (Souza *et al.*, 2002) e no interior do estado de Minas Gerais (Gaburri *et al.*, 1998).

1.3. Etiologia

Embora a patogênese das DII ainda permaneça sem explicação, seus mecanismos fisiopatológicos têm sido amplamente investigados e correspondem aos aspectos gerais do processo inflamatório. Estudos recentes sugerem que as causas de DC e RCUI devem estar relacionadas à resposta imune inadequada ou exagerada aos constituintes normais da flora bacteriana intestinal em indivíduos geneticamente predispostos (Hanauer, 2006).

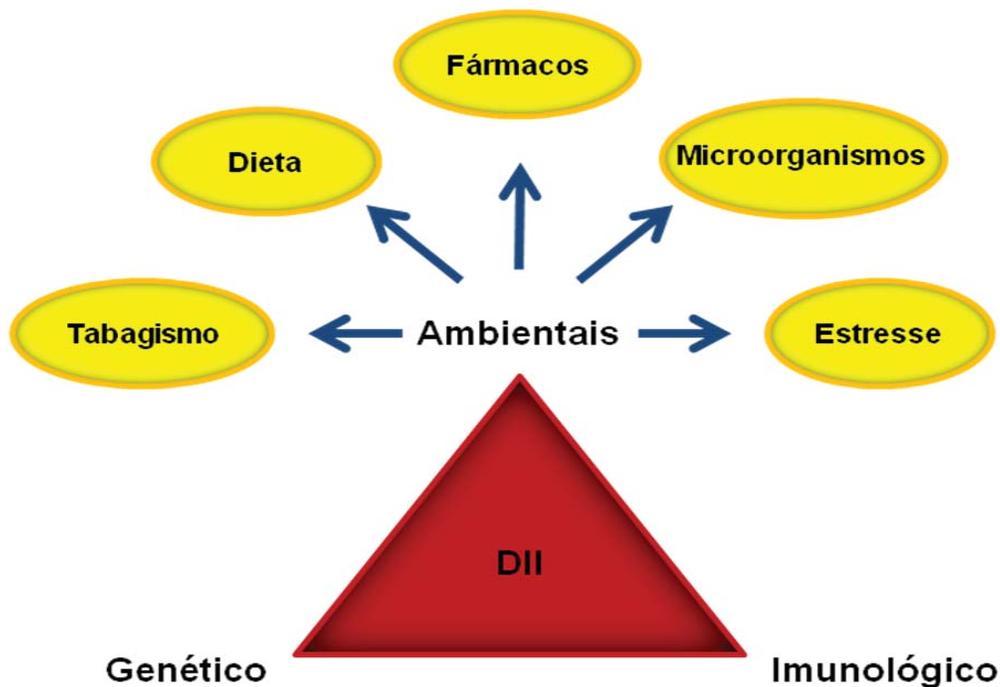


Figura 1. Fatores relacionados com a etiologia das DII. Adaptado de Danese *et al.*, 2004.

A predisposição genética é um fator importante na etiologia das DII e uma história familiar positiva é encontrada em 5-20% dos pacientes com DII (Barrett *et al.*, 2008); além disso, membros familiares de primeiro grau de pacientes acometidos por DII tem risco aumentado para desenvolvimento da doença de 10 a 15 vezes, sendo que esse risco é maior na DC do que RCUI (Orholm *et al.*, 1991).

Vários grupos de pesquisadores tem identificado ao menos 7 *loci* (inflammatory bowel disease 1 – 7, IBD 1 – 7) nos cromossomos que se relacionam com genes susceptíveis, centrando-se nas mutações dos genes NOD2/CARD15 (proteína do domínio de oligomerização nucleotídica 2/ domínio de recrutamento do caspase 15), no MHC II (complexo maior de histocompatibilidade II), nas citocinas e seus respectivos receptores e nas moléculas de adesão (Duerr, 2003; Sartor, 2003; Zheng, 2003). Alguns *loci* têm se

mostrado específicos para a RCUI (como o IBD-2) (Bonen & Cho, 2003) ou para a DC (como o IBD-1) (Cho, 2001; 2003), equanto que outros conferem uma susceptibilidade comum para ambas.

Em geral, as principais associações genéticas nas DII podem ser divididas em genes que contribuem para a resposta imune inata e aqueles que contribuem para resposta imune adaptativa.

Na imunidade inata, a associação da DC com polimorfismo em NOD2 sugere que alterações no reconhecimento e processamento intracelular de componentes bacterianos podem ter um papel importante na imunopatogênese desta doença. Esses polimorfismos foram os primeiros identificados para DC (Ogura *et al.*, 2001). NOD2 é um receptor que reconhece moléculas que contenham uma estrutura específica denominada muramil dipeptídeo (MDP) (Inohara *et al.*, 2003). MDP está presente em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e, quando reconhecido pelo NOD2, ativa as vias de sinalização do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e da proteína quinase ativadora de mitógeno (MAPK) (Kobayashi, 2005).

Na imunidade adaptativa, uma das mais fortes associações genéticas observadas em DC é no gene que codifica o receptor IL-23R. Esse polimorfismo também tem sido relatado em pacientes com RCUI (Duerr *et al.*, 2006). Além disso, a via de sinalização que envolve esse receptor tem demonstrado exercer um papel fundamental na mediação final da inflamação em modelos experimentais de DII.

A influência dos fatores ambientais no desenvolvimento das DII, tanto da DC quanto da RCUI, como consequência da mudança no estilo de vida nos países desenvolvidos é evidente. A “hipótese da higiene” produziu uma mudança fundamental que variou de um estilo de vida “sujo”, com alta exposição à micróbios, para um estilo de vida

“limpo” com baixa exposição (Wills-Karp *et al.*, 2001). Mudanças para ambientes com melhores condições de vida, nutrição, alimentos e água, juntamente com o aumento do uso de antibióticos, produz diminuição progressiva de doenças infecciosas; por outro lado, as mesmas condições induzem paralelamente aumento das doenças alérgicas e autoimunes, incluindo DC e RCUI, devido ao menor desenvolvimento do sistema imunológico em crianças (Bach, 2002).

Os fatores ambientais reconhecidos como de risco para as DII são tabagismo, dieta, fármacos, estresse e microorganismos (Danese *et al.*, 2004).

O mais indiscutível exemplo da influência do ambiente sobre as DII é o tabagismo que apresenta efeito paradoxal em DC e RCUI, apoiando a hipótese de que existem diferentes mecanismos subjacentes à patogênese de cada forma das DII (Thomas *et al.*, 1998). Notavelmente, o hábito do fumo é um fator de risco importante para a DC, aumentando a recidiva doença e a necessidade de cirurgia (Rubin & Hanauer, 2000). Em contraste, pacientes com RCUI a descontinuação do tabagismo aumenta o risco de desenvolvimento da doença, apoiando um papel protetor do tagismo na RCUI. Entretanto, um possível papel do tabagismo passivo, particularmente em crianças, como fator de risco ou de proteção para DC ou RCUI continua a ser questão controversa (Danese *et al.*, 2004).

Como as DII acometem o trato gastrointestinal existe uma possível relação entre componentes da dieta e a fisiopatologia da doença; mecanismos imunológicos são usados para alimentar a relação entre antígenos alimentares e o desenvolvimento de inflamação intestinal. Embora lógica, a hipótese está longe de ser provada e estudos que investigam as relações sugeridas são pouco convincentes, principalmente porque só fornecem evidências indiretas de uma possível causa e efeito entre fatores dietéticos específicos e as DII (Danese *et al.*, 2004). Estudos que visam encontrar uma relação causal entre a dieta e as DII

enfrentam grandes dificuldades, como a definição da composição real de cada dieta. Entre os fatores dietéticos analisados, trabalhos mostraram o açúcar refinado como fator de risco para a DC, mas não para a RCUI (Sonnemberg, 1988), a gordura para RCUI, enquanto as frutas, vegetais e fibras parecem diminuir o risco das DII (Reif *et al.*, 1997).

Dentre os fatores ambientais, fármacos como contraceptivos orais e drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINE) são as duas classes de medicamentos mais estudadas como possíveis causas das DII. O uso concomitante de anticoncepcionais orais pode agravar o risco de eventos tromboembólicos nas DII ativas, mas dados definitivos ligados a estes fatores precisam ser explorados (Alstead, 1999). Por outro lado, se contraceptivos podem afetar a evolução das DII através de seus mecanismos tromboembólicos, não se pode descartar outros efeitos imunomoduladores, como alguns relacionados com a supressão do NF- κ B (Evans *et al.*, 2001). A situação é menos ambígua em pacientes que utilizam DAINES, porque seu uso está claramente associado a um risco maior de DII. Pacientes com remissão clínica podem recair após administração de DAINES (Hanauer & Sandborn, 2002); não obstante, foi sugerido que os inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2) são seguros em pacientes com DII (Mahadevan *et al.*, 2002).

Estresse psicológico tem sido descrito como "um processo em que as exigências ambientais excedem a capacidade adaptativa de um organismo, resultando em alterações psicológicas e biológicas que podem aumentar o risco de uma doença" (Cohen *et al.*, 1997). Acredita-se que esse tipo de estresse desempenhe papel importante nos distúrbios gastrintestinais, especialmente nas DII. Modelos experimentais de colite e estudos de interação neuroimunológica sugerem que o estresse pode agravar o curso das DII (Collins, 2001). A duração do estresse pode também ser importante, já que o risco de exacerbação das condições clínicas como diarreia crônica, fezes sanguinolentas, dor abdominal, perda de

peso, desnutrição e fraqueza, parece estar associada com um estado de estresse prolongado (Levenstein *et al.*, 2000). Esta relação apresenta semelhança com os “cotton-top tamarins”, primatas que vivem enjaulados na América do Sul e desenvolvem colite espontânea quando mantidos presos em clima frio por longos períodos (Maunder *et al.*, 2000). Os mecanismos que explicam a exacerbação da doença pelo estresse são desconhecidos; contudo, provavelmente estão implicados numa complexa interação de fatores nervosos, endócrinos e imunes (Hart & Kamm, 2002).

É possível que agentes infecciosos clássicos sejam a causa das DII, mas as evidências atuais desta hipótese são fracas. Ao longo dos anos, vários microorganismos, como *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia tracomatis*, *Escherichia coli*, *Citomegalovírus*, *Saccharomyces cerevisiae*, além de outros, têm sido propostos como agentes etiológicos nas DII (Chiodini *et al.*, 1984).

Contrastando com evidências de que DC ou RCUI são doenças infecciosas, outros trabalhos mostram que a flora comensal do intestino é o alvo da resposta imune nas DII (Macdonald & Monteleone, 2005). Estudos a partir de modelos animais de DII indicam que a flora normal entérica é necessária para o desenvolvimento da colite experimental. O paradigma "sem bactéria, sem colite" foi criado para ressaltar o papel central da microbiota intestinal na patogênese das DII e é apoiado por uma série de observações clínicas em pacientes com DII como 1) aumento do número de bactérias em estreito contato com a mucosa dos pacientes (Swidsinski *et al.*, 2002); 2) lesões nas DII ocorrem preferencialmente no segmento com maior concentração de bactérias (a válvula íleo-cecal e cólon); 3) procedimento cirúrgico que desvia fluxo fecal impede reaparecimento de DC, enquanto a restauração do fluxo fecal induz a reincidência da doença (D'Haens *et al.*,

1998); 4) a modulação da flora entérica com antibióticos e probióticos atenua o processo inflamatório instaurado.

Por último, a maior parte dos pacientes apresenta reatividade imunológica sistêmica contra antígenos bacterianos no intestino; entre estes, uma flagelina bacteriana relatada como antígeno dominante em pacientes com DC (Lodes *et al.*, 2004; Targan *et al.*, 2005a). Em circunstâncias normais, há uma estreita interação entre a microbiota intestinal e o sistema imune (Macpherson *et al.*, 2004); este complexo está sob controle da tolerância imunológica (Kelly *et al.*, 2005). Como essa tolerância é perdida e uma resposta anormal contra bactérias comensais se desenvolve nas DII ainda não é totalmente claro. No entanto, a recente descoberta de que a DC é geneticamente associada com mutações do gene NOD2/CARD15, cujo produto é uma proteína citoplasmática reconhecidora de bactérias, indica pontos defeituosos nos mecanismos de reconhecimento bacteriano (Girardin *et al.*, 2003).

1.4. Inflamação e DII

A reação mais comum do organismo contra danos causados por agentes externos ou internos é a inflamação. O intestino é particularmente suscetível à inflamação, visto que em condições normais, existe um grau de "inflamação fisiológica" na mucosa. Isso é mantido por um rigoroso controle da resposta imune dirigida a uma enorme variedade de antígenos dietéticos e microbianos, que resulta na presença de um número abundante de leucócitos na lâmina própria (Fiocchi, 2003). O objetivo final de uma resposta inflamatória é sua eficácia na eliminação do agente agressor e, em seguida, seu desaparecimento quando a causa da inflamação for erradicada. Se a inflamação persiste e se torna crônica, uma resposta inadequada é gerada e seus efeitos resultam em anomalias anatômicas e funcionais. Ambos,

DC e RCUI, são processos inflamatórios crônicos do intestino que, por definição, ocorrem devida anomalias do sistema imunológico intestinal. Felizmente, grandes avanços têm ocorrido durante as últimas três décadas na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares mediadores da imunidade na mucosa (Monteleone *et al.*, 2002).

Anormalidades da imunidade intestinal nas DII começaram a ser descritas há várias décadas, no que diz respeito às principais células efetoras da imunidade adaptativa, as células T e B.

Inicialmente, foi descoberto que a produção de anticorpos séricos e nas mucosas, particularmente imunoglobulinas (IgG), estava drasticamente aumentada; além disso, a proporção de classes e subclasses das IgG encontra-se alterada em consequência da inflamação crônica do intestino (MacDermott *et al.*, 1986; Scott *et al.*, 1986). Em paralelo com estes estudos, a possibilidade de alguns destes anticorpos serem auto-anticorpos dirigidos a componentes do intestino começou a ser explorada. Vários estudos sugeriram que anticorpos IgG1, contra proteína estrutural dos colonócitos, eram produzidos seletivamente em RCUI, mas não em DC, o que poderia explicar a patogênese dessa condição (Takahashi *et al.*, 1985). Contudo, a prova definitiva da existência da lesão tecidual ocasionada por uma auto-indução em RCUI ainda não está esclarecida.

Com o reconhecimento das células T como células efetoras e seus mediadores como os principais moduladores da imunidade, o foco da investigação das DII foi desviado para células T *helper*. Um grande número de citocinas tem sido descrito, incluindo aquelas com efeitos pró-inflamatório e imunoregulatório (Podolsky & Fiocchi, 1999). Na DC, células intestinais T CD4⁺ produzem grandes quantidades de interferon- γ (INF- γ) e fatores de transcrição (Neurath *et al.*, 2002), enquanto os macrófagos da mucosa produzem grandes quantidades de IL-12 e IL-18 (Monteleone *et al.*, 1997; Pizarro *et al.*, 1999). Além disso,

em mucosa de pacientes com DC, as células T são resistentes à apoptose e o ciclo que controla a produção dessas células é mais rápido (Ina *et al.*, 1999; Sturm *et al.*, 2004). Em contrapartida, na RCUI as células T produzem grandes quantidades de IL-13 e IL-5, deixando o ciclo que controla sua produção mais lento (Sturm *et al.*, 2004; Fuss *et al.*, 2004).

Com base nestas observações, é aceito que as duas principais formas de DII estão associadas com perfis distintos imunitários que são classificados como resposta bastante típica Th1 em DC e Th2 atípica na RCUI. Mais recentemente, o estudo da imunidade adaptativa nas DII foi direcionado sobre possíveis defeitos de imunorregulação. Existem diferentes tipos de células imunoregulatórias extremamente importantes na prevenção da autoimunidade e repressão da reatividade imune excessiva (Sakaguchi *et al.*, 2005). Nas DII existe diminuição das células reguladoras no sangue e apenas uma expansão moderada no intestino inflamado, sugerindo uma regulação ineficiente durante a doença ativa (Maul *et al.*, 2005).

A descoberta de que mutações do gene NOD2/CARD15, cujo produto é encontrado em células mediadoras da imunidade inata (principalmente macrófagos e células dendríticas), prejudica o reconhecimento de componentes bacterianos (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001) em pacientes com DC, mas aumentou o interesse no papel da imunidade inata nas DII. Células dendríticas são escassas na mucosa do intestino, mas constituem uma população heterogênea de células apresentadoras de antígeno, cruciais para o equilíbrio entre tolerância e a imunidade ativa, controlando assim o tipo de resposta frente à detecção de bactérias comensais (Stagg *et al.*, 2003). Nas DII, células dendríticas da mucosa são ativadas expressando Toll-like receptors (TLR) 2 e 4, que medeiam o reconhecimento de produtos bacterianos modulando a produção de interleucinas (IL) (Hart *et al.*, 2005). Todas

estas características funcionais indicam um proeminente papel das células dendríticas, na patogênese das DII.

Outras células que participam da resposta inflamatória crônica nas DII, incluem células epiteliais, mesenquimais, endoteliais e plaquetas, que realmente exercem muitas das funções tradicionalmente atribuídas às células imunes, tais como produção de citocinas ou expressão de antígenos MHC classe II (Danese & Fiocchi, 2006).

Células epiteliais intestinais (IEC) podem ser alteradas em função das DII; IEC normais têm capacidade apresentadora de antígeno e, preferencialmente, estimulam células supressoras, enquanto que IEC da mucosa com DII induzem células que ativam o processo inflamatório, amplificando a inflamação intestinal (Mayer *et al.*, 1990). Além disso, elas expressam inapropriadamente moléculas co-estimulatórias (Nakazawa *et al.*, 2004), aumentando seus precursores inflamatórios nas DII. Assim, IEC tem importância na patogênese das DII, mas sua compreensão funcional necessita ser melhor investigada (Danese & Fiocchi, 2006).

O envolvimento dos fibroblastos nas DII tem sido tradicionalmente considerado restrito na produção de matriz extracelular na patogênese das DII, como a formação da fibrose intestinal (Stallmach *et al.*, 1992; Pucilowska *et al.*, 2000). No entanto, fibroblastos representam uma fonte importante de metaloproteinases da matriz, uma família de enzimas proteolíticas diretamente responsáveis pela destruição tecidual durante a inflamação (Baugh *et al.*, 1999; Von Lampe *et al.*, 2000). Recentemente, mostrou-se que a ativação de fibroblastos induz o aumento na expressão de moléculas de adesão celular, produção de quimiocinas que, por sua vez, induz a migração de células T locais (Vogel *et al.*, 2004). Portanto, fibroblastos da mucosa devem também ser considerados como participantes ativos nas DII.

O papel das plaquetas nas DII é conhecido há muito tempo, principalmente devido ao seu envolvimento em eventos trombóticos, que são relativamente comuns em pacientes com DC e RCUI (Irving *et al.*, 2005). No entanto, plaquetas têm sido cada vez mais implicadas na resposta imunológica através do papel amplificador na imunidade e inflamação, que é em grande parte mediada via ligante CD40/CD40 (Weyrich *et al.*, 2004). Plaquetas existem, em estado ativado, na circulação periférica de pacientes com DII; os níveis elevados de ligantes CD40 presentes na circulação sistêmica são principalmente originados das plaquetas, aparentemente devido à ativação plaquetária na microvasculatura intestinal inflamada (Danese *et al.*, 2003a). Mais importante ainda é que estudos recentes têm mostrado que plaquetas desencadeiam resposta inflamatória dependente de CD40 na microvasculatura de pacientes com DII (Danese *et al.*, 2003b) relacionando, assim, esse tipo de célula com o processo de patogênese das DII.

1.5. Produção de Citocinas

Em um processo inflamatório como as DII, após ativação dos linfócitos por um antígeno, a IL-12 liberada age de forma autócrina, estimulando a proliferação das células T e potencializando a morte celular por apoptose das mesmas. O INF- γ ativa a produção de IL-12 e IL-18 pelos macrófagos, induzindo a diferenciação e ativação das células Th1, em um ciclo auto-sustentável, dada a produção de maiores quantidades de INF- γ , IL-2 e TNF- β pelas células Th1. O INF- γ não só aumenta a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, facilitando o recrutamento de células inflamatórias, como também ativa os macrófagos que produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8 e IL-12, e metabólitos reativos de oxigênio e nitrogênio. Em indivíduos saudáveis, esta resposta inflamatória se encontra sob controle de citocinas imunomoduladoras, de forma

que estas citocinas pró-inflamatórias se encontram em equilíbrio com seus equivalentes IL-4, IL-10, IL-11 e IL-13. Alterações neste equilíbrio conduzem a um dano no tecido, como consequência de uma inflamação grave, e as manifestações clínicas da enfermidade (Ardizzone & Porro, 2002).

Além da ativação de células T, uma resposta imune na mucosa cólica implica tanto na migração seletiva de células T virgens, desde a circulação periférica até as placas de Peyer, quanto no recrutamento de células T ativadas (efetoras ou de memória) para sítios de inflamação/dano.

O processo de extravasamento das células T virgens, desde a circulação periférica até as placas de Peyer ou aos nódulos linfáticos mesentéricos do intestino, é induzido através da interação específica entre L-seletina associada à célula T e seu receptor de molécula de adesão celular portadora dependente de glicosilação 1 (GlyCAM-1) localizado em células endoteliais especializadas no tecido linfático. Além disso, as células T virgens podem migrar especificamente para a mucosa do intestino através da interação entre a integrina $\alpha 4\beta 7$ associada à célula T e à molécula de adesão celular, a adressina mucosa-1 (MAdCAM-1) da célula endotelial da mucosa (Abbas & Lichtman, 2005).

Se as células T virgens entram em contato com o antígeno ativando-se, estas células T ativadas proliferam, se desfazem de suas L-selectinas e incrementam a expressão, em sua superfície, de moléculas de adesão adicionais a tais integrinas, como a integrina $\alpha L\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$ e CD44 (Abbas & Lichtman, 2005). A progênie destas células T ativadas pode, então, diferenciar-se em células efetoras ou de memória.

Ao contrário das células efetoras, as células de memória podem existir por um longo período de tempo na ausência de um estímulo antigênico (Abbas & Lichtman, 2005). Estes linfócitos não produzem moléculas efetoras, como citocinas, a menos que entrem em

contato novamente com um antígeno. Após a ativação inicial das células T no tecido linfóide, as células efetoras ou de memória ingressam de novo na circulação sanguínea através das vias linfáticas eferentes e do ducto torácico.

Ao voltar para a circulação sistêmica, as células T ativadas não migram, de forma eficiente para o tecido linfóide devido à perda da L-selectina de superfície; porém, estas células são recrutadas preferencialmente, para zonas de infecção/inflamação onde o antígeno original responsável está localizado. Este novo padrão de migração é mediado pela interação da integrina $\alpha 4\beta 1$, integrina $\alpha L\beta 2$ e CD44 associadas ao linfócito com a molécula de adesão de célula vascular 1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 ou 2 (ICAM-1, ICAM-2, respectivamente) (Abbas & Lichtman, 2005).

Assim, as células T efetoras e de memória possuem padrões de migração muito diferentes dos padrões das células virgens. Após o extravasamento, uma célula T de memória ou efetora pode reencontrar-se com seu antígeno. Esta segunda interação com o antígeno ativa os linfócitos para sintetizar e liberar citocinas, desencadeando uma resposta inflamatória. Muitos dos mediadores liberados, como consequência desta resposta, têm papel importante no recrutamento e ativação dos linfócitos, leucócitos fagocíticos como os neutrófilos polimorfonucleados (PMNs) e macrófagos, os quais induzem dano no tecido e, como consequência, manifestações clínicas das DII (Abbas & Lichtman, 2005).

Tanto a DC quanto a RCUI tem uma excessiva resposta imune local caracterizada pela síntese aumentada de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 e TNF α na mucosa (Monteleone *et al.*, 2002). O elemento chave no controle da síntese destas citocinas inflamatórias não é bem conhecido. Candidatos importantes podem ser os fatores de transcrição que se unem a regiões promotoras dos genes. Entre estes, o **NF** parece ser um regulador da expressão induzida por muitos genes de citocinas (por exemplo,

IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF α) em linfócitos, monócitos e células epiteliais do intestino; a atividade do NF- κ B encontra-se aumentada na mucosa de pacientes com DII ativas (Neurath *et al.*, 1998). Além disso, uma grande variedade de citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-18 e TNF α , possui capacidade de ativar o NF κ B. Este feito pode proporcionar um mecanismo de retroalimentação capaz de perpetuar o processo inflamatório no intestino (Figura 2).

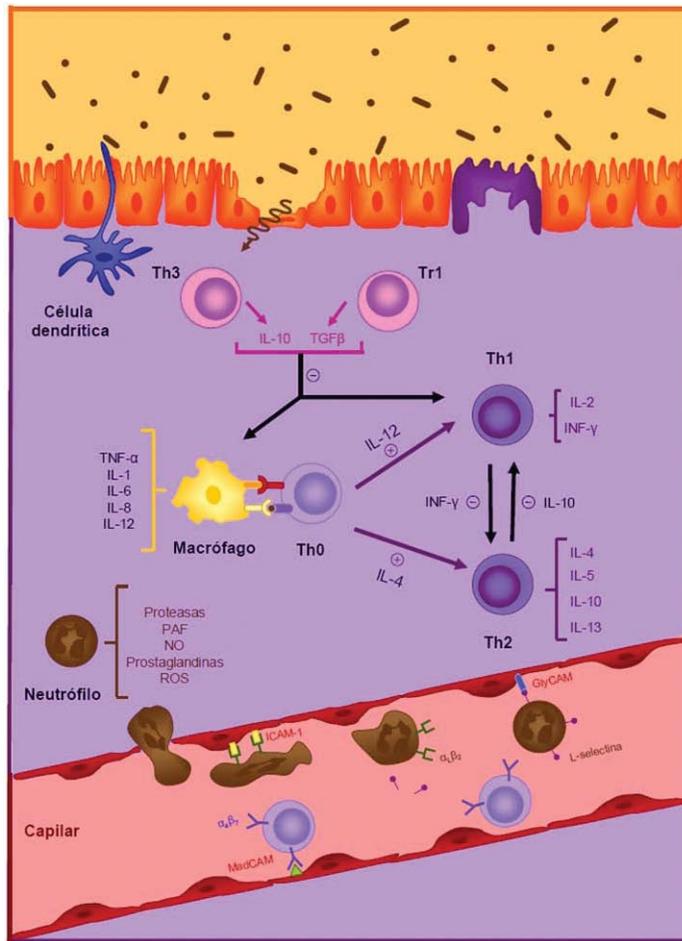


Figura 2. Mecanismos imunológicos da inflamação.

2. Terapêutica das DII

Diversos medicamentos são utilizados com resultados limitados no tratamento das DII. Entre as substâncias mais estudadas, destacam-se derivados dos salicilatos (Seibold, 2003), corticosteróides (Katz, 2004), imunossupressores (Sandborn e Feagan, 2004) e mais recentemente, as terapias anti-TNF- α (Van Assche *et al.*, 2005). No entanto, essas drogas apresentam efeitos colaterais, têm o custo elevado, além de, isoladamente, não serem eficazes sobre todos os parâmetros da doença até agora estudados (Jafri & Pasricha, 2003).

O tratamento deve começar pelo diagnóstico preciso. Este depende do conjunto da história clínica, dos achados de exame físico, endoscópico, radiológico e histológico, assim como dos exames laboratoriais. O resultado desta investigação permite distinguir a DC da RCUI. Entretanto, em aproximadamente 10% dos pacientes, pelo menos inicialmente, isto não é possível (Podolsky 2002).

O tratamento das DII dependerá da gravidade, da extensão e do local envolvido. Um grande número de drogas antiinflamatórias gerais ou seletivas tem sido empregado e, apesar de conseguirem remissão das crises, não cura a doença (Biondo-Simões *et al.*, 2003). O tratamento cirúrgico é reservado para as complicações da DC ou para quando sintomas graves persistem, mesmo após tratamento intensivo com drogas antiinflamatórias ou imunossupressoras (Biondo-Simões *et al.*, 2003).

2.1. Terapia Convencional

O ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) tem boa atividade nos pacientes portadores de RCUI e DC, podendo ser efetivo para manter a remissão da RCUI (Biondo-Simões *et al.*, 2003). Estudos demonstraram que o 5-ASA é funcionalmente ativo, bloqueando a produção de prostaglandinas e leucotrienos, inibindo a quimiotaxia dos neutrófilos, a secreção de substâncias pró-oxidantes e a ativação do NF- κ B (Podolsky, 2002; Kim *et al.*, 2009).

Corticosteróides têm sido empregados inicialmente na remissão da doença. Eles provavelmente atuam pelas mesmas propriedades funcionais relativas aos processos inflamatórios. Parecem controlar a doença de uma maneira complexa, que pode incluir a modulação da fosfolipase A₂, IL-1, TNF- α (Bauditz *et al.*, 2002), molécula de aderência

aos leucócitos endoteliais-1 (ELAM-1) e molécula de aderência intercelular-1 (ICAM-1) e lise dos linfócitos e dos eosinófilos.

Imunossupressores como azatioprina e seu metabólito ativo, 6-mercaptopurina, têm para pacientes com DII, apesar dos riscos aumentados para linfoma (Lewis *et al.*, 2001). Estudos clínicos têm demonstrado que estes agentes são eficientes para manter a remissão, mas são inefetivos no controle dos casos agudos. O mecanismo de ação desta droga permanece desconhecido, mas pode incluir supressão da geração específica de células T. Azatioprina é análoga à purina inibe competitivamente a biossíntese destes nucleotídeos; apresenta dois tipos de efeitos colaterais: “alérgicos” (dose independente): pancreatite, hepatite, febre, diarréia e mal-estar; e “não alérgicos” (presumivelmente dose dependente): leucopenia e algumas formas de hepatite (Biondo-Simões *et al.*, 2003).

Já o metotrexato, antagonista do ácido fólico, tem sido usado para DC, mostrando-se menos útil para a RCUI. O mecanismo de ação parece ser a inibição da IL-1 através do mimetismo molecular com diidrofolato redutase (Fraser *et al.* 2002)

Outro imunossupressor usado na prática médica é a ciclosporina, que pode ser efetiva no tratamento da RCUI grave; age, provavelmente, através do bloqueio da ativação dos linfócitos, inibindo a transcrição de IL-2 e do seu receptor nos linfócitos T auxiliares, além de inibir também a produção de fatores que ativam as células B e estimulam a produção de IFN- γ pelas células T auxiliares.

2.2. Terapia não convencional

Novas abordagens terapêuticas tem emergido nos últimos anos como resultado do avanço na compreensão da patogênese das DII. Estas novas terapias, dirigidas aos mecanismos da doença, têm a finalidade de tornar mais eficazes e mais seguros os tratamentos para as DII (Nakamura *et al.*, 2008). Existem diversos agentes anti-TNF desenvolvidos, mas apenas três têm sido eficazes em DC: infliximabe, adalimumabe e certolizumabe (Gomollón & López, 2008). Suas estruturas moleculares são diferentes: Infliximabe e adalimumabe são anticorpos monoclonais que diferem porque o primeiro é quimérico (75% camundongo e 25% humana) e o segundo somente humano; enquanto, Certolizumabe é um fragmento Fab específico, anti-TNF, combinado com duas moléculas de polietilenoglicol. Todos eles compartilham um mecanismo de ação geral que consiste em ligar-se ao TNF, solúvel e encontrado na membrana plasmática, inibindo sua ação pró-inflamatória direta e mediada pela indução de outras citocinas (principalmente IL-6) (Gomollón & López, 2008). Além deste efeito em comum, estes agentes exercem outras funções potencialmente antinflamatórias. Nesse sentido, infliximabe e adalimumabe são capazes de induzir apoptose em diferentes tipos celulares. O uso do Infliximabe em pacientes com DC já foi aprovado por órgãos competentes (Nakamura *et al.*, 2008) e para a RCUI (Rutgeerts *et al.*, 2005). Para reduzir possíveis eventos alérgicos em humanos, o Infliximab foi submetido à tecnologia recombinante, tornando-se menos imunogênico (Drewe e Powell, 2002).

Há poucas informações a respeito do transplante de medula óssea e células-tronco. Um trabalho envolvendo seis pacientes com DC e leucemia que foram tratados com transplante de medula alogênico foi publicado em 1998 (Lopez-Cubero *et al.*, 1998). Quatro dos cinco pacientes acompanhados permaneceram livres da DC (um paciente

morreu de sepse e um apresentou recidiva da doença). Dois pacientes com RCUI submetidos ao transplante alogênico de células-tronco apresentaram remissão por 4 anos após o transplante. Nem todos os pacientes relataram remissão das DII, assim, o resultado do benefício a longo prazo não está estabelecido, uma série de questões permanecem antes que o transplante se torne uma forma aceitável de tratamento. (Summers, 2007).

Visilizumabe é um anticorpo monoclonal anti-CD3 que induz apoptose em células T CD3; uma vez administrada, o número de células T em circulação diminui drasticamente dentro de horas. Ensaio clínico em pacientes com visilizumab com RCUI têm demonstrado benefício clínico (Plevy *et al.*, 2003; Targan *et al.*, 2005b) e embora a liberação de citocinas seja conhecida como efeito colateral na maioria dos pacientes, resultados preliminares sugerem sua utilização clínica como uma alternativa para ciclosporina nos pacientes com RCUI (Nakamura *et al.*, 2008).

Basiliximabe é um anticorpo monoclonal anti-CD25 que bloqueia a cadeia α do receptor IL-2 na superfície de células T ativadas; em estudos controlados, esse fármaco mostrou ter eficácia no tratamento de pacientes com RCUI de intensidade moderada a grave (Creed *et al.*, 2006).

Já o derivado de inibidores da fosfodiesterase tiazolo (PDE-4), Tetomilast é capaz de inibir as funções de neutrófilos ativados; seus efeitos terapêuticos foram demonstrados em diversos modelos animais das DII (Nagamoto *et al.*, 2006), sugerindo um efeito inibitório sobre os processos inflamatórios em RCUI humana. Um ensaio multicêntrico (randomizado e controlado) mostrou que Tetomilast não apresentou benefício significativo no tratamento dos pacientes com RCUI (Schreiber *et al.*, 2007) e novos ensaios clínicos seriam necessários para esclarecer esta questão.

Um estudo multicêntrico (randomizado e controlado com placebo) recente mostrou que anticorpo monoclonal para integrina $\alpha4\beta7$, o MLN02, tem eficácia na indução da remissão em pacientes com RCUI (Feagan *et al.*, 2005); este resultado sugeriu que MLN02 seria uma alternativa atraente para pacientes que não respondem ao 5-ASA ou corticóides. Entretanto, os dados sobre a eficácia do MLN02 no tratamento de pacientes para os quais a terapia com corticosteróides é ineficaz, não estão disponíveis até o momento.

Já o RDP58, um decapeptídeo imunomodulador capaz de inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, interrompe a formação do complexo TRAF6-MyD88-Irak responsável pela ativação de várias vias de sinalização intracelular envolvidas na inflamação. Como resultado, o decapeptídeo inibe a produção de várias citocinas, incluindo TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6 e IL-12 (Iyer *et al.*, 2002). Um estudo randomizado recente mostrou que RDP58, numa dose relativamente alta, foi eficaz na RCUI de intensidade moderada (Travis *et al.*, 2005) e, embora o mecanismo de ação deste agente seja atraente, outras investigações seriam úteis para seu uso clínico.

2.3. Antioxidantes

Estudo realizado por Reimund *et al.* (1998) em humanos analisou a influência de três antioxidantes (butirato de hidroxianisol, tetrahidropapaverolina e ácido nordihidroguaiarético) na inibição de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8; o efeito inibidor de citocinas pelos antioxidantes mostrou-se mais pronunciado na RCUI do que na DC.

A atividade farmacológica proposta 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

número elevado de radicais livres, muito reativos, conhecidos como Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). As ERO são resultantes do metabolismo incompleto do oxigênio molecular (O_2), gerando ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^\cdot), que possuem 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 & Grishan, 1996).

Na colite experimental, há processos inflamatórios típicos geradores de radicais livres; por outro lado, a administração de enzimas antioxidantes reduz a severidade da inflamação cólica (Segui *et al.*, 2004). Dessa última alternativa, emerge a base para utilização de polifenóis nas doenças inflamatórias intestinais.

Plantas, bem como outros organismos unicelulares e multicelulares, contêm moléculas orgânicas ubíquas (aminoácidos, carboidratos e ácidos graxos) denominadas metabólitos primários essenciais para estrutura básica e metabolismo da célula. Esses compostos também servem como substrato para a síntese substâncias químicas chamadas metabólitos secundários, os quais acumulam-se em menores concentrações e apresentam distribuição diferente para cada espécie. Após a ingestão, alguns metabólitos secundários

de plantas comestíveis interagem benéficamente, agindo como coativadores enzimáticos; a ingestão insuficiente deles pode estar relacionada a algumas doenças (Balandrin *et al.*, 1985; Eastwood, 2001).

Polifenóis (PPL), uma classe desses metabólitos, estão sendo reconhecidos como fitoconstituintes que promovem benefício à saúde; vários modelos que mimetizam doenças inflamatórias humanas são atenuados pelos PPL, já que estes compostos são potentes “varredores” de radicais livres *in vitro*, mas estudos atuais sustentam que sua atividade antiinflamatória *in vivo* ocorre a partir da interação com proteínas envolvidas com a transdução de sinal e a expressão gênica (Scalbert *et al.*, 2005; Bravo, 1998, Kris-Etherton *et al.*, 2004, Heiss *et al.*, 2005; Barnes, 1997).

Um importante alvo da ação dos PPL *in vivo* é o fator de transcrição nuclear- κ B (NF κ B); normalmente ele é inativado pelo inibidor citoplasmático κ B (I κ B) e é liberado dessa associação por intermédio das quinases ativadas I κ B (I κ Ks). Espécies reativas de oxigênio acionam cascatas de transdução de sinal que convergem para fosforilação das I κ K e o NF κ B liberado é então translocado para o núcleo onde promove a expressão de genes inflamatórios como TNF- α , óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ciclo-oxigenase (COX-2) e ICAM todos induzindo ativação de linfócitos, monócitos / macrófagos e células endoteliais (Karin *et al.*, 2004). Embora proteja as células parenquimatosas de apoptose, NF κ B é considerado como alvo no tratamento de diversas doenças inflamatórias (Karin *et al.*, 2004; de la Lastra & Vilegas, 2005).

Devido à inibição da fosforilação do I κ K e/ou impedimento da degradação proteasomal do I κ B, numerosos polifenóis atenuam a ativação do NF κ B *in vivo* em doenças inflamatórias (Scalbet *et al.*, 2005; Bravo, 1998).

Dentre os PPL com atividade antiinflamatória estão resveratrol (Baur *et al.*, 2006; Frei *et al.*, 2003), epigallocatequina galato (Joe *et al.*, 2004), curcumina (Bengmark, 2006; Dias *et al.*, 2005) e quercetina (Delhalles *et al.*, 2004). Curiosamente, as propriedades antiinflamatórias dos DAINEs e salicilatos também são parcialmente imputáveis à inibição da IκK (Kaga *et al.*, 2005). Como os PPL parecem não inibir a COX-1 constitutiva, que modula a síntese de prostaglandinas, eles podem ser agentes antiinflamatórios mais seguros.

Estudos utilizando modelos de colite aguda ou crônica induzida pela administração de sulfato dinitrobenzenosulfônico (Oz *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005), trinitrobenzenosulfônico (Zhang *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005; Sugimoto *et al.*, 2002), adição de dextrana na água (Kwon *et al.*, 2005; Camuesco *et al.*, 2004) ou animais *knock-out* para interleucina -2 (IL-2^{-/-}) (Jian *et al.*, 2005) utilizaram PPL para avaliar sua atividade biológica sobre a colite experimental. Resveratrol, epigallocatequina galato, curcumina e quercetina reduziram a mortalidade, atenuaram danos cólicos (diarréia, fezes sanguinolentas) e extra cólicos (perda de peso), além de diminuir infiltrado inflamatório, adesão, atividade da mieloperoxidase, TNF-α, IL-1β, IL-12, iNOS (Martin *et al.*, 2006; Mazzon *et al.*, 2005; Oz *et al.*, 2005; Varilek *et al.*, 2001; Jian *et al.*, 2005; Sugimoto *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Assim, PPL de origem vegetal podem seguramente contribuir para a redução dos sinais inflamatórios existentes nas DII.

Uvas (*Vitis vinifera* L.) contêm altas concentrações de PPL, especialmente flavonóides. A quantidade e composição dos compostos biologicamente ativos presentes na uva varia muito de acordo com as variedades, grau de maturação, condições sazonais, área de produção e rendimento do fruto (Girar & Mazza, 1998). Os principais polifenóis da *Vitis vinifera* L. são as antocianidinas em uvas roxas e flavan-3-óis no caso das uvas brancas; além disso, uvas roxas contêm mais polifenóis totais que as brancas. As sementes e cascas

das uvas são importantes fontes de flavonóides; sementes possuem ainda grande quantidade de proantocianidinas ou taninos condensados e sua composição química é muito mais diversa que aquela das cascas da fruta (Girar & Mazza, 1998). Além disso, fibra dietética é a principal componente das cascas e sementes da uva (*Vitis vinifera*) (Jiménez *et al.*, 2008; Igartuburu *et al.*, 2001; Goñi, 2004); representa cerca de 74% do peso das cascas e a maior fração de fibras é hemicelulose (30,7% em peso da fibra dietética), seguida por celulose (cerca de 6%) (Igartuburu *et al.*, 1987).

A ameixa (*Prunus domestica* L.) tem sido utilizada como alimento saudável (Stacewicz-Sapuntzakis, 2001). Em particular, a atividade antioxidante da ameixa é muito alta em comparação com outras frutas e vegetais dada sua capacidade de “varrer” espécies reativas de oxigênio (Agricultural Research Service, 1999). Os compostos fenólicos com propriedades antioxidantes na ameixa são isômeros do ácido cafeoilquínico como os ácidos neoclorogênico, criptoclorogênico, clorogênico (Nakatami *et al.*, 2000), todos com atividade benéfica contra ERO's e espécies reativas de nitrogênio (Nakatami *et al.*, 2000).

2.4. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Fibras dietéticas apresentam propriedades e efeitos fisiológicos importantes no trato gastrintestinal, como produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), necessários à manutenção da função normal dos colonócitos (Galvez *et al.*, 2005); o butirato é a principal fonte de energia dos colonócitos, diferentemente de outras células que utilizam a glicose como fonte de energia (Ahmad *et al.*, 2000).

AGCC (principalmente acetato, propionato e butirato) são produtos finais da fermentação dos carboidratos da dieta por bactérias anaeróbicas no intestino grosso e principais fonte de energia dos colonócitos, regulando seu desenvolvimento e diferenciação

(Cummings, 1981). Além disso, estão AGCC intimamente relacionados às propriedades normalizadoras da função da barreira intestinal, com efeitos tróficos sobre o epitélio intestinal, o que é de grande importância para recuperação da inflamação e redução do risco de realocação bacteriana durante a alteração da barreira intestinal (Urao *et al.*, 1999). Em resumo, o butirato tem capacidade de induzir a produção de enzimas (por exemplo, transglutaminases) que promovem a restauração da mucosa (D'Argenio *et al.*, 1999). Colônócitos de pacientes com DII apresentam algum defeito específico na oxidação dos AGCC, mais precisamente do butirato (Ahmad *et al.*, 2000). Desta forma, uma maior disponibilidade destes AGCC pode melhorar a integridade da mucosa do cólon e, com isso, contribuir para a redução da inflamação (Kanauchi *et al.*, 1998).

OBJETIVOS

1. Testar, *in vitro*, diferentes combinações de fibras de Ameixa (*Prunus domestica* L.) e Uva (*Vitis labrusca* L) para avaliar a produção dos ácidos graxos de cadeia curta;
2. Avaliar a ação da preparação com maior produção de AGCC em animais com colite induzida por TNBS com relação a:
 3. Níveis de GSH
 4. Atividades das enzimas antioxidantes (GSH-Px, GSSG-Rd e SOD);
 5. Mediadores envolvidos na inflamação (MPO, COX-2, NF- κ B e MadCAM-1);
 6. Produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-12) e antiinflamatória (IL-10).

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Ensaio *in vitro*

Na etapa preliminar, *in vitro*, várias combinações das fibras dietéticas foram hidratadas por PBS pH 7,4 acrescido de Oxyrase[®] por 12 a 16 horas a 4° C. Após este tempo, 10 ml de suspensão fecal de rato (suspendido em PBS pH 7,4 acrescido de Oxyrase[®]) na proporção de 1:6 foram adicionados às fibras previamente hidratadas e incubadas por 24 horas, a 37° C, sob suave agitação. Nos tempos 0, 12 h, 24 h e 48 h foram retiradas alíquotas de 2 ml às quais foi adicionado 1 mL de solução de sulfato de cobre (10 g/L) para inibir o crescimento microbiano. As amostras foram estocadas em freezer (-20° C) para posterior quantificação dos AGCC (Velázquez *et al*, 2000). Estes compostos foram analisados por Cromatografia de Íons (CI), com a finalidade de avaliar quais eram as preparações que produziram mais AGCC, quando comparadas às curvas dos padrões dos ácidos butírico, propiônico e acético, usando um método desenvolvido pelo Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota e Jailson Dias do Instituto de Química da UNICAMP juntamente com nosso grupo de pesquisa.

Num primeiro momento foram usadas fibras de Ameixa (*Prunus domestica* L.) combinada com fibras de Uva (*Vitis labrusca* L.).

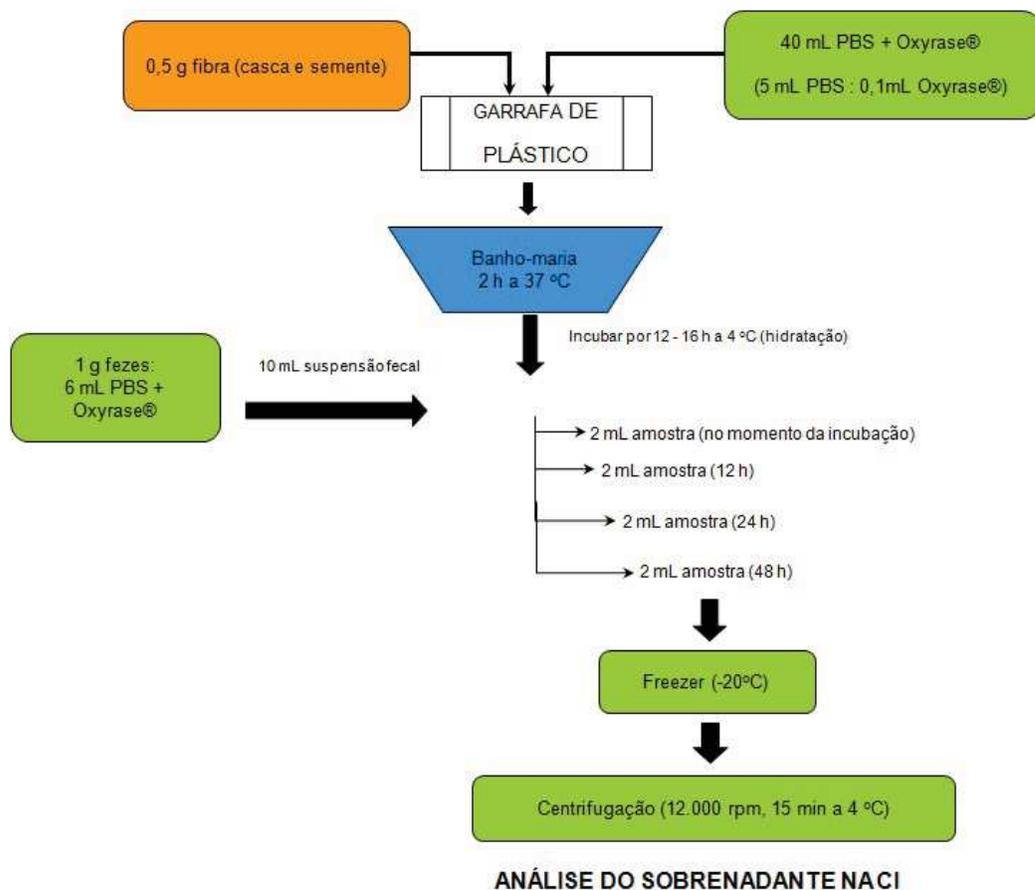


Figura 3. Fluxograma do teste *in vitro*

3.1. Cromatografia de íons

Para as quantificações dos AGCC as amostras foram centrifugadas a 2800 rpm e o sobrenadante usado para a análise dos AGCC.

As análises cromatográficas foram realizadas num cromatógrafo modular (Metrohm[®], Switzerland) composto por uma unidade de isocrática modelo 818 IC e interface 830 IC. O volume de injeção da amostra foi de 10 µL, em uma coluna analítica Metrosep Organics Acids (Metrohm[®]), com 100 mm de comprimento e diâmetro de 7.8 mm. Detecção obtida por um detector condutimétrico – 819 IC com volume interno de 1.0 µL. A condutividade do eluente foi suprimida através do uso de LiCl 50 mM (Merck,

Darmstadt, Germany). A aquisição e tratamento de dados foram obtidos através do software IC Net, versão 2.3 (Metrohm[®]) como apresentada na Figura 4.

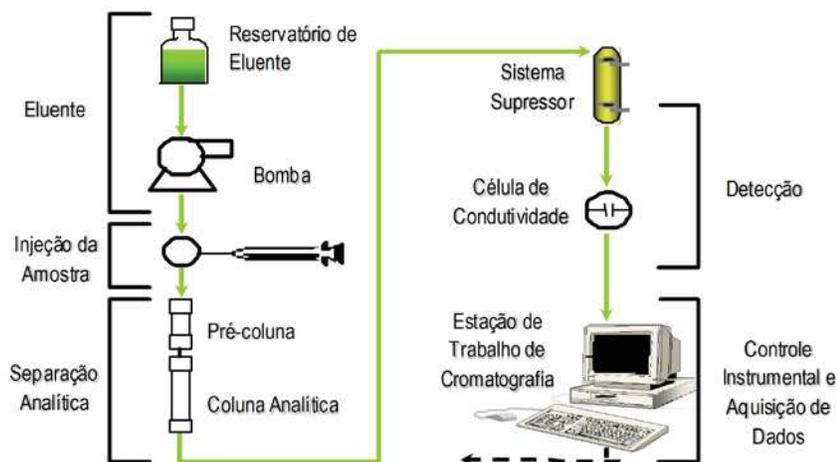


Figura 4. Fluxograma da cromatografia de íons

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada, ultrapura tipo I, filtrada por membrana de 0,22 μm obtida com sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). O eluente H_2SO_4 0,5 mM (Merck, Darmstadt, Germany) foi purgado em ultrassom durante 30 minutos para remoção dos gases dissolvidos (principalmente CO_2). As soluções padrão dos analitos acetato de sódio, propionato de sódio e butirato de sódio (Acros Organics, Nova Jersey, USA) foram preparadas através da diluição das soluções padrão multielementar a 10 mM, sendo a curva de calibração preparada a partir dessa mesma solução.

Para identificação dos ácidos graxos foi utilizada comparação dos tempos de retenção dos picos dos cromatogramas das amostras com aquela dos padrões de ácidos orgânicos.

Primeiramente foi realizado o teste *in vitro* com várias combinações de diferentes fibras. A combinação que apresentou o melhor resultado, ou seja, produziu mais AGCC, principalmente butirato, constituiu a dieta alimentar de ratos com colite ulcerativa induzida por TNBS.

3.2. Ensaios *in vivo*

Os protocolos experimentais utilizados nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP (Protocolo n°1188-1).

3.2.1. Fibras Alimentares

Uva (*Vitis labrusca* L) orgânica da variedade “Isabel” foi triturada em liquidificador, sem acrescentar água, centrifugada (para separar o suco da casca e semente) e, em seguida, apenas cascas e sementes foram liofilizadas. A ameixa (*Prunus domestica* L) também orgânica teve sua semente retirada e as partes (casca e polpa) também foram trituradas e liofilizadas. A melhor combinação de fibras, após teste *in vitro* para detecção de AGCC, foi re-suspensa em água e administrada, por gavagem, aos animais. As fibras foram estocadas em recipientes opacos e conservadas em freezer a -20° C.

3.2.2. Animais de experimentação

Foram utilizados ratos machos Unib: WH (150 - 250 g), provenientes do Centro Multidisciplinar para investigação Biológica UNICAMP (CEMIB), aclimatados às condições do laboratório por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, com temperatura ($23 \pm 2^\circ$ C) e ciclos claro/ escuro (12 h/ 12h) controlados, alimentados com ração nuvital (Nuvilab) e água *ad libitum*.

Modelos animais de inflamação intestinal são indispensáveis na compreensão da patogênese da DC e RCUI, as duas principais formas das DII em seres humanos (Wirtz *et al.*, 2007) e o modelo ideal para o estudo deve mimetizar a maior parte dos aspectos da doença em humanos.

3.2.3. Indução da colite experimental por TNBS

No modelo de colite empregado, seguiu-se o desenho experimental descrito na figura 5. Os ratos foram separados em três grupos (n = 8); dois controles (Salina e TNBS) receberam a dieta padrão; o outro, tratado, recebeu suplemento de Uva (0,5 g.kg⁻¹) por 3 semanas. Duas semanas após iniciar o experimento, os ratos permaneceram 24 horas de jejum e foram submetidos à indução de colite pelo método descrito por Morris *et al.* (1989). Sob anestesia com halotano, os animais receberam 10 mg de TNBS dissolvido em 0.25 mL de etanol 50% (v/v) por meio de uma cânula de Teflon inserida 8 cm através do ânus. Durante e após a administração do TNBS, os ratos permaneceram de cabeça para baixo até a recuperação da anestesia. Ratos do grupo salina receberam 0.25 mL de solução salina (intra-retal). Todos os animais tiveram parâmetros comportamentais, peso corpóreo e consistência das fezes verificados diariamente e sacrificados uma semana após indução da colite.

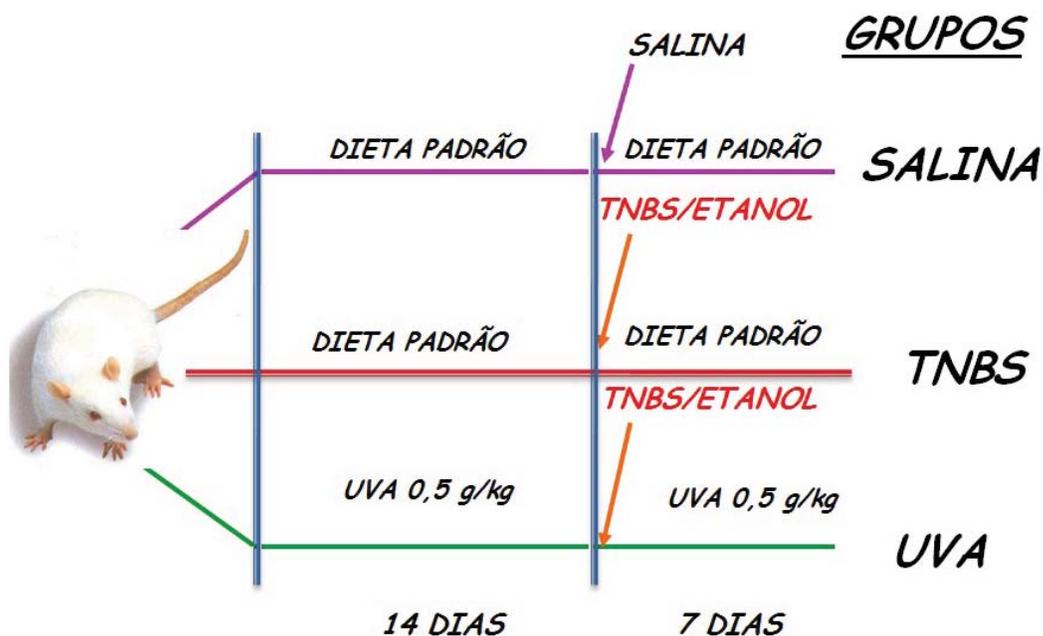


Figura 5. Desenho experimental

3.2.4. Avaliação macroscópica das lesões

Cada animal teve 10 cm do cólon distal removido, cortado longitudinalmente, lavado com salina fisiológica (para remoção de resíduos fecais) e pesado. O score da inflamação macroscópica foi avaliado baseando-se no aspecto macroscópico do cólon (score 0 – 10) onde atribui-se 0 (cólon normal), 1 (hiperemia localizada sem úlceras), 2 (ulceração sem hiperemia nem espessamento da parede intestinal), 3 (ulceração com um ponto de inflamação), 4 (dois ou mais pontos de ulceração e inflamação), 5 (zonas com grandes danos, inflamação e ulceração com uma extensão maior que 1 cm), 6-10 (zonas com grandes danos e extensão maior que 2 cm; adiciona-se 1 ponto, até 10, para por cada cm acometido como apresentado na Tabela 2. A presença de diarreia (score 0 - 1) foi avaliada de acordo com critérios de Bobin-Dubigeon *et al.* (2001). Além disso, para avaliar o estado inflamatório dos animais, inicialmente, foram utilizados dados como comprimento

da lesão no cólon e espessamento da parede do intestino, verificado através da relação peso/comprimento do mesmo. O peso dos animais foi mensurado durante os 21 dias de experimento.

Tabela 2. Escala de avaliação do índice de dano macroscópico (IDM) no modelo de colite experimental induzido por TNBS em ratos.

0 pontos	Cólon normal
1 ponto	Hiperemia localizada sem úlcera
2 pontos	Ulceração sem hiperemia e sem espessamento na parede intestinal
3 pontos	Ulceração com um ponto de inflamação
4 pontos	Dois ou mais sítios de ulceração e inflamação
5 pontos	Grandes zonas de danos, inflamação e ulceração com uma extensão maior que 1 cm
6 – 10 pontos	Grandes zonas de danos tecidual com extensão maior que 2 cm, adicionando 1 ponto (até 10) para cada cm adicional de extensão

Por último, o cólon foi dividido em fragmentos longitudinais distintos que, a exceção de um, foram congelados imediatamente a -80° C para posterior realização das determinações bioquímicas. O segmento destinado à determinação da glutathiona total foi congelado com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5% (p/v), com objetivo de inibir sua degradação pela γ -glutamyl transpeptidase (Anderson, 1985). Todas as análises bioquímicas realizadas nas semanas imediatamente seguintes ao sacrifício dos animais.

3.2.5. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) cólica

A atividade da mieloperoxidase foi determinada através do método descrito por Krawisz *et al.* (1984). A enzima MPO é utilizada como marcador da infiltração de neutrófilo; entretanto, essa enzima não é específica destes fagócitos.

Os fragmentos do cólon foram dispostos sobre uma placa de Petri gelada e picados com uma tesoura por 15 segundos. Em seguida, a amostra foi homogeneizada em tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) a 0,5% (p/v) em tampão fosfato salina (50 mM, pH 6,0) com diluição final de 1:20 (p/v) em homogeneizador até que a amostra obtivesse aspecto uniforme. O HTAB atua como detergente facilitando a liberação da enzima MPO dos grânulos de azurófilos dos neutrófilos, onde se encontra armazenada. O homogenato foi submetido ao ultrassom por 10 segundos a um triplo processo de congelamento e descongelamento, que facilita a ruptura das estruturas celulares e, em consequência, a liberação da enzima. A amostra foi centrifugada a 7000 G, durante 10 minutos, a 40° C. O próximo passo foi a determinação da atividade da MPO seguindo a cinética da reação frente à água oxigenada. Numa placa de Elisa, foram colocados 50 µL do sobrenadante e 150 µL de reativo de coloração composto por cloridrato de o-dianisidina (0,167 mg/mL) e peróxido de hidrogênio (0,066%), em tampão fosfato (50mM, pH 6,0); a absorvância foi determinada a 450 nm. A atividade da enzima foi calculada por interpolação em curva padrão, realizada com MPO procedente de neutrófilos humanos. Uma unidade de MPO é definida como a quantidade necessária para degradar 1 mmol/minuto de peróxido de hidrogênio 25° C. Os resultados foram expressos como U/g de proteína.

3.2.6. Determinação dos conteúdos cólicos de glutathiona total (GSH)

A GSH foi determinada acordo com o método da redução cíclica do DTNB-GSSG, descrita por Akerboom & Sies, 1981. Essa metodologia se baseia na oxidação da glutathiona reduzida (GSH) presente em uma amostra, à sua forma oxidada (GSSG), mediante incubação da amostra com o ácido 5,5'-ditiobisnitrobenzoico (DTNB); uma vez reduzido, a amostra adquire uma coloração amarela que pode ser detectada espectrofotometricamente. O GSSG gerado é reduzido pela ação da enzima glutathiona redutase (GSSG-Rd) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). O GSH resultante se oxida de novo, dando lugar a um ciclo contínuo no qual a velocidade de redução do DTNB (com o acréscimo da absorbância) é proporcional à quantidade total de glutathiona.

Para efetuar esta determinação foram utilizados fragmentos de colon congelados em solução de TCA 5% (p/v). Esses fragmentos foram automaticamente homogeneizados com auxílio do homogeneizador automático Polytron (Kinematica AG, Lucerne, Suíça). Em seguida, o homogenato foi centrifugado, a 2000 G, durante 5 minutos a 4° C. Para determinação do GSH foram misturados, nesta ordem, 20 µl de sobrenadante, 5 µl de tampão fosfato salina (PBS) com ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Ao PBS-EDTA uma solução aquosa contendo fosfato sódico 143 mM e 6,3 mM de EDTA pH 7,5, foram adicionados 140 µl de solução de β-NADPH (0,298 mM) em PBS-EDTA e 20 µl de DTNB (6 mM), em placa com 96 pocinhos, que foi incubada a 35° C durante 5 minutos. Depois de adicionar 15 µl de uma solução 266 UI/mL de GSSGrd (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) em PBS-EDTA, foi efetuada uma leitura da absorbância no dispositivo ELISA Apollo LB 912 (Berthold Technologies GmbH & Co, Bad Wildbad, Germany) a 412 nm. A concentração de GSH foi calculada por interpolação na curva padrão realizada com GSH e os resultados foram expressos como nmol de GSH /mmol/g de proteína.

3.2.7. Atividade da glutathiona peroxidase (GSH-PX)

GSH-Px teve sua atividade determinada de acordo com o método de Yoshikawa *et al.* (1993). Às amostras intestinais foram adicionados 25 mM de H₂O₂, 10 mM de Glutathiona Reduzida, 0,8 mM de NADPH e 1 U de enzima glutathiona redutase em PBS (0,1 M), pH 7,4. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 365 nm, dentro de 1 a 10 minutos. Os resultados foram expressos em nmol/min por mg de proteína.

3.2.8. Atividade da glutathiona redutase (GSSG-Rd)

Para a determinação da atividade da GSSG-Rd utilizou-se o método de Carlberg & 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 adicionados às amostras intestinais. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 365 nm. A atividade da enzima foi expressa como nmol NADPH consumido/min/mg de proteína para coeficiente de extinção NADPH é 6,22 M⁻¹ cm⁻¹.

3.2.9. Determinação da concentração de proteína total

A proteína total das amostras cólicas foi quantificada pelo método de Bradford (1976), que se baseia no fato de que o corante azul brilhante de coomassie G coexiste em duas formas de cores diferentes: vermelha e azul. Assim, a forma de cor vermelha é rapidamente convertida na outra forma, de cor azul, através da ligação da parte cromófora do corante à proteína. A curva de calibração foi feita a partir da diluição de uma solução estoque de albumina de soro bovino (BSA) entre 0 a 200 µg/ml; a estas diluições adicionou-se a solução contendo o corante e a leitura da absorbância foi feita em 600 nm, os dados foram expressos em µg/g de tecido.

3.2.10. Avaliação da expressão de MadCAM-1, COX 1, COX 2 e NF- κ B

A mucosa do cólon foi retirada, homogeneizada e centrifugada a 12000 rpm, 4°C por 15 minutos. A proteína total foi quantificada pelo método de Bradford (1976). Valores determinados de proteína (70 μ g) foram aplicados em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e submetidos à eletroforese, com solução tampão adequada (Trisma base 25 mM, glicina 1,92 mM, SDS 1%). O SDS-PAGE foi submetido a 80V até o final do gel de resolução “resolving”. A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em equipamento de eletrotransferência, com as membranas embebidas em solução tampão de transferência (Trisma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%), mantidas em voltagem constante de 350 mV, por 2 horas, em geladeira. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora (tampão PBS 0,05 M, pH 7.7, Tween 20 0.05%, leite em pó desnatado a 5%) por uma hora, a fim de diminuir a ligação inespecífica de proteínas.

Em seguida, as membranas foram submetidas a três lavagens (tampão PBS 0,05 M, pH 7.7, Tween 20 a 0.05%), em intervalos de 10 minutos. A membrana foi incubada a 4° C, durante uma noite, usando anticorpos específicos contra MadCAM-1 (1 μ g/mL, código MAB 993), NF- κ B (1 μ g/mL, código MAB 2697) da R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA. O mesmo procedimento foi adotado para anticorpos de COX-1 (1:200, código M-20) e COX-2 (1:400, código M-19), ambos da Santa Cruz Biotechnology Califórnia USA.

Na manhã seguinte, a membrana de nitrocelulose foi lavada em tampão básico por 40 minutos e, em seguida, incubada à temperatura ambiente, por 1h, com anticorpo secundário (código 61950) da Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA. Para detectar as

bandas imuno-reativas, os “blots” foram expostos ao kit de quimioluminescência Super Signal West Pico (Pearce, Rockford, IL, USA) e as densidades das bandas das amostras sobre a membrana foram capturadas e copiadas em discos de computador, para posterior quantificação da densitometria ótica, usando o Software Scion Image (Carvalho *et al.*, 2001).

3.2.11. Determinação das interleucinas 6, 10 e 12

Para análise das interleucinas, os intestinos submetidos à colite foram homogeneizados em 1 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,4); após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 12 000 rpm e o sobrenadante congelado a -70° C até a realização dos ensaios bioquímicos.

As concentrações de IL-6, IL-10 e IL-12 foram determinadas pelas técnicas imunoenzimáticas com kit R&D systems (Duo Set ELISA development kit mouse IL-6, IL-10 e IL-12 p70, R&D systems Inc., Minneapolis, MN, USA). O kit tem capacidade para 96 testes (placa com 96 poços); 7 poços, porém, foram utilizados para o desenvolvimento da curva-padrão que, da mesma forma que as amostras, foi realizada em duplicata. O princípio do desenvolvimento da técnica é baseado na reação do tipo antígeno-anticorpo. Inicialmente foram preparados todos os reagentes e cada poço foi incubado com 100 µl de anticorpo de captura, em temperatura ambiente, *overnight*. Após esse período, foram pipetados 300 µl do diluente, um reagente composto de uma proteína básica com função preservativa da reação, por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 100 µl das amostras e da curva-padrão, ficando as mesmas incubadas por 2 horas. Em seguida, todos os poços foram incubados por 2 horas com o anticorpo de detecção para que a interleucina presente nas amostras pudesse se ligar ao anticorpo durante esse período. Após incubação de 2 horas,

todos os poços foram lavados e aspirados 4 vezes, a fim de remover qualquer substância não ligada que pudesse interferir na reação, pipetando-se em cada um deles 100 µl de estreptavidina-HRP e deixando incubado por 20 minutos. O próximo passo consistiu na adição de 200 µl de uma solução substrato, previamente com mistura de dois reagentes, responsável pelo desenvolvimento da coloração da reação. Após período de incubação de 20 minutos, protegido da luz, cada um dos poços recebeu 50 µl da solução *stop* (ácido sulfúrico 2 N). Durante esse período ocorre desenvolvimento de uma coloração na mesma proporção e intensidade das concentrações de interleucinas que reagem na fase inicial do processo bioquímico. O desenvolvimento da cor é uniformemente interrompido pela solução *stop*. A leitura da absorbância foi realizada em ELISA Apollo LB 912 (Berthold Technologies GmbH & Co, Bad Wildbad, Germany), a 450 nm com correção para 540 nm.

3.2.12. Análise Estatística

Os resultados paramétricos foram expressos em média \pm erro padrão da média e os não paramétricos expressos em mediana (range). Estes dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste a posteriori de Tukey, quando paramétricos e Kruskal-Wallis quando não paramétricos. O nível de significância permitido foi de $P < 0,05$ em todas as análises. O programa utilizado foi o GraphPad Prism 5.00.

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio *in vitro*

O trabalho previa, inicialmente, a utilização de cromatografia gasosa (CG) como estabelecido na literatura (Murase *et al.*, 1995; Velázquez *et al.*, 2000; Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002). No entanto, as amostras ensaiadas contêm água em quantidade que inviabilizava a utilização de CG. Assim sendo, os resultados foram obtidos com a cromatografia de íons.

Na cromatografia iônica, a fase estacionária é altamente carregada e os solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos na fase estacionária. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentemente eluídos, por deslocamento com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária (Spadaro, 2006).

A figura 6 mostra o cromatograma dos padrões usados para a identificação dos picos de ácidos graxo das amostras provenientes da fermentação dos vegetais, por comparação dos diferentes tempos de retenção.

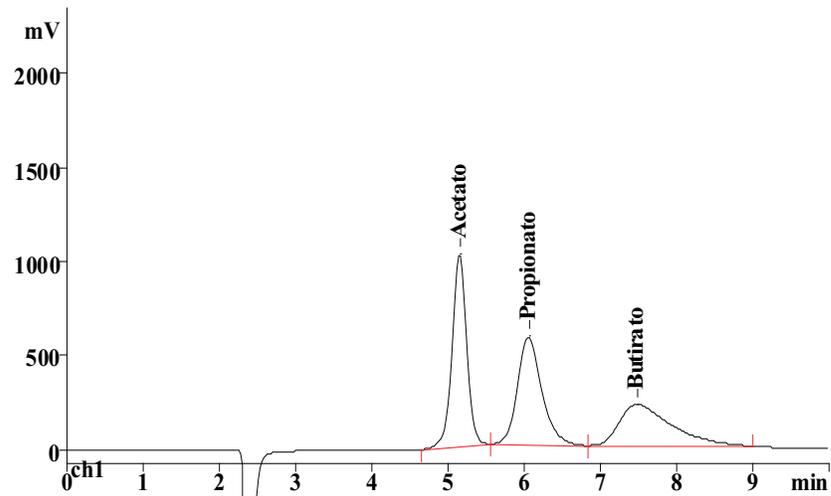


Figura 6. Cromatograma dos padrões dos AGCC (acetato, propionato e butirato) usados na quantificação dos mesmos em amostras provenientes da fermentação de Uva $0,5 \text{ g.kg}^{-1}$, pelas bactérias cólicas de ratos Unib: WH.

Observa-se que os picos apresentaram-se por ordem de tamanho de cadeia de carbono, sendo que os de menores cadeias saem primeiro e os de maiores depois, de acordo com o princípio da cromatografia de íons, ou seja, separação dos componentes da amostra pelo tamanho das moléculas (Spadaro, 2006).

Já na figura 7 estão apresentados os resultados do cromatograma da amostra que mais produziu butirato.

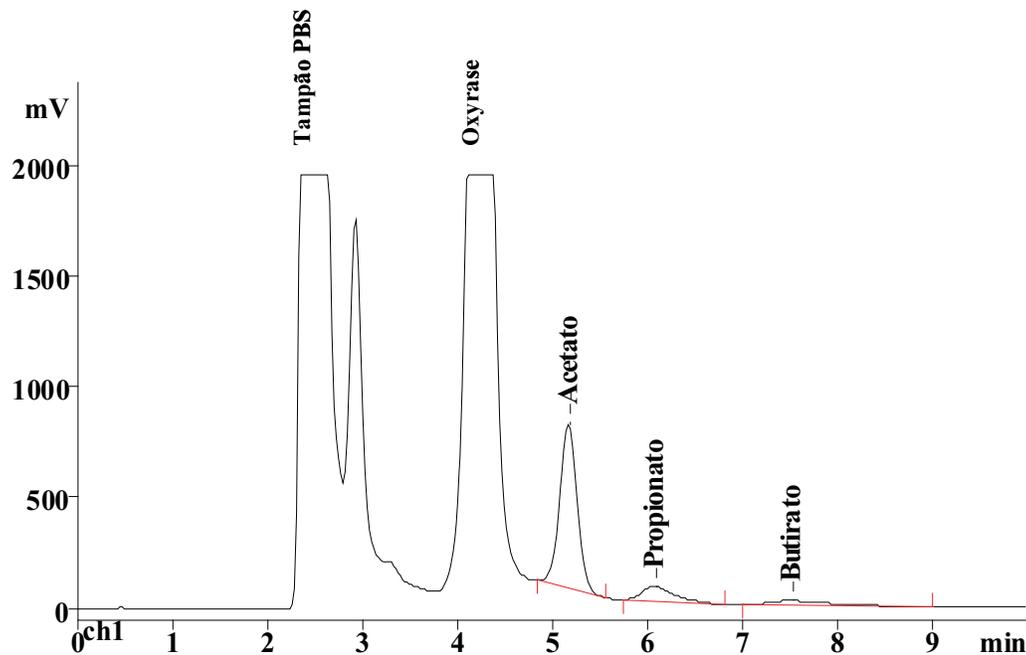


Figura 7. Cromatograma da amostra de Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) encubada no tempo de 24 horas.

O primeiro pico equivale à saída do tampão fosfato, usado na diluição da amostra, enquanto o segundo pico equivale ao Oxyrase[®] usado para retirar o oxigênio do meio para que as bactérias anaeróbicas possam agir com mais eficiência; os terceiro, quarto e quinto picos equivalem aos AGCC, acetato, propionato e butirato, respectivamente.

Em todos os tempos de incubação utilizados as amostras foram analisadas em unicata, sendo que apenas algumas amostras, selecionadas ao acaso, foram quantificadas 5 vezes com a finalidade de observar possíveis variações entre elas. Os resultados mostraram variação mínima (dados não mostrados), uma característica importante da metodologia empregada. Vale ressaltar que a metodologia empregada na quantificação do AGCC, desta fase do trabalho, foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Lauro Kubota juntamente com nosso grupo de pesquisa e está validada através do artigo publicado no *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009.

A tabela 3 indica as concentrações de AGCC (mg/g) obtidas a partir da fermentação das fezes incubadas com os vegetais.

Tabela 3. Quantificação de AGCC (mg.g^{-1}) em suspensão fecal de ratos acrescida de diferentes proporções de Uva e Ameixa, nos tempos 0, 12, 24 e 48 horas de incubação.

Tempo (h)	0	12	24	48
Tampão PBS				
Acetato	0	0	0	0
Propionato	0	0	0	0
Butirato	0	0	0	0
0,5 g Ameixa				
Acetato	9,58	18,46	24,46	29,86
Propionato	2,41	2,66	2,14	2,22
Butirato	5,20	4,80	4,67	4,82
0,4 g Ameixa + 0,1 g Uva				
Acetato	9,31	22,92	28,49	33,66
Propionato	2,53	3,82	3,66	2,90
Butirato	4,62	5,34	4,81	4,58
0,3 g Ameixa + 0,2 g Uva				
Acetato	10,08	23,98	25,20	32,30
Propionato	2,43	4,02	3,03	3,36
Butirato	4,77	5,42	4,42	4,72
0,25 g Ameixa + 0,25 g Uva				
Acetato	12,35	24,14	33,01	43,39
Propionato	3,47	4,66	4,85	5,09
Butirato	5,49	5,57	5,73	5,95
0,2 g Ameixa + 0,3 g Uva				
Acetato	10,85	22,21	27,49	35,70
Propionato	2,90	3,93	4,11	4,21
Butirato	5,07	5,10	4,82	5,13
0,1 g Ameixa + 0,4 g Uva				
Acetato	12,61	28,98	35,76	39,10
Propionato	3,34	6,44	6,84	6,44
Butirato	5,69	6,49	6,51	6,24
0,5 g Uva				
Acetato	13,37	31,37	33,77	42,59
Propionato	3,86	8,19	8,20	9,24
Butirato	6,38	7,61	7,19	8,21

Foi possível observar que acetato foi sempre produzido em maiores proporções que propionato e butirato, qualquer que tenha sido a combinação dos vegetais estudados.

Como a escolha da combinação das frutas utilizada para estudos posteriores considera apenas a produção de butirato, as figuras 8 e 9 apresentadas a seguir mostram somente a produção deste AGCC nos tempos de 24 e 48 horas, já que foi nesses períodos que sua produção alcançou valores máximos.

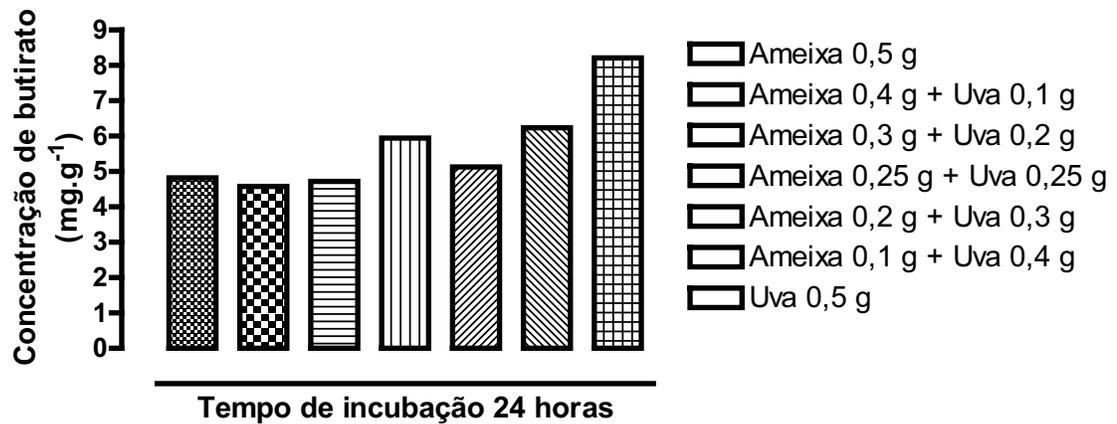


Figura 8. Quantificação de butirato (mg.g^{-1}) proveniente da fermentação de diferentes proporções de Ameixa e Uva pelas bactérias cólicas de ratos Unib: WH, no tempo de 24 horas.

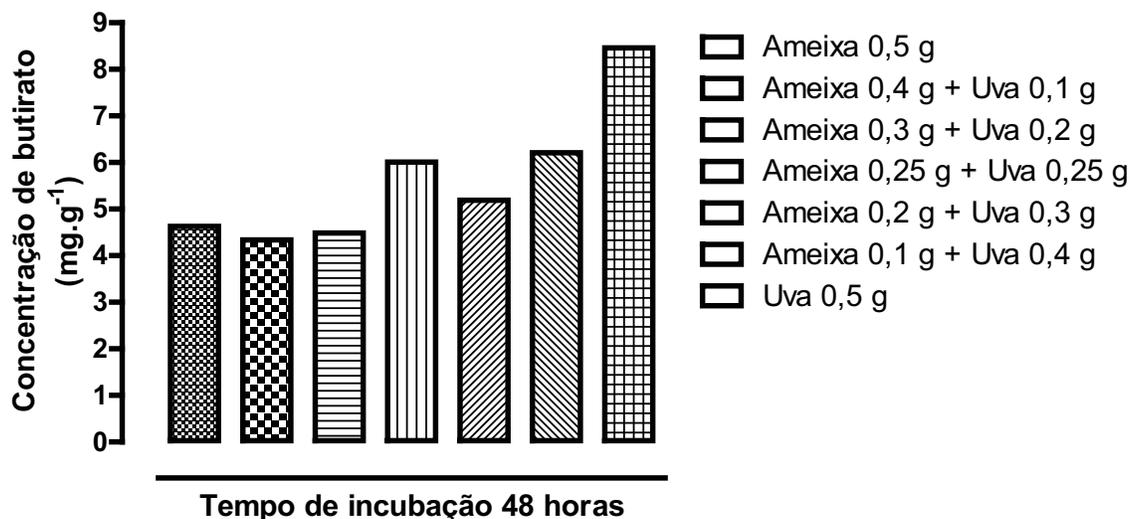


Figura 9. Quantificação de butirato (mg.g^{-1}) proveniente da fermentação de diferentes proporções de Ameixa e Uva pelas bactérias cólicas de ratos Unib: WH, no tempo de 48 horas.

Observou-se nos tempos de 24 e 48 horas que a amostra que mais produziu butirato foi aquela obtida na fermentação de 0,5 g de Uva. Esse padrão de produção de butirato na fermentação de 0,5 g de Uva por bactérias intestinais foi o mesmo independentemente do tempo analisado (Tabela 3). No entanto, a produção de butirato foi máxima nos tempos de incubação de 24 e 48 horas.

4.2. Indução de colite experimental por TNBS

O modelo de colite inicialmente descrito por Morris *et al.*, (1989) consiste na indução do dano cólico mediante a administração de uma dose única de 30 mg de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em etanol 50%. No presente estudo, a dose do TNBS foi reduzida para 10 mg afim de que o processo inflamatório induzido fosse mais fácil de ser

modulado mediante tratamento com Uva. De fato, a administração de 10 mg de TNBS produziu dano cólico qualitativamente similar àquele produzido com 30 mg, porém as lesões foram quantitativamente menores.

O processo inflamatório intestinal foi avaliado mediante parâmetros gerais como peso corporal e presença de diarreia; após eutanásia dos animais; realizou-se um estudo macroscópico do dano cólico, estabelecendo uma relação entre peso/comprimento do cólon e adoção de um índice de dano macroscópico, segundo critério inicialmente descrito por Bell *et al.*, (1995). Os dados dessas análises encontram-se agrupados na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros quantificados após administração de Uva (0,5 g.kg⁻¹) em ratos com colite aguda induzida por instilação intra-cólica de TNBS (10 mg/ animal).

Grupo	<i>n</i>	Danos (score)	Mudanças peso corpóreo (g)	Diarreia (score 1-2)	Cólon Peso/comprimento (g.cm ⁻¹)
Salina	8	0	156.5 ± 7.4	0.0	7.4 ± 1.4 ^c
TNBS	8	7.0 (6.0 – 7.0)	134.6 ± 5 ^a	0.7 ± 0.1 ^b	14.5 ± 5.6 ^b
Uva	8	6.0 (5.0 – 7.0) ^c	139.5 ± 5.1	0.2 ± 0.1 ^d	13.6 ± 4.9 ^b

Dados expressos como media ± e.p.m. ^a*p* < 0.05 and ^b*p* < 0.001 vs. grupo Salina; ^c*p* < 0.05 ^d*p* < 0.01 and ^e*p* < 0.001 vs. grupo TNBS.

A Uva 0,5 g.kg⁻¹, administrada nas duas semanas que antecederam a indução do processo inflamatório intestinal, não modificou a perda de peso nos animais que receberam TNBS para indução de colite, ou seja, a evolução do processo inflamatório intestinal

durante a semana seguinte a indução do dano se caracterizou por diminuição progressiva do peso corporal de todos os grupos de animais com colite, mas essa perda de peso não foi significativa entre os grupos.

Outra característica do processo inflamatório é a presença de diarreia frequentemente observada nos animais do grupo TNBS ($p < 0.001$) quando comparados aos do grupo salina (Tabela 4). No grupo tratado com Uva, além da presença de diarreia ter sido estatisticamente menor do que naqueles que não receberam Uva, não foi observado presença de sangue.

4.3. Avaliação macroscópica das lesões

Após eutanásia dos animais, uma a avaliação macroscópica das lesões mostrou espessamento da parede intestinal do grupo TNBS que resultou em aumento da relação peso/comprimento (Tabela 4).

O tecido cólico mostrou zonas de ulceração e necrose de aproximadamente 4 cm de comprimento, o que se traduziu no índice do dano macroscópico (IDM) final de 7,0 (Fig. 10). O pré-tratamento dos animais com Uva produziu efeito anti-inflamatório evidenciado através de modificação significativa na extensão do segmento cólico afetado, com diminuição do IDM ($p < 0.05$) (Tabela 4).



Figura 10: Localização das lesões macroscópicas do intestino de ratos submetidos à indução de colite por TNBS.

4.4. Determinação dos parâmetros bioquímicos

Do ponto de vista bioquímico, o dano inflamatório induzido por TNBS se caracterizou pelo aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) como mostra na figura 11. A atividade da MPO é um bom marcador de infiltração granulocítica e tem sido amplamente utilizado para avaliar o dano intestinal. Verificou-se que o aumento de 4 vezes na atividade da MPO, induzido pelo TNBS, foi significativamente reduzido quando os animais foram tratados com Uva, embora a atividade não tenha retornado aos valores basais do grupo salina.

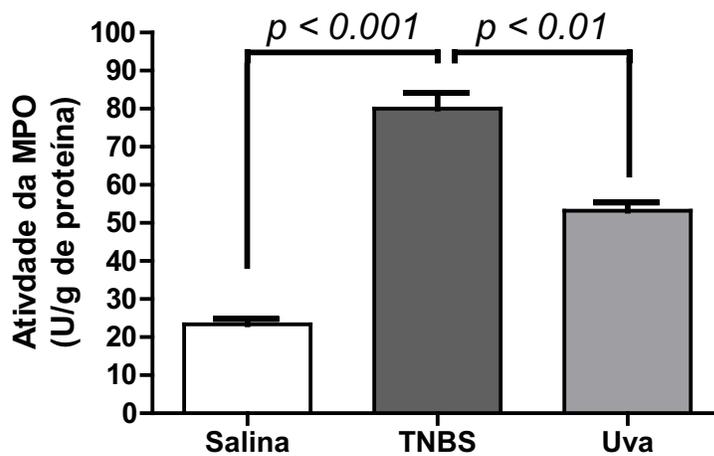


Figura 11. Efeito do tratamento com Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) sobre a atividade da MPO no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS. Dados expressos em média \pm epm. ANOVA, seguido de teste de Tukey.

Os resultados obtidos para GSH em animais colíticos tratados ou não com Uva, estão sumarizados na figura 12.

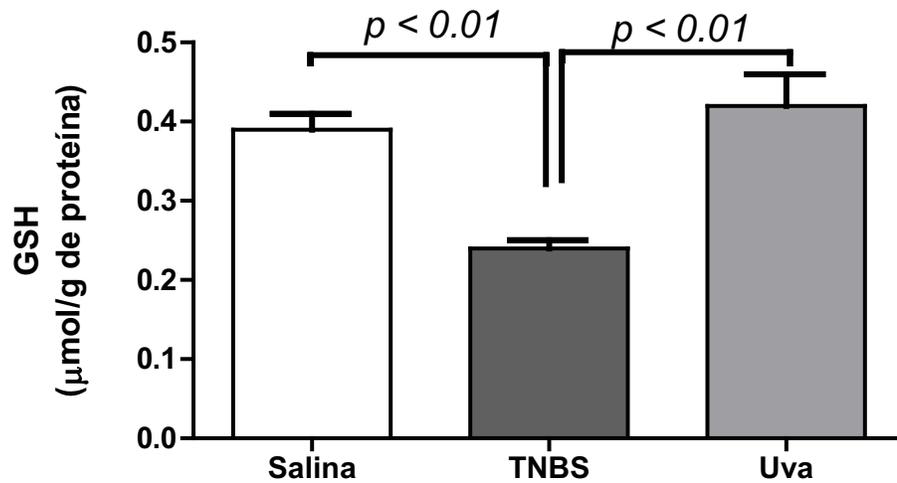


Figura 12. Efeito do tratamento com Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) sobre a concentração de GSH no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS. Dados expressos em média \pm epm. ANOVA, seguido de teste de Tukey.

O pré-tratamento com Uva aumentou, de forma estatisticamente significativa, os níveis de GSH na mucosa cólica, que é depletado nos ratos com colite em consequência do estresse oxidativo induzido pelo processo inflamatório.

A atividade da GSH-Px também foi analisada em animais não colícticos e colícticos, estes últimos tratados e não tratados com Uva. Os resultados dessa análise estão apresentados na figura 13.

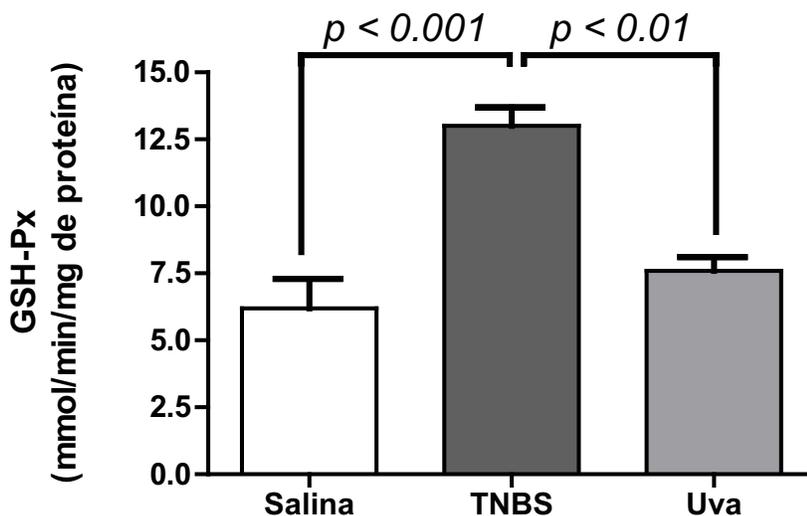


Figura 13. Efeito do tratamento com Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) sobre a atividade da GSH-Px no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS. Dados expressos em média \pm epm. ANOVA, seguido de teste de Tukey.

No modelo de colite induzido por TNBS, observou-se um aumento na atividade da enzima glutatona peroxidase (GSH-Px). Os animais tratados com Uva apresentaram atividade da enzima GSH-Px diminuída quando comparado à do grupo TNBS, ou seja, a Uva produziu atividade da GSH-Px semelhante àquela do grupo não-colítico.

Os resultados obtidos para GSSG-Rd em animais não colícticos e colícticos tratados ou não com Uva estão mostrados na figura 14.

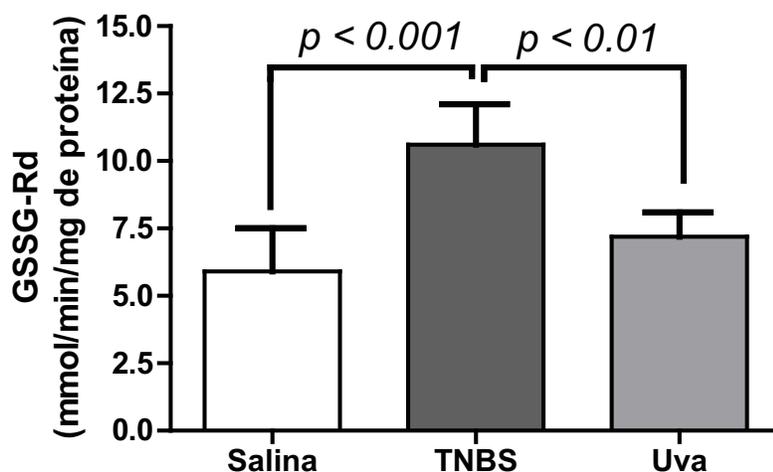


Figura 14. Efeito do tratamento com Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) sobre a atividade da GSSG-Rd no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS.. Dados expressos em média \pm epm. ANOVA, seguido de teste de Tukey.

A atividade da glutathione redutase (GSSG-Rd) no intestino também foi alterada pela colite induzida por TNBS. Como esperado, o grupo salina (sem lesão) manteve a atividade da GSSG-Rd reduzida, enquanto no grupo da Uva a atividade enzimática foi mantida em níveis próximos àqueles do grupo salina.

Por último, mas não menos importante, foi avaliada a atividade da enzima SOD. Os resultados estão resumidos na figura 15.

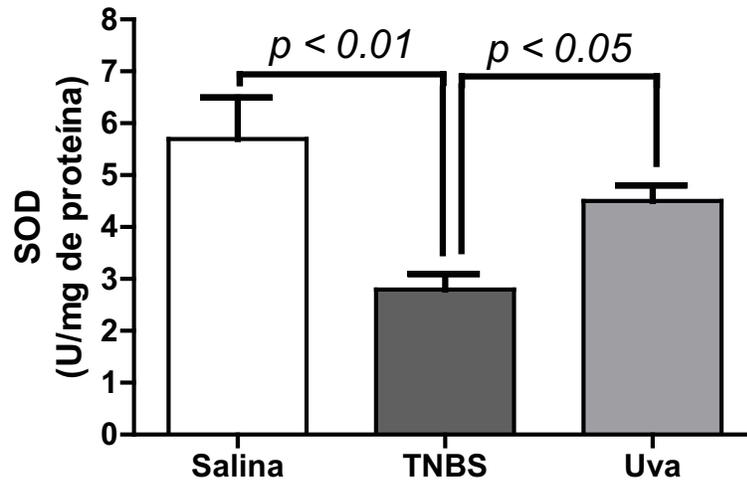


Figura 15. Efeito do tratamento com Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) sobre a atividade da SOD no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS. Dados expressos em média \pm epm. ANOVA, seguido de teste de Tukey.

No grupo TBNS a atividade da SOD foi diminuída de forma estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Por outro lado, nos animais que receberam Uva a atividade enzimática foi restabelecida.

O nível de expressão da molécula de adesão celular MadCAM-1 foi mensurado por Western blotting dos extratos citosólicos da mucosa cólica e os resultados obtidos estão apresentados na Fig. 16.

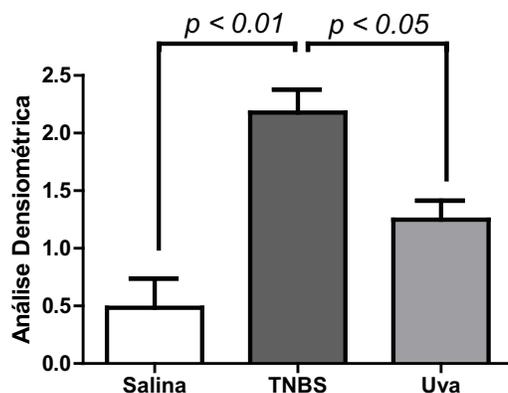
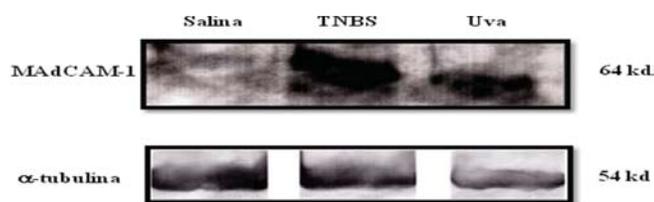


Figura 16. Análise representativa Western blot da proteína MadCAM-1 após administração da Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) em ratos com colite ulcerativa induzida pela instilação do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS, 10 mg/animal). Dados densiométricos foram estimados seguindo normatização para o controle. Os resultados são representativos de três experimentos sobre amostras diferentes. Dados expressos como média \pm e.p.m.

Como mostrado nesta figura, a exposição do cólon ao TNBS causou forte expressão da MadCAM-1; por outro, lado Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) promoveu diminuição na expressão da MadCAM-1 *versus* TNBS, embora ainda diferente da expressão apresentada por animais não colíticos.

Os níveis da expressão das ciclooxigenases-1 e 2 foram mensurados por Western blotting dos extratos citosólicos da mucosa cólica. Os resultados obtidos nas análises da expressão das isoenzimas COX-1 e COX-2 nos extratos citosólicos de ratos não colíticos e

colíticos, tratados ou não com Uva, encontram-se apresentados nas figuras 17 e 18 respectivamente.

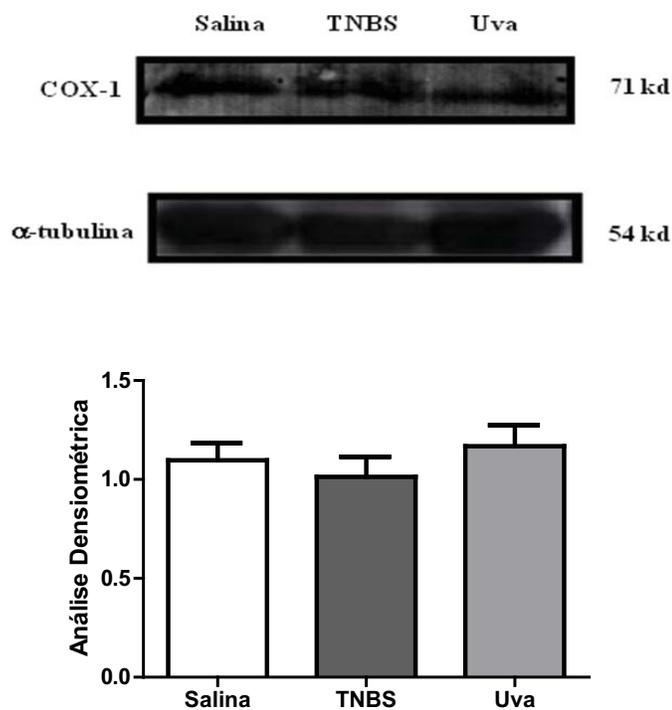


Figura 17. Análise representativa Western blot da proteína COX-1 após administração da Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) em ratos com colite ulcerativa induzida pela instilação do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS, 10 mg/animal) Dados densiométricos foram estimados seguindo normatização para o controle. Os resultados são representativos de três experimentos sobre amostras diferentes. Dados expressos como média \pm e.p.m.

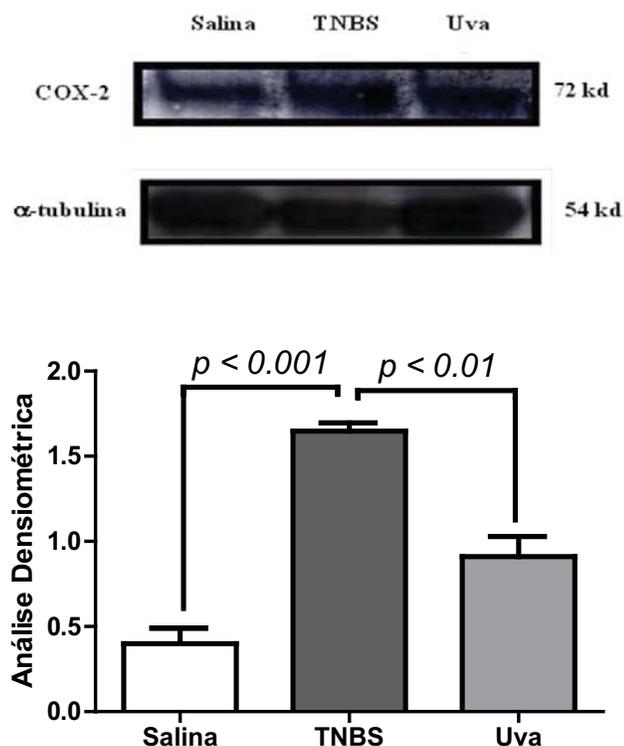


Figura 18. Análise representativa Western blot da proteína COX-2 após administração da Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) em ratos com colite ulcerativa induzida pela instilação do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS, 10 mg/animal). Dados densiométricos foram estimados seguindo normatização para o controle. Os resultados são representativos de três experimentos sobre amostras diferentes. Dados expressos como média \pm e.p.m.

Os níveis de expressão da enzima ciclooxigenase-1 permaneceram inalterados em todos os grupos. Estes dados indicam que a proteína da ciclooxigenase-1 foi expressada de modo constitutivo no tecido cólico e não foi significativamente alterada após instilação do TNBS na ausência ou presença da Uva (Figura 17). Por outro lado, os níveis de expressão da enzima ciclooxigenase-2 foi significativamente aumentada pelo TNBS ($p < 0.05$), ou seja, TNBS induziu a expressão da isoenzima na fase inicial da lesão cólica. A administração oral de Uva diminuiu, de forma estatisticamente significativa, o aumento na

expressão da ciclooxygenase-2 ($p < 0.01$) causada pelo TNBS para níveis bem próximos àqueles do grupo não colítico (Figura 18).

O nível da expressão do NF- κ B foi mensurado por Western blotting nos extratos citosólicos da mucosa cólica de ratos. A figura 19 mostra os resultados obtidos na análise da proteína NF- κ B em ratos não colíticos e colíticos, tratados ou não com Uva.

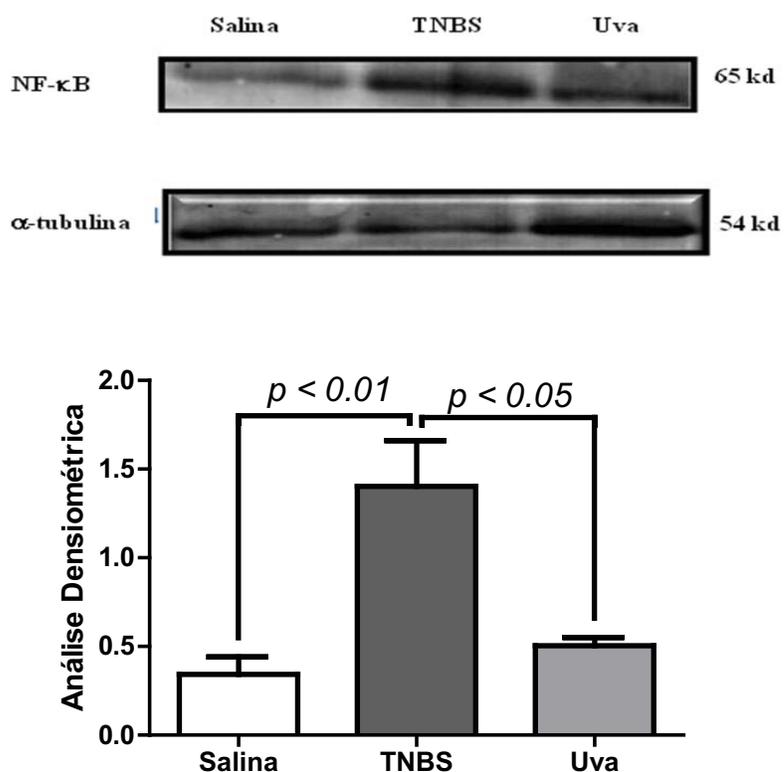


Figura 19. Análise representativa Western blot da proteína NF- κ B após administração da Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) em ratos com colite ulcerativa produzida pela instilação do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS, 10 mg/animal) Dados densiométricos foram estimados seguindo normatização para o controle. Os resultados são representativos de três experimentos sobre amostras diferentes. Dados expressos como média \pm e.p.m.

A proteína do NF- κ B foi detectada na mucosa cólica normal em pequenas quantidades contra uma alta expressão do fator nuclear na mucosa dos animais do grupo controle TNBS ($p < 0.01$). Contudo, o tratamento com Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) diminuiu drasticamente a expressão protéica do NF- κ B para níveis praticamente idênticos àqueles dos animais não colíticos (grupo salina).

A produção da citocina IL-12 foi analisada na mucosa cólica tanto de animais não colíticos quanto em colíticos, tratados ou não com Uva. Os resultados encontram-se na figura 20.

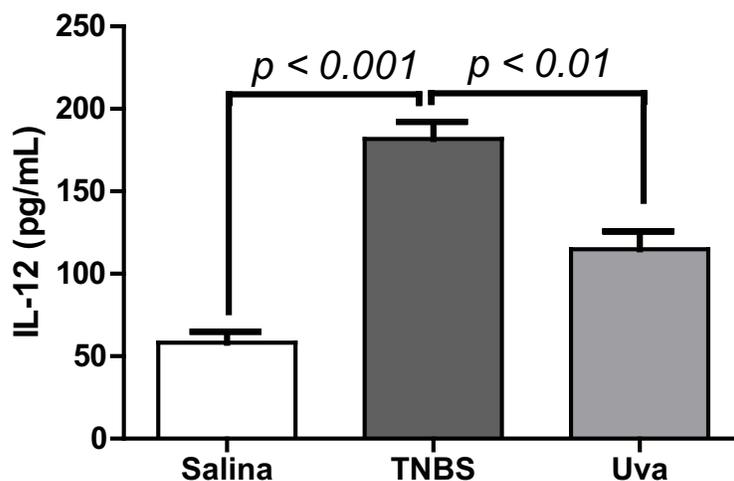


Figura 20. Efeito do tratamento com Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) sobre a produção de IL-12 no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS. Dados expressos em média \pm e.p.m. ANOVA, seguido de teste de Tukey.

A colite induzida por TNBS aumentou a produção de IL-12 no intestino. Entretanto, o tratamento de animais com Uva diminuiu, de forma estatisticamente significativa, a produção de IL-12 para níveis próximos aqueles obtidos para os animais do grupo salina (sem colite).

Objetivando avaliar outra citocina pró-inflamatória verificamos a produção de IL-6 na mucosa cólica em ratos colícticos tratados ou não com Uva e em ratos não colícticos. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 21.

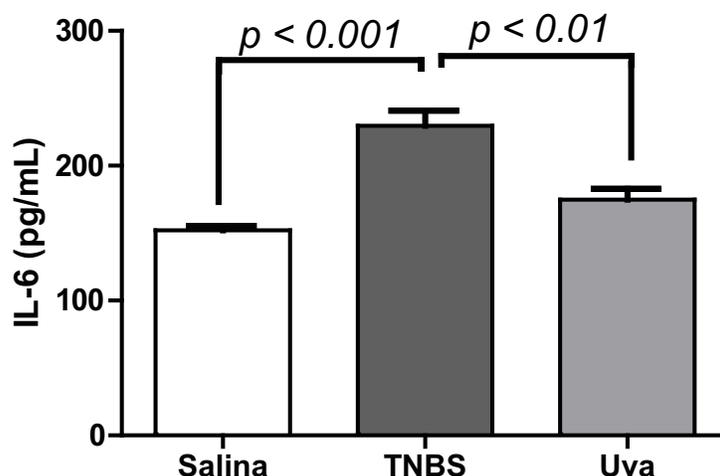


Figura 21. Efeito do tratamento com Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) sobre a produção de IL-6 no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS. Dados expressos em média \pm e.p.m. ANOVA, seguido de teste de Tukey.

A produção de IL-6 na mucosa cólica foi aumentada, de modo estatisticamente significativo, pela indução de colite. O tratamento de animais com Uva diminuiu os níveis de IL-6 produzida para níveis muito próximos daqueles alcançados pelos animais do grupo não colíctico (Salina).

A figura 22 mostra os resultados obtidos na avaliação da interleucina antinflamatória IL-10 na mucosa cólica de ratos não colícticos e colícticos por TNBS, tratados ou não com Uva.

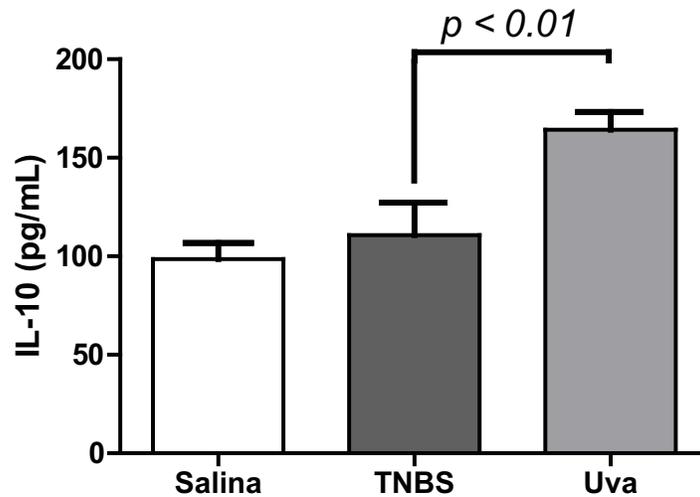


Figura 22. Efeito do tratamento com Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) sobre a produção de IL-10 no intestino de ratos submetidos ao modelo de indução de colite por TNBS Dados expressos em média \pm e.p.m. ANOVA, seguido de teste de Tukey.

Os resultados obtidos indicam que o TNBS não alterou os níveis de IL-10 produzida na mucosa quando os mesmos foram comparados aos dos animais do grupo que não recebeu TNBS, ou seja, animais não colíticos (Grupo Salina). O tratamento com Uva de animais colíticos produziu aumento significativo dos valores da IL-10 antiinflamatória na mucosa cólica.

DISCUSSÃO

O cólon é a região do intestino que contém a maior concentração de bactérias anaeróbicas que fermentam fibras alimentares. A principal função da flora bacteriana do cólon é a digerir carboidratos e proteínas que “escaparam” do processo digestivo do intestino delgado; diversidade destes microorganismos fornece uma variedade de enzimas e de vias bioquímicas distintas daquelas do próprio hospedeiro (Guarner e Malagelada, 2003).

A fermentação envolve uma variedade de reações e processos metabólicos realizados por bactérias anaeróbicas, resultando em energia para manutenção e crescimento microbiano, além de outros resultados metabólicos a serem utilizados pelo hospedeiro (Macfarlane e Gibson, 1991); os principais produtos são ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), junto com gases (CO_2 , CH_4 e H_2) (Topping e Clifton, 2001). Vários estudos populacionais mostram que a produção de AGCC fecal é, na ordem, acetato > propionato \geq butirato (Topping e Clifton, 2001) em quantidades molares de aproximadamente 60: 20: 20, respectivamente (Cummings *et al.*, 1979).

Existem duas vias para a metabolização do piruvato. Em uma delas forma-se propionato através do succinato; na outra via, o piruvato é convertido em acetil-CoA que, posteriormente, é hidrolisado para formar acetato ou é reduzido para formar butirato. A fermentação cólica de fibras alimentares produz energia e seu valor oscila entre 1 e 2,5 cal/g; este valor dependerá do grau de fermentabilidade das fibras (Peris *et al.*, 2002). Outros ácidos como isobutirato, 2-metilbutirato e isovalerato aparecem em menores quantidades, sendo gerados a partir da fermentação de proteínas, através do metabolismo do piruvato produzido pela oxidação da glicose, através da via glicolítica (Wolin e Miller, 1983).

A quantificação de AGCC é de extrema importância dado que quanto maior for sua produção pela fermentação das fibras alimentares, maior será a eficiência na recuperação do tecido cólico, danificado constantemente pelo atrito do bolo fecal com as paredes do intestino (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que o butirato é a principal fonte energética dos colonócitos (Ahmad *et al.*, 2000; Glassul, 2006). 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 diminuídas de AGCC diminuída nas fezes (Stein *et al.*, 1992; Araki *et al.*, 2002, Marchesi *et al.*, 2007), sugerindo que a restauração dos níveis luminais de butirato pode facilitar a recuperação da mucosa inflamada (Kanauchi *et al.*, 1998). Enemas de AGCC, especialmente 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), além de exercer uma atividade protetora sobre o dano oxidativo do DNA induzido pelo H₂O₂ (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).

Existem várias técnicas analíticas para a identificação e quantificação destes ácidos, como eletroforese capilar (Arellano *et al.*, 1997; Zuriguel *et al.*, 1997), cromatografia líquida de alta eficiência (Stein *et al.*, 1992), cromatografia gasosa (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002) (a mais usual de todas as técnicas empregadas), e a cromatografia de íons (Flickinger *et al.*, 2000). O grupo do Prof. Dr. Kubota juntamente com o nosso desenvolveu um método baseado em cromatografia iônica, para quantificar AGCC (Dias *et al.*, 2009)

Nosso grupo investiga, há algum tempo, fibras alimentares, sozinhas ou em combinações, que fazem parte da dieta da população. Elas são provenientes de frutas e verduras/legumes presentes na alimentação diária dos brasileiros (Suzuki, 2008; Camargo Penteado, 2009). Para a produção de AGCC, as fibras (e suas combinações) foram incubadas com fezes provenientes do cólon de ratos no sentido de descobrir aquela (s) que produzia (m) maior quantidade de butirato.

Nesse contexto, a amostra que se mostrou mais promissora foi a composta por Uva (0,5 g.kg⁻¹) sem adição de ameixa. Uma elevada produção de butirato em todos os tempos de incubação foi observada e, assim sendo, sua atividade sobre algumas das enzimas antioxidantes foi avaliada.

Dentre as descobertas associadas às DII, está a importância dos danos mediados pelo aumento na liberação de agentes oxidantes (Head e Jurenka, 2003; Araki *et al.*, 2006); tecido inflamado de pacientes com DII é rico em macrófagos e neutrófilos que geram excesso de ERO com subsequente aumento do estresse oxidativo (Grisham e Granger, 1988). O aumento na geração de ERO altamente tóxicas excede o limite do sistema de defesa intestinal e, deste modo, contribui para o dano oxidativo intestinal nas DII (Babbs, 1992).

Administração do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) é um modelo que envolve reação inflamatória localizada no cólon distal (Morris *et al.*, 1989), com grande interesse porque mimetiza as DII humana (Elson *et al.*, 1995). Nossos estudos confirmam que administração intracólica de TNBS induz erosão, ulceração e um processo inflamatório no cólon do rato. Importantes descobertas sobre a patogênese das DII surgiram a partir de estudos empregando estes modelos animais, incluindo contribuição determinante de células

endoteliais vasculares do cólon para recrutamento de diferentes populações de células inflamatórias no tecido inflamado.

O TNBS é um modelo experimental de colite ulcerativa que simula muito bem os danos crônico ou agudo do cólon e fenômenos associados às ERO (Nieto *et al.*, 2000). Yoshikawa e colaboradores (1992) demonstraram que etanol 30% age somente danificando a barreira protetora para facilitar a entrada do TNBS dentro da mucosa, sem modificar o dano no cólon; o ácido pode ser metabolizado, enzimaticamente ou não-enzimaticamente pelo ascobarto (Grisham *et al.*, 1991) gerando anion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sugerindo que a colite induzida por TNBS pode ser parcialmente mediada pelas ERO geradas pelo metabolismo oxidativo do ácido (Kunin *et al.*, 1983).

Em humanos acometidos pelas DII, os níveis de GSH são baixos; esse tripeptídeo é o mais abundante antioxidante sintetizado pelas células animais e apresenta papel essencial na biologia celular, modulando a resposta de mudanças redox associadas às ERO, além de ser importante para integridade funcional e estrutural do intestino (Oz *et al.*, 2005). GSH pode ser depletada durante a doença inflamatória e animais deficientes em GSH demonstraram grave degradação da mucosa cólica, perda de peso e diarreia (Martensson *et al.*, 1990). Com a administração de *N*-acetilcisteína, no modelo de colite induzida por TNBS, os danos produzidos na mucosa foram diminuídos (Ardite *et al.*, 2000), sugerindo que precursores de GSH podem ser benéficos no tratamento das DII. *S*-Adenosilmetionina, um precursor de GSH, é necessário para o metabolismo dos ácidos nucleicos, reações de metilação, produção de poliamina e manutenção da estrutura e função das membranas (Lu *et al.*, 2000). A colite induzida pela administração intra-retal de TNBS, reduziu significativamente os níveis de GSH. Essa redução se deve à interação indireta com compostos ativados pelo TNBS, conhecidos como mecanismo de inativação xenobiótica

(Nieto, 2000). O grupo de animais tratados com Uva manteve a concentração de GSH semelhante ao grupo salina (sem colite), o que indica menor estresse oxidativo, já que a depleção dos níveis de GSH está associada à ação de ERO (Chu *et al.*, 2004).

Muitos estudos demonstraram que enzimas antioxidantes, como GSH-Px, estão alteradas em doenças inflamatórias envolvendo o trato gastrointestinal (Lih-Brody *et al.*, 1996). Tem sido demonstrado que o cólon de pacientes com DII produz mais ERO quando comparado àqueles de indivíduos controle sem colite. Estudos em humanos com DII (Thomas *et al.*, 1994) e em modelos animais (Tham *et al.*, 2002) mostraram, em ambos, aumento na atividade da glutatona peroxidase (GSH-Px).

É descrito que o cólon humano tem normalmente pequenas quantidades de enzimas antioxidantes como catalase, superóxido dismutase e GSH-Px. Desta maneira, o balanço entre produção de ERO e varredores ou “*scavengers*” de radicais livres pode estar prejudicado, levando ao dano no tecido cólico (Nieto *et al.*, 2000).

Um aumento da enzima GSH-Px, enzima que reduz peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos (Esworthy *et al.*, 1993), foi observado em ratos com colite induzida por TNBS (Nieto *et al.*, 2000). A atividade elevada da GSH-Px sugere que o TNBS leva à formação de altos níveis de peróxidos, incluindo o H₂O₂ (Nieto *et al.*, 2000). Os dados obtidos neste estudo corroboram aqueles obtidos em nosso laboratório, onde no grupo salina (sem colite) a atividade enzimática da GSH-Px foi baixa, enquanto que no grupo TNBS (com colite) a atividade da enzima mostrou-se aumentada. No grupo tratado com Uva (0,5 g.kg⁻¹) a atividade da enzima GSH-Px foi menor que aquela obtida para o grupo TNBS (com colite, sem tratamento), sugerindo menor índice de lesões nos grupos tratados (observado na avaliação macroscópica), provavelmente devido à menor produção de peróxido de hidrogênio.

A enzima glutathiona redutase (GSSG-Rd), utilizando como co-fator NADPH, converte a GSSG à sua forma reduzida, já que a enzima GSH-Px converte H_2O_2 em H_2O , a partir da oxidação da glutathiona (Kwiecien *et al.*, 2002). O ciclo “redox” da glutathiona desempenha papel importante na integridade da mucosa. GSSG-Rd está aumentada nas 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 catalizada pela GSH-Px). Esse aumento de GSH-Px também foi observado em ratos tratados com TNBS (Nieto *et al.*, 2000). A elevada atividade da GSSG-Rd pode aumentar o total da GSH celular; contudo, os altos níveis de hidroperóxidos gerados pelos metabólitos do TNBS e, paralelamente, o aumento na GSH-Px pode contribuir para as baixas concentrações de GSH. No grupo de animais tratados com Uva os níveis de GSSG-Rd permaneceram baixos quando comparado ao grupo TNBS, indicando que o tratamento foi capaz de inibir os danos causados por esse agente indutor, culminando na diminuição da atividade desta enzima antioxidante.

Outra enzima envolvida no processo oxidativo, a superóxido dismutase (SOD), converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio; esta enzima é considerada como defesa primária contra o estresse oxidativo (Zelko *et al.*, 2002). SOD é enzima chave na proteção celular contra ERO; alterações complexas da atividade da SOD têm sido descritas nas DII (Han *et al.*, 2006). Na DC e RCUI, os níveis de SOD encontram-se aumentados (Kruidenier *et al.*, 2003); contudo, as mudanças na atividade da SOD nas DII não podem ser dissociadas das alterações de outras enzimas como MPO. Experimentos conduzidos em camundongos mostram os efeitos benéficos do tratamento com SOD ou seus derivados contra colite experimental, pois quando administrados subcutaneamente ou intraperitonealmente reduzem a severidade da inflamação cólica induzida por TNBS (Segui

et al., 2004). A atividade da SOD diminuiu significativamente no grupo que recebeu TNBS quando comparado com o grupo Salina; no grupo tratado com Uva esta atividade foi significativamente restaurada.

Existem evidências, experimental e clínica, que postulam que neutrófilos têm um importante papel no desencadeamento do estresse oxidativo no intestino inflamado. Estas células sintetizam mieloperoxidase (MPO) para produzir ácido hipocloroso com função defensiva. Esta enzima intensifica o dano tecidual durante a inflamação intestinal (Krudenier *et al.*, 2003, Cho *et al.*, 2007). Uma medida da infiltração de neutrófilos é a atividade da MPO cólica, que está relacionada à severidade das lesões na colite induzida por TNBS (Han *et al.*, 2006). O presente estudo mostra que o dano oxidativo resultou na depleção de GSH e aumento de SOD; esses eventos foram semelhantes àqueles que ocorrem nas DII em humanos (Oz *et al.*, 2005; Krudenier *et al.*, 2003).

A presença de MPO na mucosa cólica inflamada é indício da existência de neutrófilos infiltrados, que deslocados do lúmen intestinal para o sítio da inflamação tornam-se fator fundamental para iniciação e perpetuação da doença (Van Assche e Rutgeerts, 2002; Gusland, 1999). Recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação é um processo com vários estágios levando ao acúmulo de células no tecido inflamado. Este processo é regulado por um arranjo de diferentes mediadores, como citocinas, quimiocinas e produtos bacterianos (Farkas *et al.*, 2006). O processo inflamatório é promovido por mediadores como endotoxinas, TNF- α , NF- κ B, além do aumento da expressão de moléculas de adesão sobre as células endoteliais (Spiik *et al.*, 2002; Farkas *et al.*, 2001). Moléculas de adesão recém formadas são reconhecidas por ligantes existentes nos leucócitos, envolvendo membros da superfamília das selectinas, integrinas e imunoglobulinas. O processo inflamatório no intestino inclui os linfonodos mesentéricos e a lâmina própria do intestino

grosso e delgado (Briskin *et al.*, 1997); interações leucocitárias endoteliais são criticamente dependentes da molécula de adesão celular da mucosa adressina-1 (MAdCAM-1). Expressão da MAdCAM-1 é marcadamente aumentada em modelo animal de colite ulcerativa (Connor *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 2000;) e em tecidos provenientes de biopsias de pacientes com RCUI e DC (Shigematsu *et al.*, 2001); assim, MadCAM-1 tem papel central na patogênese da DII (Fong *et al.*, 1997).

Nossos resultados mostram redução na expressão de MadCAM-1 no grupo tratado com Uva, quando comparados aos do grupo TNBS que recebeu apenas salina. Tendo em vista a redução da atividade da MPO e expressão da MadCAM-1, bem como a restauração dos níveis de GSH e SOD, é possível inferir que a Uva apresenta as duas atividades, antioxidante e antiinflamatória, no modelo de colite experimental induzida por TNBS.

O papel dos prostanóides no processo inflamatório intestinal não é totalmente compreendido. Durante o curso das DII e da colite experimental, muitos prostanóides formados durante o processo, modulam negativamente a extensão das DII (Carty *et al.*, 2000). Prostaglandinas e tromboxanos gerados pelas vias da ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2) são moléculas idênticas e, desta forma, tem efeitos biológicos idênticos (Halter *et al.*, 2001). No entanto, COX-1 e COX-2 podem gerar padrão e quantidades diferentes de eicosanóides; por essa razão, ativação de COX-1 e COX-2 pode resultar em diferentes respostas biológicas (Halter *et al.*, 2001). COX-1 é expressa constitutivamente em muitos tecidos, enquanto COX-2 é enzima induzida e expressa primariamente em sítios de inflamação. O'Neil e Ford-Hutchinson (1996) demonstraram presença de grandes quantidades de RNAm e proteínas COX-1 no cólon humano normal. Esta isoforma está envolvida na manutenção da integridade da mucosa no trato gastrointestinal (Halter *et al.*, 2001) e é expressa em quantidades iguais em células cólicas

de tecido normal, com RCUI e DC (Halter *et al.*, 2001). Nossos resultados condizem com a literatura já que o cólon dos animais dos grupos Salina, TNBS e Uva não apresentaram diferenças estatísticas na expressão da COX-1.

A isoenzima COX-2 não foi detectada no epitélio normal, contudo em DC e RCUI sua expressão é alta. Indução da COX-2 ocorre, em certos tipos celulares, por ação de agentes pro-inflamatórios incluindo citocinas, endotoxinas, bem como por fatores que causam danos ao tecido (Ferraz *et al.*, 1997). RNAm e proteínas de COX-2 foram localizados em tecidos inflamados e em células inflamatórias (Halter *et al.*, 2001); assim, esta isoforma é considerada mediadora do processo inflamatório e expressão aumentada de COX-2 já foi observada em pacientes com DII crônica (Singer *et al.*, 1998). Estudos em humanos e modelos animais de colite mostraram melhora considerável do processo inflamatório quando utilizaram inibidores da COX-2 foram utilizados (Cuzzocrea *et al.*, 2001; Mahadevan *et al.*, 2002). Nossos resultados mostraram correlação positiva entre colite induzida por TNBS e expressão intestinal da COX-2, sugerindo que o aumento dessa expressão foi devido ao agente indutor de colite, TNBS. No grupo de animais tratados com Uva, a expressão da COX-2 foi estatisticamente diminuída no cólon quando os resultados foram comparados aqueles do grupo TNBS.

O fator nuclear- κ B (NF- κ B) tem papel importante regulando a expressão de uma extensa variedade de genes que controlam a resposta imune (Li e Verma, 2002; Atreya *et al.* 2008; Spehlmann & Eckmann, 2009). Inibição da ativação do NF- κ B tem sido sugerida como estratégia para o tratamento das DII (Martín *et al.*, 2006). O NF- κ B é regulador chave na expressão induzida de muitos genes envolvidos na resposta inflamatória do intestino (Atreya *et al.*, 2008). Estímulos como estresse oxidativo, citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α) e

bactérias podem liberar NF- κ B e permitir sua translocação para o núcleo (Dijkstra *et al.*, 2002). Em nosso estudo, as condições inflamatórias produzidas no cólon pelo TNBS foram acompanhadas de quantidades detectáveis do NF- κ B, enquanto que no cólon de animais do grupo Uva (0,5 g.kg⁻¹) a expressão desse fator foi drasticamente diminuída. O NF- κ B está sempre presente na mucosa de pacientes com RCUI e DC (Chung *et al.*, 2000) e o tratamento com antisense desse fator inibe a inflamação intestinal em modelos de inflamação crônica (Neurath *et al.*, 1996; Lawrance *et al.*, 2003). NF- κ B ativo, via translocação de genes, estimula a expressão de citocinas pro-inflamatórias e enzimas induzidas como a COX-2 (Dubuquoy *et al.*, 2002). Deste modo, é possível que um mecanismo subjacente do efeito protetor da Uva envolva a redução na expressão da COX-2 na mucosa cólica, possivelmente via inibição da ativação do NF- κ B.

Abordagens terapêuticas recentes envolvem bloqueio de citocinas inflamatórias, que controlam vias de sinalização chaves no sistema imune intestinal e são conhecidas por participarem da ruptura do chamado “estado normal” de inflamação ou inflamação fisiológica do intestino (Jump & Levine, 2004). As citocinas são pequenas proteínas, produzidas principalmente por células imunes, que facilitam a comunicação entre elas, estimulam a proliferação de células apresentadoras de antígeno e medeiam a inflamação local e sistêmica por vias autócrina, parácrina e endócrina. Nas DII, a resposta imune inata desempenha papel crítico. Células dendríticas ativadas e macrófagos secretam várias citocinas que regulam a resposta inflamatória na RCUI e DC; uma vez secretadas por essas células, estas citocinas acionam e diferenciam muitas células T ativando a resposta imune adaptativa. A falta da regulação das células T ou excesso na produção das células T efetoras estão ambas envolvidas no desenvolvimento e agravamento das DII (Sanchez-Muñoz *et al.*,

2008). No total, Th1, Th2, células T reguladora e, mais recentemente caracterizada, Th17 juntamente com citocinas, desempenham papel complexo no processo inflamatório das DII (Xavier & Podolsky, 2007). Essas interações celulares são moduladas por citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-12), ou anti-inflamatórias como IL-10 (Sanchez-Muñoz, 2008).

Modelos animais das DII mostraram que a inflamação crônica resulta das respostas inflamatórias exacerbadas ou de deficiências nas principais vias que as regulam negativamente (Xavier e Podolsky, 2007; Bouma e Strober, 2003). Recentes abordagens terapêuticas envolvem bloqueio de citocinas inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 12 (Xavier & Podolsky, 2007).

Entre as citocinas pró-inflamatórias implicadas na patogênese das DII, recente atenção centrou-se IL-12 (Elson *et al.*, 2007). Células T CD4⁺ se diferenciam em linhagens funcionais caracterizadas principalmente por citocinas; essas diferenciações, bem como sua sobrevivência, dependem da abundância de citocinas regulatórias produzidas principalmente por macrófagos e células dendríticas. Na presença de IL-12, as células T CD4⁺ adotam um perfil inflamatório produzindo IFN- γ para mediar imunidade celular. A produção de IL-12 é superexpressada em biópsias de pacientes com RCU e DC e está estritamente correlacionada ao índice da lesão macroscópica (Nielsen *et al.*, 2003). O modelo de colite induzida por TNBS permite estudar a resposta imune a um hapteno (TNBS) que inflama cronicamente os colonócitos. As citocinas produzidas nesse modelo são IL-6, IL-12, IL-17 e IFN- γ , além dos fatores quimiotáticos (Alex *et al.*, 2009). No cólon dos animais submetidos à colite por TNBS e tratados com Uva (0,5 g.kg⁻¹), a expressão de

IL-12 foi reduzida, de modo estatisticamente significativa quando os resultados foram comparados aos do grupo TNBS, onde os níveis mantiveram-se elevados.

Interleucina-6 é outra citocina pró-inflamatórias que participa da patogênese das DII; é secretada por células T e macrófagos para estimular a resposta imune levando à inflamação. IL-6 é um dos mais potentes mediadores da resposta de fase aguda e não há muitos dados clínicos disponíveis sobre bloqueio dessa via para tratamento das DII. Em modelos animais de colite, o bloqueio dessa interleucina resultou na diminuição da produção de outras citocinas pró-inflamatórias pela mucosa cólica e induziu apoptose das células T na lâmina própria (Atreya et al., 2000). Nosso trabalho mostrou que no grupo com colite (TNBS) a produção de IL-6 foi maior que nos animais do grupo salina. Já no grupo de animais tratados com Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$), houve redução da produção de IL-6 quando os resultados foram comparados aos dos animais do grupo TNBS, o que reforça mais uma vez atividade antiinflamatória da Uva.

Interleucina 10 (IL-10) pode ser considerada como agente importante na resolução da inflamação. Originalmente chamada “fator inibidor da síntese de citocina” devido à sua capacidade de inibir a produção de IFN- γ e IL-12 em células Th2, IL-10 é secretada por monócitos, macrófagos, mastócitos, linfócitos (T e B) e por células dendríticas (Ogawa *et al.*, 2008). Essa citocina inibe a apresentação do antígeno, liberação de citocinas pró-inflamatórias e atenua a inflamação cólica; seu papel tem sido considerado fundamental dentro do sistema imune da mucosa e amplamente estudado nas DII. A inativação de IL-10 em camundongos resulta em aumento da produção de IL-12 e IFN- γ (Kuhn *et al.*, 1993; Rennick e Fort, 2000). Tecidos inflamados de pacientes com DC apresentam baixa

produção de IL-10 (Schreiber *et al.*, 1993). Recentemente, a produção de IL-10 por células T regulatórias tem sido considerada importante nas DII (Latinne e Fiasse, 2006).

O cólon de animais que receberam Uva ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) apresenta níveis aumentados de produção da IL-10; mesmo tendo sido submetidos à indução de colite por TNBS. Estudos *in vitro* têm mostrado que IL-10 inibe produção de IL-12 (Groux *et al.*, 1993).

Nossos resultados mostraram que a Uva apresenta propriedade antiinflamatória inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, além de atividade imunoregulatória evidenciado pelo aumento na produção de IL-10. O efeito mais interessante apresentado pela Uva foi o aumento da produção dessa interleucina, que pode justificar todos os efeitos antioxidantes e antiinflamatórios, apresentados neste trabalho. Essa interleucina tem um amplo espectro de atividades biológicas, principalmente aquele relativo à inibição de citocinas pró-inflamatórias. Em adição, IL-10 atenua a formação de oxigênio reativo e metabólitos de nitrogênio, além de inibir a expressão da molécula de adesão intercelular-1, MadCAM-1 (Kawachi *et al.*, 2000).

CONCLUSÃO

De acordo com resultados obtidos com Uva foi possível concluir que:

- Uva na concentração de 0,5 g.kg⁻¹ proporcionou *in vitro* aumento na produção de AGCC benéficos para mucosa cólica;
- Além disso, apresentou atividade antiinflamatória ao proteger a mucosa cólica contra colite induzida por TNBS, macroscopicamente diminuiu o número de lesões;
- O mecanismo pelo qual a Uva protegeu a mucosa foi inicialmente comprovado pela atividade antioxidante mantendo os níveis de GSH e modulando enzimas antioxidantes (GSSG-Rd, GSH-Px e SOD);
- Diminuição da expressão dos mediadores pró-inflamatórios (IL-6, IL-12, COX-2, NF-κB, MPO) e da molécula de adesão intestinal MadCAM-1;
- A Uva aumentou a produção da interleucina antiinflamatória IL-10, o que pode explicar a diminuição dos mediadores pró-inflamatórios supracitados.

Segundo os resultados obtidos nesse trabalho e, considerando que um tratamento seguro para as DII se faz necessário, a Uva torna-se candidata promissora no tratamento das DII, principalmente colite ulcerativa.

PERSPECTIVAS

- Analisar a participação da Uva nos receptores do tipo toll (TLR) no tecido inflamado;
- Analisar os tipos e a porcentagem de fibras encontradas na mistura dos vegetais;
- Analisar o conteúdo dos flavonóides presente na amostra estudada;
- Testar a Uva como alimento adicional na dieta de pacientes com DII.

PUBLICAÇÕES REFERENTES À TESE

- **Artigo publicado** (Anexo 1):

- **Título:** Determination of short-chain fatty acids in dietary fiber extracts using ion-exclusion chromatography with suppressed conductivity detection.

- **Revista:** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

- **Ano:** 2009

- **Artigo submetido** (Anexo 2):

- **Título:** Effect of grape supplementation in colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid in the rat.

- **Revista:** Clinical Nutrition

- **Ano:** 2009.



Short communication

Determination of short-chain fatty acids in dietary fiber extracts using ion-exclusion chromatography with suppressed conductivity detection

Jailson C. Dias^a, Erika Suzuki^b, Cibele L. de Albuquerque^c, Anderson L. Ferreira^c,
Alba R.M.S. Brito^c, Lauro T. Kubota^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, University of Campinas – UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^b Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas – UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^c Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, University of Campinas – UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2008

Received in revised form 12 February 2009

Accepted 12 February 2009

Available online 24 February 2009

Keywords:

Ion-exclusion chromatography

Inverse chemical suppression

SCFAs

Dietary fiber

ABSTRACT

A new chromatographic method for the sequential determination of short-chain fatty acids is described. Acetic, propionic and butyric acids were determined in dietary fiber extracts using ion-exclusion chromatography equipped with inverse chemical suppression and conductivity detection. The best optimization of the chromatographic conditions were achieved when a 100 mm × 7.8 mm ion-exclusion column with a solution of 0.5 mmol L⁻¹ sulfuric acid as eluent in a flow rate of 0.6 mL min⁻¹ were employed. The organic acids were sequentially separated in less than 10 min with limits of detection ranging from 1 up to 7.5 μmol L⁻¹ and limits of quantification from 5 up to 25 μmol L⁻¹. The linearity of the analytical response was studied in the range of 0.005–10 mmol L⁻¹ for acetic acid and 0.025–10 mmol L⁻¹ for propionic and butyric acids with coefficients of determination (*R*²) ranging between 0.9985 and 0.9999. The method was tested and proved to be selective, precise, accurate, reproducible and highly sensitive. Finally, the method was applied in the analysis of biological samples.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Dietary fiber (DF) plays an important role as indigestible food components in human nutrition due to their beneficial effects for health. Mainly consisting on non-starch polysaccharides, oligosaccharides and resistant starch, they have water-binding properties thus increasing volume and viscosity of intestinal contents [1–3]. DF are responsible for faecal bulking, enhancing gut motility and lowering transit time. Being indigestible in the small intestine, they finally reach the colon, where they are utilized as fermentation substrates by the gut microflora [4–6]. In the colon, there is a symbiosis through fermentation between the host and intestinal bacteria. The short-chain fatty acids (SCFAs) – acetic, propionic and butyric – released as main microbial fermentation products are rapidly absorbed by the colonic epithelium, which stimulates water and Na⁺ absorption [4,6]. Furthermore, especially butyrate is a preferred substrate for the colonocyte. It serves as an energy source and is known to contribute a trophic effect on colonic mucosa [7–9].

The growing interest in determining the formation of short-chain fatty acids is related to the increasing evidence of their

positive physiological effects [10]. Thus, several analytical techniques have been reported for the determination of these compounds in different matrices. These include methods such as enzymatic with spectrophotometric detector [11,12], chromatographic [13,14] and electrophoretic [15,16]. Enzymatic methods are well recognized for their high specificity, but require large amounts of reagents and are highly time consuming because only one acid can be determined in each assay [13,16]. However, enzymatic methods are sometimes used as a reference method in order to validate chromatographic and electrophoretic methods [17]. Spectrophotometric methods are tedious and there is no data available on the determination of some acids like succinic, citric and acetic [18]. Capillary electrophoresis also has a very good selectivity, but suffers from lower reproducibility in comparison to enzymatic and chromatographic methods [16]. The speed and selectivity of chromatographic techniques have rendered them more useful in the analysis of organic acids. Gas and liquid chromatography with mass spectrometer detectors (GC–MS, LC–MS) have been considered the best methods so far, owing to their robustness, selectivity, sensitivity and high throughput [19,20]. However, these techniques are greatly limited by high cost and complexity of both instruments and sample preparation [18,21]. Reverse-phase and ion-exchange HPLC with UV spectrophotometric detection [22] have been the most widely used, but it requires complex sample preparation procedures. Anion-exchange chromatography with conductivity detection has been used in the past to determine organic acids in

* Corresponding author at: Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, University of Campinas – UNICAMP, P.O. Box 6154, 13083-970 Campinas, SP, Brazil. Tel.: +55 19 3521 3127; fax: +55 19 3521 3023.

E-mail address: kubota@iqm.unicamp.br (L.T. Kubota).

juice and wine [23,24]. It is relatively easy, selective and can sequentially determine organic acids and inorganic anions. This becomes a disadvantage in the analysis of organic acids in a matrix containing inorganic anions, due to both interference and the fact that high concentrations of the inorganic anions will in-turn suppress some of the acids [13].

Moreover, in most methods above mentioned large amounts of organic solvents and reagents that are hazardous to the environment and human health are required. Therefore, a simple and environmentally friendly method would be desired to determine SCFAs with minor pretreatment.

Ion-exclusion chromatographic separation has been commonly used for the determinations of aliphatic organic acids in a variety of matrices as well as non-ionic analytes of significant pharmaceutical interest including alcohols and carbohydrates [18,21,25,26]. In ion-exclusion chromatography, separation is accomplished using dilute mineral acids as mobile phase, to maintain organic acids in their undissociated forms, and separated ions are detected using suppressed or non-suppressed conductometric or UV detection [25].

The current mechanism of ion-exclusion chromatography proposes that the sulfonic groups are fixed mostly on the surface of the polystyrene-divinylbenzene (PS-DVB) resin and form a negatively charged shield on the polymeric surface, often referred to as the "Donnan membrane" [27,28]. This "membrane" separates the moving fraction of the eluent (i.e. the mobile phase) from the static, occluded component of the eluent (i.e. the stationary phase). Once the analytes enter into the column, they interact with the sulfonated PS-DVB copolymer in such way that the dissociated fraction of the analyte is repelled from the vicinity of the "Donnan membrane" into the bulk of the interstitial eluent, while the protonated fraction penetrates the membrane and enters into the occluded fraction of the eluent, where it may experience additional retention by surface adsorption onto the unfunctionalized parts of the resin [27–30]. As higher is the pK_a of an individual acid, the higher is the protonated fraction and consequently the longer is its retention time. Anomalies for analyte acids showing significantly different retention times but having almost identical pK_a values have been explained by the increased hydrophobic character of some acids, which leads to increased hydrophobic adsorption [27–30].

This paper describes an ion-exclusion chromatographic method with inverse chemical suppression for the determination of three organic acids in dietary fiber extracts. The main task of the inverse chemical suppressor is to reduce the self-conductivity of the eluent. This is achieved by using ion-exchange to replace the highly conductive protons by cations with a relatively low conductivity. The conditions that resulted in the best isocratic separation of the organic acids were checked for linearity, precision and accuracy.

2. Experimental

2.1. Reagents

High-purity reagents and deionized water (Millipore, Milli-Q System) were used for all preparations. Standard solutions of the organic acids (acetic, propionic and butyric) were prepared from their sodium salts (analytical-reagent grade; Acros Organics). A mixed 100 mmol L^{-1} stock standard solution was prepared for each organic anion. Calibration standards were prepared from 1 mmol L^{-1} mixed standard solution using a series of dilutions.

2.2. Instrumentation

The determination of the organic acids was performed using the "MIC-2 Advanced" modular IC system (Metrohm AG, Herisau, Switzerland). It is composed of a serial double-piston high-

pressure pumping unit, a two-channel peristaltic pump for use with the Metrohm Suppressor Module, separation center, conductivity detector and an interface to connect with PC. Chromatograms were recorded using the Metrohm IC Net 2.3 software. The system was run in the isocratic mode with the column in the room temperature. Ion-exclusion chromatography with inverse suppression and conductivity detection was used to separate all the organic acids.

For ion-exclusion, samples were injected via a $10 \mu\text{L}$ loop and eluted at a flow rate of 0.6 mL min^{-1} and pressure of 1.1 MPa through a Metrosep 6.1005.210 organic acids analytical column ($100 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm}$, particle size of $10 \mu\text{m}$, with polystyrene-divinylbenzene copolymer packing material functionalized with sulfonic acid groups). Solutions of sulfuric acid and sulfuric acid/acetone were used as eluent at different concentrations. The eluents were filtered through a $0.22 \mu\text{m}$ Millipore paper filter and then degassed by vacuum and ultrasonification. The choice of eluent was mainly guided by their abilities to totally ionize in solution at low concentrations (strong acids or acids which behave as strong acids). It was also guided by their compatibility with the detection mode and polarity. The suppressor system was regenerated by a solution of 50 mmol L^{-1} LiCl solution pumped through a suppressor unit simultaneously with deionized water. The conductivity detector was operated in the positive mode at a full scale of $10.0 \mu\text{S cm}^{-1}$. The peak areas and retention times were recorded and used to calculate chromatographic parameters.

2.3. Source of fibers

Fruits were purchased from organic cultivar. Pumpkins and papaya were cut, dried at 40°C and powdered. Pumpkin seeds and kale were dried at 40°C and powdered. Apples, guavas, plums and grapes were blended and lyophilized. The powders were stored at -20°C .

2.4. Source of faecal bacterial inoculum

Fresh faeces were collected from three rats consuming a normal diet. Faecal samples were diluted 1 g faeces: 6 mL saline phosphate buffered (PBS) pH 7.4.

2.5. Batch-culture fermentation

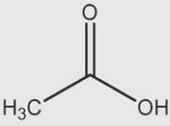
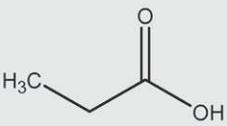
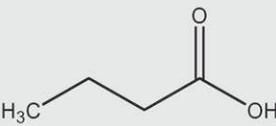
The procedure for *in vitro* fermentation with faecal inoculum was based on Velazquez et al. [5]. Briefly, 0.5 g of fiber was added into a 100 mL sterile bottle. Fibers were hydrated with 40 mL of PBS with the oxygen reducing enzyme supplement (Oxyrase® For Broth, Mansfield, OH, USA) following the manufacturer's instructions. The bottles were tightly closed to maintain anaerobic conditions generated by the enzyme supplement and stored at 4°C for 12–16 h to allow adequate hydration of the fibers.

Each bottle was inoculated with 10 mL of faecal solution and tightly closed. Samples were placed and gently shaken in a water bath kept at 37°C for 24 h. Duplicate aliquots (2 mL) from each substrate bottle were mixed with 1 mL of copper sulfate solution (10 g L^{-1}) to inhibit further microbial growth. Aliquots were frozen at -20°C until preparing for SCFAs analysis. For analysis of SCFAs, samples were centrifuged at 12,000 rpm and 4°C for 15 min.

3. Results and discussion

In order to separate SCFAs listed in Table 1, several parameters were considered in the optimization process of the chromatographic conditions. First, the choice of the stationary phase, and the next step, the mobile phase like the optimal concentration and the flow rate were investigated.

Table 1
Selected SCFAs with their respective pK_a values.

SCFAs	Chemical structure	pK_a (at 25 °C) [36]
Acetic acid		4.76
Propionic acid		4.87
Butyric acid		4.83

The initial assays were carried out with a Metrosep 6.1006.520 *A Supp 5* analytical column (150 mm × 4.0 mm, particle size of 5 μm, with polyvinyl alcohol packing material functionalized with quaternary ammonium groups) using as mobile phase a mixed solution of sodium carbonate and bicarbonate at 3.2 and 1.0 mmol L⁻¹, respectively, according to the column specification supplied by the manufacturer (Metrohm AG). However, in these conditions, it was not possible to separate sequentially SCFAs because the analytes were eluted together from the column and could not be identified. Then, all other experiments were performed on an ion-exclusion column (Metrosep 6.1005.210 organic acids analytical column, previously described), considering the retention mechanism based on Donnan exclusion effects.

Since the instrument was operated in the isocratic mode, variation in the concentrations of the mobile phases was performed in separate runs. Diverse sulfuric acid solutions at different concentrations, ranging between 0.25 and 10 mmol L⁻¹, were tested as eluent, according to the literature data [13,31,32]. In addition, the influence of different percentages of the organic modifier in the mobile phase was also investigated. The last evaluation concerns the optimization of the flow rate.

The optimum concentration of sulfuric acid and the best flow rate that yielded an acceptable isocratic separation of all organic acids in the mixture were 0.5 mmol L⁻¹ and 0.6 mL min⁻¹, respectively.

The influence of an organic modifier on the separation of organic acids has been well documented [24,25,33]. It is thought to contribute to the reduction of the retention of carboxylic acids by the stationary phase due to the lipophilic properties of the alkyl group in the solvents [24,25,33].

In this work, acetone (HPLC grade), with concentrations ranging between 5 and 15%, was tested as an organic modifier in the mobile phase composed by the diluted sulfuric acid solutions. The results indicate that the retention times gradually decreased as the acetone content of the mobile phase was increased, and at an acetone content of 15%, the peak-to-peak separation was incomplete.

Organic solvents are extensively used in chromatography and for this reason they are a matter that has to concern due to the characteristics such as: high flammability, volatility, and toxicity. This is a motivation to eliminate the need of organic modifier solvents in the mobile phase, generating a “green chemistry” ion-exclusion chromatographic method. Therefore, the mobile phase contained 0% acetone (i.e. only sulfuric acid solution at 0.5 mmol L⁻¹) was

selected, considering that, in these conditions, a satisfactory separation was achieved.

Acetic, propionic and butyric acids were determined in fermented extracts of dietary fiber samples using the proposed method. The presence of these compounds was confirmed by comparing their retention times with those of the standards.

The values of pK_a of these acids, shown in Table 1, are similar to each other. However, can be observed from the trend of retention times that an increase in the number of lipophilic carbon atoms for the same functional groups (aliphatic carboxylic acids) increases the hydrophobic interaction between the compounds and the stationary phase, hence an increase in the retention factor, i.e. the retention time of acetic < propionic < butyric [13,26]. Several chromatographic parameters evaluated for the three compounds, including retention time, retention factor, selectivity coefficient, resolution and number of theoretical plates, are shown in Table 2.

The retention factor, k' , which is a measure of the migration rate of the analyte on the column, was calculated as the ratio of the difference between the actual retention time and the dead volume. The dead volume was considered as the distance from the beginning of the chromatogram at time $t = 0$ to the solvent front. The selectivity, α , of the method that is a measure of the separability of two compounds eluting adjacent to each other was calculated according to Eq. (1) [25]:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (1)$$

where k'_2 and k'_1 are the retention factors of two adjacent peaks (compounds).

The quality of separation in each case was evaluated by calculating the resolution, R , of the peaks according to Eq. (2) [25]:

$$R = 2 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{W_{t_1} + W_{t_2}} \quad (2)$$

where t_{R_1} and t_{R_2} are the retention times for the first and second peaks, respectively; W_{t_1} and W_{t_2} are the base widths between the tangents in time unit for the first and second peaks, respectively.

The selectivities and resolutions of the peaks presented in Table 2 are with respect to the previous adjacent peak. For example, the selectivity and resolution of the propionic acid peak is in relation to the acetic acid peak and the butyric acid peak is in relation to the propionic acid peak. All the selectivity coefficients, α , were greater than one, indicating that a mixture of the compounds can be separated. This is acceptable especially in isocratic separations [13,34]. The chromatographic efficiency, representing the ability of

Table 2
The chromatographic parameters evaluated for the selected SCFAs.

Chromatographic parameters	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid
Retention time, t_R (min)	5.21 ± 0.01	6.12 ± 0.01	7.56 ± 0.01
Retention factor, k'	1.13 ± 0.01	1.51 ± 0.01	2.10 ± 0.01
Selectivity coefficient, α	–	1.33 ± 0.01	1.39 ± 0.01
Resolution, R	–	1.98 ± 0.01	1.59 ± 0.01
Theoretical plates, N	3709 ± 15	1765 ± 13	605 ± 2

Table 3
Analytical parameters obtained for the selected SCFAs.

Parameter	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid
Linear range (mmol L ⁻¹)	0.005–10	0.025–10	0.025–10
Sensitivity (mV s L mmol ⁻¹)	6374.4	6127.2	4921.2
Coefficient of determination, R^2	0.9985	0.9999	0.9997
Concentration range (mmol L ⁻¹)	0.1–20	0.05–7	0.04–8
Limit of detection (mmol L ⁻¹)	0.001	0.0075	0.0075
Limit of quantification (mmol L ⁻¹)	0.005	0.025	0.025
Precision (%R.S.D.)	1.06	0.84	0.96
Recovery (%)	98.3 ± 0.8	97.2 ± 1.1	97.4 ± 1.4

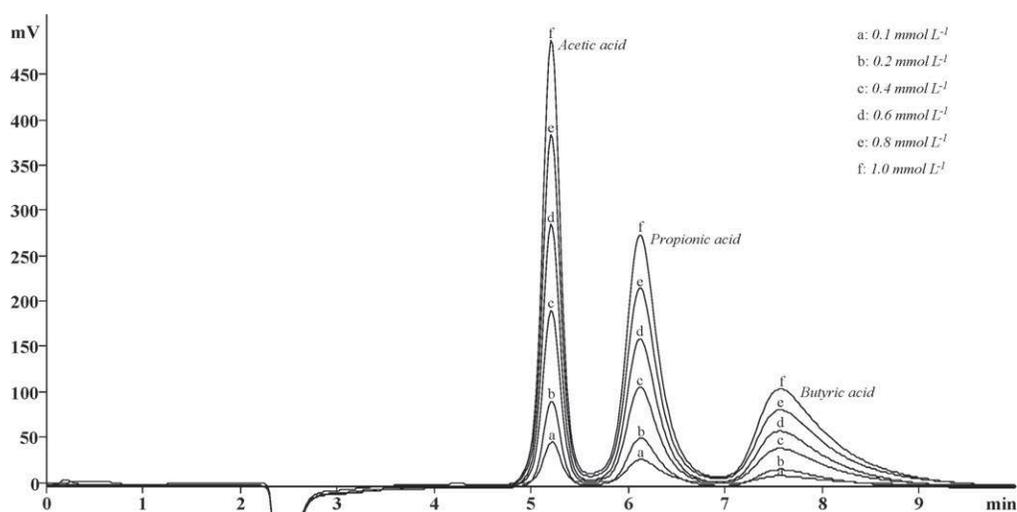


Fig. 1. Merged chromatograms showing the separation of the SCFAs in a gradient of concentration (0.1–1 mmol L⁻¹).

separation with minimal dispersion of the compound, was evaluated through the number of theoretical plates according to Eq. (3) [25]:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_t} \right)^2 \quad (3)$$

where t_R is the retention time of the peak and W_t is the base width between the tangents drawn to each side of the peak.

A typical chromatogram showing the separation of the three SCFAs in a gradient of concentration (0.1–1 mmol L⁻¹) is shown in Fig. 1.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were obtained by using a signal-to-noise ratio of 3:1 and 10:1, respectively. The obtained values are shown in Table 3. The LOD values vary from 1 to 7.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and the LOQ values vary from 5 to 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (without preconcentration). These detection limits are similar or even lower than those observed by other authors

Table 4

Concentrations of the selected SCFAs in a pumpkin sample having seven different compositions.

Sample	SCFAs concentration (mmol L ⁻¹)		
	Acetic	Propionic	Butyric
Pumpkin: 0.50 g of pulp	2.64 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.26 ± 0.01
Pumpkin: 0.40 g of pulp + 0.10 g of seed	12.15 ± 0.01	1.64 ± 0.01	1.81 ± 0.01
Pumpkin: 0.30 g of pulp + 0.20 g of seed	5.21 ± 0.01	0.80 ± 0.01	1.65 ± 0.01
Pumpkin: 0.25 g of pulp + 0.25 g of seed	5.57 ± 0.01	0.90 ± 0.01	1.78 ± 0.01
Pumpkin: 0.20 g of pulp + 0.30 g of seed	11.63 ± 0.01	3.01 ± 0.01	2.24 ± 0.01
Pumpkin: 0.10 g of pulp + 0.40 g of seed	6.07 ± 0.01	0.96 ± 0.01	1.92 ± 0.01
Pumpkin: 0.50 g of seed	13.00 ± 0.01	5.86 ± 0.01	4.33 ± 0.01

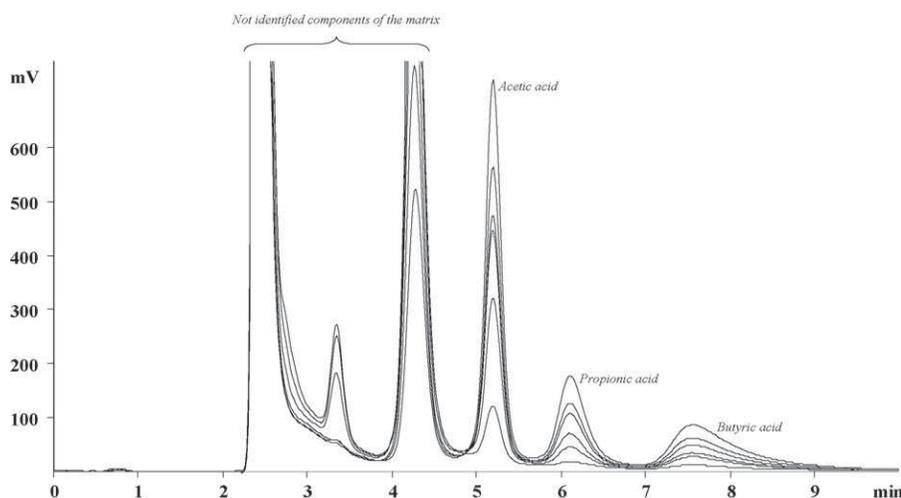


Fig. 2. Merged chromatograms showing the separation of the components (the compounds of the matrix and the SCFAs) of some randomly selected samples.

[10,14,31,32,35]. The linearity of the analytical response was studied for each compound. Table 3 shows the optimum linear response range for each compound. As it can be observed a good linearity was obtained in all cases.

In order to check the precision of the method, seven replicate analysis of a standard solution on different days were performed. The precision expressed in terms of the relative standard deviation (R.S.D.) always remained around 1% for all the studied SCFAs. The accuracy of the method was evaluated from the recovery analysis, preparing spiked samples in quadruplicate at three levels of concentration higher than LOQ. The values obtained in all of the cases, shown in Table 3, were satisfactory from the analytical point of view, although some losses occurred during the experiments have provided results just below of 100%.

The fermented extracts of different dietary fibers, including pumpkin, kale, papaya, apples, guavas, plums and grapes, were analyzed according to the proposed method. In Table 4 are shown the concentrations of the acetic, propionic and butyric acids in a pumpkin sample having seven different compositions. The merged chromatograms, illustrated in Fig. 2, exhibit the separation of the components (the compounds of the matrix and the SCFAs) of some randomly selected samples. As can be seen, practically no impurities or interfering substances were found in the chromatograms, which are similar for all studied samples.

The analytical performance of the proposed method was evaluated by comparison with other methods reported in literature and that has been applied for the analysis of biological samples [10,14,31,32,35]. Thus, the proposed method provides good statistical accuracy and precision, a wide linear range, high sensitivity and satisfactory efficiency. Moreover, this method is simple and rapid with no loss in sensitivity, so it may be recommended for routine analysis, being considered a viable option from the analytical, environmental and economic point of view.

4. Conclusion

An ion-exclusion chromatographic method for the determination of SCFAs has been developed. The described method using the suppressed ion-exclusion chromatography is well suited for the rapid, accurate, precise and sequential determination of acetic, propionic and butyric acids in dietary fiber extracts without any derivatization, giving results in less than 10 min. Moreover, the advantages of this method over the others include its simplicity, low cost of materials and reagents needed for the analysis and the absence of organic modifier solvents in the mobile phase, generating a “green chemistry” ion-exclusion chromatographic method.

The evaluated chromatographic parameters suggested a satisfactory analytical performance of the proposed method, although the number of theoretical plates for butyric acid has been low. However, from the analytical point of view, despite the low chromatographic efficiency obtained for the butyric acid, the sensitivity

of this component was not affected significantly by width of its chromatographic peak.

Finally, this method can be easily applied for routine analysis in scientific laboratories of universities and industries that have interest in these analytes. In addition, the information provided by this new method can also be used for other types of aqueous matrices.

Acknowledgments

This work was supported by the following Brazilian agencies: CAPES, CNPq and FAPESP.

References

- [1] D.J.A. Jenkins, C.W.C. Kendall, T.P.P. Ransom, *Nutr. Res.* 18 (1998) 633–652.
- [2] U. Peters, R. Sinha, N. Chatterjee, A.F. Subar, R.G. Ziegler, M. Kullendorff, R. Bresalier, J.L. Weissfeld, A. Flood, A. Schatzkin, R.B. Hayes, *Lancet* 361 (2003) 1491–1495.
- [3] J. Thebaudin, A.C. Lefebvre, *Trends Food Sci. Technol.* 8 (1997) 41–48.
- [4] P.B. Mortensen, M.R. Clausen, *Scand. J. Gastroenterol.* 31 (1996) 132–148.
- [5] M. Velazquez, C. Davies, R. Marett, J.L. Slavin, J.M. Feirtag, *Anaerobe* 6 (2000) 87–92.
- [6] O.C. Velazquez, H.M. Lederer, J.L. Rombeau, *Adv. Exp. Med. Biol.* 427 (1997) 123–134.
- [7] W.E. Roediger, *Gut* 21 (1980) 793–798.
- [8] S. Salminen, C. Bouley, M.C. Boutron-Ruault, J.H. Cummings, A. Franck, G.R. Gibson, E. Isolauri, M.C. Moreau, M. Roberfroid, I. Rowland, *Br. J. Nutr.* 80 (1998) S147–S171.
- [9] O.C. Velazquez, H.M. Lederer, J.L. Rombeau, *Dig. Dis. Sci.* 41 (1996) 727–729.
- [10] G.H. Zhao, M. Nyman, J.A. Jonsson, *Biomed. Chromatogr.* 20 (2006) 674–682.
- [11] J.L.F.C. Lima, A.O.S.S. Rangel, *Am. J. Enol. Viticult.* 43 (1992) 58–62.
- [12] E. Mataix, M.D.L. de Castro, *Anal. Chim. Acta* 428 (2001) 7–14.
- [13] G.T. Chi, K.D. Huddersman, *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 95–103.
- [14] J. Stein, J. Kulemeier, B. Lembcke, W.F. Caspary, *J. Chromatogr.* 576 (1992) 53–61.
- [15] W.S. Law, J.H. Zha, P.C. Hauser, S.F.Y. Li, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 3247–3254.
- [16] Y.H. Li, B.X. Huang, X.Q. Shan, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 775–780.
- [17] S.A. Kupina, C.A. Pohl, J.L. Gannotti, *Am. J. Enol. Viticult.* 42 (1991) 1–5.
- [18] I. Mato, S. Suarez-Luque, J.F. Huidobro, *Food Res. Int.* 38 (2005) 1175–1188.
- [19] J. Kakola, R. Alen, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1996–2003.
- [20] J.W. Suh, S.H. Lee, B.C. Chung, *Clin. Chem.* 43 (1997) 2256–2261.
- [21] S.K. Johnson, L.L. Houk, J.R. Feng, D.C. Johnson, R.S. Houk, *Anal. Chim. Acta* 341 (1997) 205–216.
- [22] E. Destandau, J. Vial, A. Jardy, M.C. Hennion, D. Bonnet, P. Lancelin, *J. Chromatogr. A* 1088 (2005) 49–56.
- [23] M.C. Bruzzoniti, E. Mentasti, C. Sarzanini, P. Hajos, *J. Chromatogr. A* 770 (1997) 13–22.
- [24] P. Masson, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 387–394.
- [25] P.R. Haddad, P.T. Jackson, *Ion Chromatography: Principles and Applications*, Elsevier Science, Amsterdam, 1990.
- [26] A.L. Medved', A.A. Ivanov, O.A. Shpigun, *J. Anal. Chem.* 51 (1996) 964–971.
- [27] M. Novic, P.R. Haddad, *J. Chromatogr. A* 1118 (2006) 19–28.
- [28] B.K. Glod, *Neurochem. Res.* 22 (1997) 1237–1248.
- [29] K.L. Ng, B. Paull, P.R. Haddad, K. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 850 (1999) 17–27.
- [30] K. Tanaka, P.R. Haddad, in: D.W. Ian (Ed.), *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press, Oxford, 2000, pp. 3193–3201.
- [31] G.G. Ehrlich, D.F. Goerlitz, J.H. Bourell, G.V. Eisen, E.M. Godsy, *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (1981) 878–885.
- [32] M.A. Eiteman, M.J. Chastain, *Anal. Chim. Acta* 338 (1997) 69–75.
- [33] C. Sarzanini, M.C. Bruzzoniti, P. Hajos, *J. Chromatogr. A* 867 (2000) 131–142.
- [34] J.M. Green, *Anal. Chem.* 68 (1996) A305–A309.
- [35] M. Arellano, P. Jomard, S. El Kaddouri, C. Roques, F. Nepveu, F. Couderc, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 741 (2000) 89–100.
- [36] D.R. Lide (Ed.), *Handbook of Chemistry and Physics*, 84th ed., CRC Press, New York, 2004.

1 **Effect of grape supplementation in colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid**
2 **in the rat.**

3

4 Anderson Luiz-Ferreira^{a,*}, Ana Cristina Alves de Almeida^a, Cibele Lima Albuquerque^a,
5 Erika Suzuki^b, Eduardo Augusto Rebelo Socca^a, Jailson Cardoso Dias^c, Lauro Tatsuo
6 Kubota^c, Alba Regina Monteiro Souza Brito^a.

7

8 ^aDepartment of Anatomy, Cell Biology, Physiology and Biophysics, Institute of
9 Biology, State University of Campinas, Campinas, Brazil.

10

11 ^bDepartment of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of
12 Campinas, Campinas, Brazil.

13

14 ^cDepartment of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, State University of
15 Campinas, Campinas, Brazil.

16

17 Short titles: Grape reduces colonic inflammation in rats.

18

19

20 * Corresponding author. Tel.: +55-19-35216192.

21 E-mail addresses: domcarecone@yahoo.com.br (A. Luiz-Ferreira),
22 aninhadabio@yahoo.com.br (A.C.A. Almeida), cibelelima@yahoo.com.br (C.L.
23 Albuquerque), erikinhabio@yahoo.com.br (E. Suzuki), eduardo_socca@yahoo.com.br
24 (E.A.R. Socca), jcarddias@yahoo.com.br (J.C. Dias), kubota@iqm.unicamp.br (L.T.
25 Kubota), abrito@unicamp.br (A.R.M. Souza-Brito).

26 BACKGROUND & AIMS: Grape represents a rich source of proanthocyanidins with a
27 potential to decrease oxidative damage and inflammation within the gastrointestinal
28 tract. The aim of the present study was to further investigate the mechanisms involved
29 in the intestinal anti-inflammatory and antioxidant activities of Grape in an
30 experimental model of rat colitis.

31 METHODS: Colitis was induced in rats by intracolonic administration of TNBS (10
32 mg) dissolved in 0.25 ml of 50% ethanol. Grape was administered orally (0,5 g/kg)
33 suspended in 10 ml/kg of saline for 3 weeks, starting 2 weeks before the administration
34 of TNBS. Colonic damage was evaluated macroscopically and biochemically 1 week
35 after TNBS instillation.

36 RESULTS: Grape ameliorated the development of colonic inflammation as evidenced
37 by a macroscopic inspection. This effect was associated with an increase of GSH levels,
38 maintenance of activity of enzymes (SOD, GSH-Px and GSSG-Rd) and decreases of
39 MPO activity. Grape-treated colitic rats showed a significant decrease in the pro-
40 inflammatory mediators: NF-kappa B and cyclooxygenase-2, than TNBS group. In
41 ELISA assay, Grape presented an inhibitory effect of proinflammatory cytokines (IL-6
42 and IL-12) and increased the production of antiinflammatory cytokine (IL-10).

43 CONCLUSIONS: The effect of the Grape was associated with the antioxidant enzymes
44 activities, modulating production of proinflammatory mediators and cytokines.

45

46 **Keywords:** inflammatory bowel disease; ulcerative colitis; grape; inflammation;
47 cytokines

48

49 **Abbreviations:** TNBS, trinitrobenzene sulfonic acid; MPO, myeloperoxidase; GSH,
50 glutathione; GSSG-Rd, glutathione reductase; GSH-Px, glutathione peroxidase; SOD,

51 superoxide dismutase; IL, interleukin; COX, cyclooxygenase; NF- κ B (nuclear factor
52 kappa B).

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76 **Introduction**

77 A variety of chronic inflammatory diseases occur in the gastrointestinal tract. The most
78 enigmatic is idiopathic inflammatory bowel disease (IBD), which encompasses at least
79 two forms of disease: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC)¹. Although the
80 etiology of IBD remains unknown, oxidative stress, neutrophil infiltration,
81 proinflammatory cytokines and eicosanoid generation are clearly involved in the
82 pathogenesis of intestinal bowel disease².

83 Epidemiologic reports have indicated that consumption of foods rich in polyphenols
84 may be associated with decreased incidence of various diseases³. The use of natural
85 products and dietary components, such as polyphenols, for the prevention of
86 cardiovascular disease, tumors and inflammatory disease is gaining in popularity^{2,4}.
87 Although the beneficial effects of these compounds are clear, relatively few studies
88 have focused on their anti-inflammatory effects and their molecular mechanisms of
89 action in vivo. Limited scientific evidence regarding the effectiveness of these
90 compounds in vivo and their mechanism of action has prevented their incorporation into
91 the mainstream of medical care.

92 Grapes (*Vitis vinifera* L.) contain high concentrations of polyphenols, especially
93 flavonoids. The amount and composition of biologically active compounds present in
94 grapes and grape products vary greatly according to the species, variety, maturity,
95 seasonal conditions, production area and yield of the fruit⁵. The main grape polyphenols
96 are anthocyanins in red grapes and flavan-3-ols in the case of white grapes; red grapes
97 contain more total polyphenols than white grapes. Grape seeds and skins are also an
98 important dietary source of flavonoids, and seeds contain significant amounts of
99 proanthocyanidins or condensed tannins. The composition of the seeds is much more
100 diverse than that of the skins⁵.

101 Given the described chemical composition of grape, they may constitute attractive
102 sources of dietary fiber and other components to be used as a complementary treatment
103 in IBD. The aim of the present study was to test the preventative effects of these fruit
104 usually ingested in Brazilian diet in the trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) model of
105 rat colitis, a well-established model of intestinal inflammation with some resemblance
106 to human IBD⁶. Special attention was paid to its effects on production of some of the
107 mediators involved in the inflammatory response, such as interleukin-6 (IL-6),
108 interleukin-10 (IL-10), interleukin-12 (IL-12), myeloperoxidase (MPO) activity,
109 cyclooxygenase 2 and oxidative status such as glutathione content (GSH), antioxidant
110 enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GSSG-Rd), glutathione
111 peroxidase (GSH-Px),

112

113 **Materials and Methods**

114 **Reagents and animals**

115 All chemicals were purchased from Sigma (Sigma Chemical Co., USA), unless
116 otherwise stated.

117 Male Unib: WH rats (180–250 g) obtained from the breeding of the State University of
118 Campinas (CEMIB/UNICAMP), were used. Animals were fed with a certified Nuvilab
119 CR-diet, with free access to tap water, and were housed on a 12 h light/dark cycle at 60
120 \pm 1% humidity and a temperature of 21 ± 2 °C. The experimental protocols were all
121 approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (no.
122 1188-1, CEEA/IB/UNICAMP).

123

124 **Preparation and administration of the plant material**

125 Organic grape whole was grinding with the aid of a blender, and the resulting juice was
126 submitted to centrifugation. The supernatant (juice) was discarded and the pellets were
127 lyophilized and then were powdered. After obtaining the powder that was used in the
128 dose of 0,5 g/kg. This dose was determinate from fresh faeces collected from rats that
129 consumed a normal diet considering the short chain fatty acid (mainly butyrate)
130 production by ion-exclusion chromatography with suppressed conductivity detection⁷.

131

132 **Evaluation of the intestinal anti-inflammatory effect of grape in TNBS rat colitis**

133 Male Unib: WH rats were randomly assigned to three groups (n=8); two of them (non-
134 colitic and control groups) received no treatment and the other received, orally, daily for
135 3 weeks, 0,5 g/kg per rat weight of grape (suspended in saline 10 ml/kg). Both non-
136 colitic and control groups were given daily 10 ml/kg of saline. Two weeks after the
137 treatment was started, the rats were fasted overnight and those from the control and
138 treated groups were rendered colitic by the method originally described by Morris et al.,
139 1989⁸. Briefly, they were anaesthetized with halothane and given 10 mg of TNBS
140 dissolved in 0.25 ml of 50% ethanol (v/v) by means of a Teflon cannula inserted 8 cm
141 through the anus. Rats from the non-colitic group were administered intracolonicly
142 with 0.25 ml of phosphate-buffered saline instead of TNBS. Body weight was recorded
143 daily throughout the experiment. All rats were killed with an overdose of halothane 1
144 week after induction of colitis, and the colon was removed aseptically and placed on an
145 ice cold plate and was longitudinally opened. The rats were checked daily for
146 behaviour, body weight, and stool consistency.

147

148 **Assessment of colitis**

149 For each animal, the distal 10 cm portion of the colon was removed and cut
150 longitudinally, slightly cleaned in physiological saline to remove faecal residues and
151 weighed. Macroscopic inflammation scores were assigned based on clinical features of
152 the colon (score 0–10: 0 (no damage), 1 (focal hyperaemia), 2 (ulceration without
153 hyperaemia or bowel wall thickening), 3 (ulceration with inflammation at 1 site), 4 (≥ 2
154 sites of ulceration and inflammation), 5 (major sites of inflammation >1 cm along the
155 organ), 6–10 (major sites of inflammation >2 cm along the organ))⁸. The presence of
156 stool consistency (score 0–1) were evaluated according to the criteria of Bobin-
157 Dubigeon et al.⁹ Pieces of inflamed colon were collected subsequently divided into
158 segments and frozen in liquid nitrogen for measurement of biochemical parameters.
159 MPO, GSH, GSSG-Rd, GSH-Px, SOD activity, COX 1 and 2 expression, as well as IL-
160 6, IL-10 and IL-12 levels were determined.

161

162 **Biochemical evaluation of MPO**

163 MPO activity in the colon was measured by the method proposed by Krawisz et al.
164 (1984)¹⁰, with minor modifications, to evaluate neutrophil accumulation. Briefly, the
165 samples were centrifuged at 3 000 g for 15 min at 4 °C. Aliquots of the supernatant
166 were then mixed with a reaction buffer of 50 mM phosphate buffer, pH 6.8, containing
167 0.0005 % hydrogen peroxide and 1.25 mg/mL o-dianisidine dihydrochloride, measured
168 at 460 nm. The changes in absorbance were determined using a microplate reader LB
169 912 (Berthold Technologies GmbH & Co, Germany) and the results were expressed as
170 U/g MPO activity.

171

172 Biochemical evaluation of GSH

173 Total glutathione content was quantified with the recycling assay described by Faure
174 and Lafond (1995)¹¹ and the results were expressed as $\mu\text{mol/g}$ wet tissue.

175

176 Biochemical evaluation of GSSG-Rd, GSH-Px and SOD

177 GSH-Px activity was quantified by following the decrease in absorbance at 365 nm
178 induced by 0.25 mM H_2O_2 in the presence of reduced glutathione (10 mM), NADPH (4
179 mM), and 1 U enzymatic activity of GSSG-Rd according to Yoshikawa et al. (1993)¹².

180 Glutathione reductase activity was measured according to Carlberg and Mannervik
181 (1985)¹³ following decrease in absorbance at 340 nm induced by oxidized glutathione in
182 the presence of NADPH in phosphate buffer, pH 7,8. Absorbance changes were read
183 between 1 and 10 min. SOD activity was analyzed by the reduction of nitroblue
184 tetrazolium using a xanthine-xanthine oxidase system i.e. superoxide generation¹⁴. The
185 changes in absorbance were determined using a microplate reader LB 912 (Berthold
186 Technologies GmbH & Co, Germany) and the results were expressed as mmol/min/mg
187 protein for GSSG-Rd and GSH-Px and as U/mg protein for SOD.

188

189 Isolation of proteins and western blot assay

190 Frozen colonic tissues were weighed and homogenized in ice-cold buffer (50 mM Tris–
191 HCl, pH 7.5, 8 mM MgCl_2 , 5 mM ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N'N'-
192 tetraacetic acid (EGTA), 0.5 mM EDTA, 0.01 mg/ml leupeptin, 0.01 mg/ml pepstatin,
193 0.01 mg/ml aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 250 mM
194 NaCl). Homogenates were centrifuged (12 000 g, 15 min, 4 °C) and the supernatants
195 were collected and stored at – 80 °C. Protein concentration of the homogenate was
196 determined following Bradford's colorimetric method. Aliquots of supernatants

197 containing equal amounts of protein (30 µg) were separated on 10% acrilamide gel by
198 sodium dodecyl sulfatepolyacryamide gel electrophoresis. In the next step, the proteins
199 were electrophoretically transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad
200 Laboratories Inc., Hercules, California, USA) and incubated with specific primary
201 antibodies for COX-1 (1:1000), COX-2 (1:1000) (Cayman Chemical, MI, USA) and
202 NF-kappa B 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, CA, California, USA). Each filter was
203 washed three times for 15 min and incubated with the secondary horseradish peroxidase
204 linked anti-rabbit IgG (Zymed Laboratories, CA, California, USA). To prove equal
205 loading, the blots were analysed for α -tubulin expression using an anti- α -tubulin
206 antibody (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Reactive band were detected with the
207 SuperSignal West Pico chemiluminescent kit (Pearce, Rockford, IL, USA).
208 Densitometric data were studied following normalisation to the control (house-keeping
209 gene). Band intensities were quantitated by optical densitometry (Scion Image software,
210 ScionCorp, Frederick, MD) of the developed autoradiographs.

211

212 **Cytokine determination**

213 Homogenates tissue was centrifuged and the supernatants were stored at -70°C .
214 Cytokine detection was done by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IL-6
215 (DY 506), IL-10 (DY 522) and IL-12 (p70) (DY 419) with the DuoSet kit (R&D
216 Systems, Minneapolis, MN, USA).

217

218 **Statistical analyses**

219 All values in the figures and text are expressed as arithmetic means \pm standard error
220 (S.E.M.). Data were evaluated with Graph Pad Prism[®] Version 5.01 software. The
221 statistical significance of any difference in each parameter among the groups was

222 evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA), using Tukey–Kramer multiple
223 comparisons test as post hoc test. Non-parametric data (score) are expressed as the
224 median (range) and were analysed using the Mann–Whitney U-test. P values of < 0.05
225 were considered statistically significant.

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247 **Results**

248 **Effect of grape supplementation on colonic inflammation**

249 Rats subjected to grape supplementation showed an overall lower impact of TNBS-
250 induced colonic damage compared with the TNBS control group. This was observed in
251 the course of the experiment, because treated rats showed a faster weight recovery than
252 control rats. However, rats from the TNBS control group showed a lower weight gain
253 throughout the experiment in comparison with the rats from the noncolitic group ($P <$
254 0.05). This effect was accompanied by a normalization of food intake and a decreased
255 incidence of diarrhea (21% versus 68% in TNBS control group after 7 days of TNBS
256 administration, $P < 0.05$). The anti-inflammatory effect was evidenced macroscopically
257 by a lower colonic damage score than that of TNBS control group ($P < 0.05$), with a
258 significant reduction in the extent of colonic necrosis and/or inflammation induced by
259 TNBS/ethanol. Treated rats showed a lower colonic weight:length ratio compared with
260 the TNBS control group, which increased as a consequence of the inflammatory process
261 (Table 1).

262

263 **Effect of grape supplementation on tissue GSH levels, GSH-Px, GSSG-Rr, SOD** 264 **and MPO activity in rat with IBD.**

265 Tissue GSH levels increased in group treatment with grape supplementation ($P < 0.01$),
266 in the TNBS group the levels was significantly decreased compared with the control
267 group Sham ($P < 0.01$).

268 In the TNBS group the levels of GSH-Px increased when compared with Sham group (P
269 < 0.001). In the grape group the GSH-Px levels was no difference between Sham group
270 (Table 2). Tissue GSSG-Rd levels increased in the TNBS group when compared with in

271 the Sham group ($P < 0.001$) (Table 2); the grape group also was an increase of this
272 enzyme, however this increase has no statistical difference of the sham group.

273 Other enzyme evaluated was the SOD that in the TNBS group have your activity
274 decreased when compared with Sham group ($P < 0.01$). The treatment with Grape (0,5
275 g/kg) was able to prevent the aggressive effects induced by TNBS and SOD activity
276 was restored ($P < 0.05$) (Table 2). In addition, the lower leukocyte infiltration was also
277 assessed biochemically by the reduction in colonic MPO activity, a marker of neutrophil
278 infiltration that was enhanced in the TNBS control group ($P < 0.001$) (Table 2).

279

280 **Effect of grape supplementation on COX-1, 2 and NF- κ B**

281 The levels of expression of COX-1, COX-2 and NF- κ B were measured by western
282 blotting from colonic mucosa (Fig. 1). As shown in this figure, the levels of COX-1
283 protein remained unchanged in all groups. Exposure of colon to TNBS caused strong
284 expression of COX-2, on the other way grape supplementation induced down-regulation
285 of COX-2 when compared with TNBS group ($p < 0.01$). The levels of expression of
286 NF- κ B p 65 was detected in low quantity in nuclei of normal mucosa whereas a high
287 expression of nuclear factor appeared in colon mucosa from control TNBS-treated rats.
288 Nonetheless, upon treatment with grape supplementation, the protein expression of NF-
289 κ B p65 was drastically decreased. (Fig. 1).

290

291 **Effect of grape supplementation on IL-6, IL-10 e IL-12p70**

292 The TNBS administration induced a significant increase of proinflammatory interleukin
293 IL-6 and IL-12 levels ($P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively) when compared of Sham
294 group while the administration of grape supplementation effectively reduced of both
295 ($P < 0.001$ to both) when compared of TNBS group (Table 3). In addition, the grape

296 supplementation was also effective increasing the levels of anti-inflammatory
297 interleukin IL-10 when compared with TNBS group ($P<0.01$) (Table 3).

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321 **Discussion**

322 The pathogenesis and molecular mechanisms of inflammatory bowel disease (IBD),
323 including ulcerative colitis (CU) and Crohn's disease (CD), are not yet elucidated and
324 are considered to be multifactorial¹⁵. There is growing body of evidence that reactive
325 oxygen species (ROS) play a role in the pathogenesis of CD¹⁶. They contribute to the
326 perpetuation of the inflammatory process by activating redox-sensitive transcription
327 factors that regulate the expression of a variety of inflammatory cytokines, adhesion
328 molecules, and enzymes¹⁷. Therefore, the reduction or elimination of adverse oxidant
329 effects corresponds to a promising therapy for IBD.

330 In order to counteract the harmful effects of ROS, the intestinal mucosa contains an
331 extensive antioxidant defense system that includes adequate amounts of antioxidant
332 enzymes and vitamins¹⁸.

333 The tripeptide glutathione (GSH) is the most important intracellular defense against
334 oxidative stress and is essential for both the functional and structural integrity of the gut.
335 Glutathione may be depleted during inflammatory illness¹⁹. Grape pretreatment partially
336 restored of the GSH depletion that took place as a consequence of the TNBS colonic
337 damage. This can also explain the improvement in the colonic oxidative stress in colitic
338 rats after grape treatment.

339 Many studies have demonstrated that antioxidant defenses, such as GSH-Px, are altered
340 in inflammatory diseases involving the GI tract²⁰. It has been reported that patients with
341 IBD have increased plasma GSH-Px activity²¹. In our present study, we have
342 demonstrated that tissue GSH-Px activity increased in TNBS rat model of IBD. GSH-
343 Px) prevent the formation of free radicals and the initiation of lipid peroxidation²².
344 Grape supplementation the GSH-Px activity was lower, this low activity may be due to
345 the fact that the grape decreased oxidative stress.

346 GSSG-Rd activity significantly increased in the TNBS group compared with the Sham
347 control group. Although elevated GSSG-Rd activity may increase total cell GSH, the
348 high levels of hydroperoxides generated by TNBS metabolites and the parallel increase
349 in GSH-Px may account for the low concentrations of GSH. On the other hand, GSH
350 may also be consumed from direct interaction with TNBS-activated compounds, a well-
351 known mechanism of xenobiotic inactivation²³. Grape supplement increased the GSSG-
352 Rd activity that may justify the maintaining of the highest levels in GHS since the
353 damage in the group was lower.

354 Finally, the SODs that are considered a primary defense against oxidative stress²⁴
355 catalyzes the dismutation of superoxide anion to hydrogen peroxide that is subsequently
356 detoxified to oxygen and water by catalase or glutathione peroxidase²⁴. It is
357 documented that SOD activity decreases in colon of patients with IBD, and since the
358 vascular endothelium produces superoxide in the inflamed mucosa, this would increase
359 tissue injury²⁵. SOD activity significantly decreased in the TNBS compared with the
360 Sham group, in the grape supplement group this activity was restored. These results
361 showed that grape modulates the antioxidant enzymes studied, and considering that
362 ROS is involved in the intestinal mucosal damage²⁶, the grape can be considered as a
363 therapeutic candidate for the treatment of IBD.

364 The beneficial effect was also evaluated biochemically by a decrease in colonic MPO
365 activity, a marker of neutrophil infiltration that has been previously described to be
366 upregulated in experimental colitis¹⁰, and is widely used to detect and follow intestinal
367 inflammatory processes. In consequence, a reduction in the activity of this enzyme can
368 be interpreted as a manifestation of the anti-inflammatory activity of a given
369 compound²⁷. The ability of the grape to reduce granulocyte infiltration was showed by
370 MPO activity reduction, this reduction was lower in treated colitic animals than in the

371 corresponding TNBS control groups. The inhibitory effect on the infiltration of
372 inflammatory cells into the colonic mucosa might account for the beneficial effect of the
373 grape against tissue injury, because margination and extravasation of circulating
374 granulocytes contribute markedly to the colonic injury in this model of IBD²⁸.
375 Additionally, ROS produced by neutrophils and other cell types are now increasingly
376 recognized to be involved in cell signaling and gene expression²⁹. The activation of
377 signaling pathways, such as the nuclear factor kappa B (NF-κB), modulates different
378 steps in the inflammatory response including production of cytokines (IL-6 and IL-12)
379 and other proteins that act as important determinants of colonic damage, such as COX-
380 2³⁰. NF-κB is a key transcriptional regulator of innate and adaptive immunity.
381 Inflammatory bowel disease and experimental intestinal inflammation are characterized
382 by NF-κB activation and increased expression of proinflammatory NF-κB target
383 genes³¹. NF-κB p65 protein was detected in low quantity in nuclei of normal colon
384 mucosa whereas a high nuclear factor expression appeared in colon mucosa from
385 control TNBS-treated rats. Nevertheless, upon treatment with grape, the protein
386 expression of NF-κB p65 was drastically decreased. NF-κB inhibition protects against
387 chronic intestinal inflammation and necrotizing enterocolitis in animal models³¹. In
388 addition, grape treatment was associated with a significantly lower expression of COX-
389 2. This enzyme is in the inducible form and also upregulated in IBD³². COX-2 is
390 expressed as an early response to proinflammatory mediators and mitogen stimuli.
391 Reports in the literature indicate that the active substance, resveratrol isolated from
392 grape, is able to inhibit the expression of COX-2³³.
393 Recent therapeutic approaches involve blockade of inflammatory cytokines. Cytokines
394 are key signals in the intestinal immune system, and are known to participate in the
395 disruption of the so-called normal state of controlled inflammation (physiological

396 inflammation of the gut)³⁴. TNBS-induced colitis is an experimental model which
397 mimics human CD, showing high amounts of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-
398 12, IFN- γ , IL-1) but low levels of immuno-regulatory cytokines, such as IL-10³⁵. In the
399 experiments the levels of cytokines (IL-6 and IL-12) were significantly higher in the
400 animals that received TNBS, for other hand, the levels these interleukin were
401 significantly decreased in the grape group. When we evaluated the proinflammatory
402 cytokine (IL-10) the grape showed an increase significant when compared of TNBS
403 group, suggesting the anti-inflammatory and immunomodulatory effects to grape.

404 Together, our data confirm that grape exerts protective effects in acute experimental
405 colitis. The anti-inflammatory effects seem to be related to module antioxidant
406 enzymes. Grape also reduced the overexpression of COX-2, NF- κ B p65 and IL-6 and
407 IL-12 levels. We conclude that the grape is able to attenuate experimental colitis
408 through a mechanism which involves inhibition of NF- κ B signalling pathways and
409 antioxidant mechanism.

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

478 **Acknowledgements**

479 This study was supported by The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP)
480 and Coordination for the Improvement of Higher Personnel (Capes).

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503 **References**

- 504 1. Hirano D, Kudo SJ. Usefulness of CD4(+)CD45RB(high) CD25(-) Cell-
505 Transferred SCID Mice for Preclinical Evaluation of Drugs for Inflammatory
506 Bowel Disease. *Pharmacol Sci* 2009.
- 507 2. Martín AR, Villegas I, La Casa C, de la Lastra CA. Resveratrol, a polyphenol found
508 in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early
509 colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* 2004; **67**: 1399-410.
- 510 3. Goldberg DM, Hahn SE, Parkes JG. Beyond alcohol: beverage consumption and
511 cardiovascular mortality. *Clin Chim Acta* 1995; **237**: 155–187.
- 512 4. Brakenhielm E, Cao R, Cao Y. Suppression of angiogenesis, tumor growth, and
513 wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. *Faseb J*
514 2001; **15**: 1798–1800.
- 515 5. Girar B & Mazza G (1998) Functional grape and citrus products. In Functional
516 Foods. Biochemical and Processing Aspects, pp. 139–192 [G Mazza, editor].
517 Lancaster, PA: Technomic Publishing Company.
- 518 6. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models
519 of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2007; **2**: 541-6.
- 520 7. Dias JC, Suzuki E, de Albuquerque CL, Ferreira AL, Brito AR, Kubota LT.
521 Determination of short-chain fatty acids in dietary fiber extracts using ion-exclusion
522 chromatography with suppressed conductivity detection. *J Pharm Biomed Anal.*
523 2009; **49**: 1128-32.
- 524 8. Morris G P, Beck P L, Herridge M S, Depew W T, Szewczuk M R, Wallace J L.
525 Hapten induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon.
526 *Gastroenterology* 1989; **96**: 795–803.

- 527 9. Bobin-Dubigeon C, Collin X, Grimaud N, Robert JM, Le Baut G, Petit J.Y. Effects
528 of tumor necrosis factor- α synthesis inhibitors on rat trinitrobenzene sulphonic
529 acid-induced chronic colitis. *Eur J Pharmacol* 2001; **431**: 103–110.
- 530 10. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal
531 inflammation based on myeloperoxidase activity: assessment of inflammation in rat
532 and hamster models. *Gastroenterology* 1984; **87**: 1344–1350.
- 533 11. Faure P, Lafond JL. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a
534 possible indicator of protein oxidation. In: Analysis of free radicals in biological
535 systems. FAVIER A. E. et al. Eds. Verla Bostonp, p. 237-248, 1995..
- 536 12. Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, Tomii T, Kaneko T, Inuma S, et al. Role of active
537 oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal
538 injury induced by indomethacin in rats. *Gut* 1993; **34**: 732-737.
- 539 13. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985; **113**:
540 484–490.
- 541 14. Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell
542 superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1975; **85**: 337-341.
- 543 15. Scholmerich J. New developments in aetiological mechanisms of inflammatory
544 bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; **15**: 585-586.
- 545 16. Grisham MB. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet*
546 1994; **344**: 859–861.
- 547 17. Jourd’heuil D, Morise Z, Conner EM, et al. Oxidants, transcription factors, and
548 intestinal inflammation. *J Clin Gastroenterol*. 1997; **25**: S61-S72.
- 549 18. Halliwell B Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or
550 consequence? *Lancet* 1994; **344**: 721–724.

- 551 19. Oz HS, Chen TS, McClain CJ, de Villiers WJ. Antioxidants as novel therapy in a
552 murine model of colitis. *J Nutr Biochem* 2005; **16**: 297-304.
- 553 20. Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, Weissman
554 GS, Katz S, Floyd RA, McKinley MJ. Increased oxidative stress and decreased
555 antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 1996;
556 **41**: 2078–2086.
- 557 21. Tham DM, Whitin JC, Cohen HJ. Increased expression of extracellular glutathione
558 peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis.
559 *Pediatr Res.* 2002; **51**: 641–6.
- 560 22. Gianetti J, Pedrinelli R, Petrucci R, et al. Inverse association between carotid
561 intima-media thickness and the antioxidant lycopene in atherosclerosis. *Am Heart J*
562 2002; **143**: 467–474.
- 563 23. Nieto N, Torres MI, Fernández MI, Girón MD, Ríos A, Suárez MD, Gil A.
564 Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine.
565 *Dig Dis Sci.* 2000; **45**:1820-7.
- 566 24. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a
567 comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3)
568 gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**: 337-349.
- 569 25. Verspaget HW, Mulder TP, Van der Sluys Veer A, Pena A, Lamers CB: Reactive
570 oxygen metabolites and colitis: a disturbed balance between damage and protection.
571 A selective review. *Scan J Gastroenterol Suppl* **188**: 1991; 44 –51
- 572 26. Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic
573 factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol*
574 *Ther* 2002; **16**: 1997–2015.

- 575 27. Veljaca M, Lesch CA, Pillana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. BPC-15 reduces
576 trinitrobenzene sulfonic-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther*
577 1995; **272**: 417-422.
- 578 28. Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E, Bursztyn M. Experimental colitis is
579 ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. *Gut* 1995; **37**: 247-255.
- 580 29. Kim H, Rhee SH, Kokkotou E, Na X, Savidge T, Moyer MP, Pothoulakis C,
581 LaMont JT. Clostridium difficile toxin A regulates inducible cyclooxygenase-2 and
582 prostaglandin E2 synthesis in colonocytes via reactive oxygen species and
583 activation of p38 MAPK. *J Biol Chem* 2005; **280**: 21237–21245.
- 584 30. Sánchez-Hidalgo M, Martín AR, Villegas I, de la Lastra CA. Rosiglitazone, a
585 PPARgamma ligand, modulates signal transduction pathways during the
586 development of acute TNBS-induced colitis in rats. *Eur J Pharmacol* 2007; **562**:
587 247-58.
- 588 31. Spehlmann ME, Eckmann L. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and
589 destruction. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; **25**: 92-9. Links
- 590 32. Singer II, Kawka DW, Schloemann S, Tessner T, Riehl T, Stenson WF.
591 Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel
592 disease. *Gastroenterology* 1998; **115**: 297–306.
- 593 33. Martín AR, Villegas I, La Casa C, de la Lastra CA. Resveratrol, a polyphenol found
594 in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early
595 colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* 2004; **67**: 1399-1410.
- 596 34. Jump RL, Levine AD. Mechanisms of natural tolerance in the intestine:
597 implications for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; **10**: 462-
598 478.

599 35. Talero E, Sánchez-Fidalgo S, de la Lastra CA, Illanes M, Calvo JR, Motilva V.
600 Acute and chronic responses associated with adrenomedullin administration in
601 experimental colitis. *Peptides* 2008; **29**: 2001-2012.

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626 **Figure and Table legends**

627 Figure 1. Representative Western blot analysis COX-1 and COX-2 (A) and NF- κ B (B)
 628 proteins. Densitometric data were studied following normalization to the control (α -
 629 tubulin house-keeping gene). The results are representative of three experiments
 630 performed on different samples and data are expressed as mean \pm S.E.M. *** $P < 0.01$
 631 significantly different from sham. ⁺⁺⁺ $P < 0.01$ significantly different from TNBS group.

632

633 Table 1. Quantified parameters after administration of Grape (0,5 g/kg p.o.) in rats with
 634 acute colitis induced by TNBS intracolonic instillation (10 mg/animal). Colonic
 635 parameters were quantified in the sham group ($n = 8$), which received saline instillation.
 636 TNBS group ($n = 8$) received TNBS intracolonicly in a vehicle of 50% (v/v) ethanol.
 637 ^a $P < 0.05$ and ^b $P < 0.001$, significantly different from sham; ^c $P < 0.05$ ^d $P < 0.01$ and ^e P
 638 < 0.001 , significantly different from TNBS.

639

640 Table 2. GSH, GSP-Px, GSS-Rd levels and MPO after Grape (0,5 g/kg p.o.
 641 respectively) in rats with acute colitis produced by TNBS intracolonic instillation
 642 (10 mg/kg). All parameters were quantified in the absence of treatment, but with daily
 643 administration of the vehicle saline solution (sham ($n = 8$) and TNBS ($n = 8$) groups), or
 644 in the presence of Grape (0,5 mg/kg/day p.o., $n = 8$). Data are expressed as
 645 mean \pm S.E.M. ^a $p < 0.01$ and ^b $P < 0.001$, significantly different from sham; ^c $P < 0.05$,
 646 ^d $P < 0.01$ and ^e $P < 0.001$ significantly different from TNBS.

647

648 Table 3. IL-6, IL-10 and IL-12 production after Grape (0,5 g/kg p.o. respectively) in rats
 649 with acute colitis produced by TNBS intracolonic instillation (10 mg/kg). All
 650 parameters were quantified in the absence of treatment, but with daily administration of

651 the vehicle saline solution (sham ($n = 8$) and TNBS ($n = 8$) groups), or in the presence of
652 Grape (0,5 mg/kg/day p.o., $n = 8$). Data are expressed as mean \pm S.E.M. ^a $p < 0.01$ and
653 ^b $p < 0.001$, significantly different from sham; ^c $p < 0.01$ and ^d $p < 0.001$ significantly
654 different from TNBS.

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

Group	<i>n</i>	Lesions (score)	Body weight changes (g)	Diarrhoea (score 0-1)	Colon weight/length (g.cm⁻¹)
Sham	8	0	156.5 ± 7.4	0.0	7.4 ± 1.4 ^e
TNBS	8	7.0 (6.0 – 7.0)	134.6 ± 5.0 ^a	0.7 ± 0.1 ^b	14.5 ± 5.6 ^b
Grape	8	6.0 (5.0 – 7.0) ^c	139.5 ± 5.1	0.2 ± 0.1 ^d	13.6 ± 4.9 ^b

Table 1

Table 2

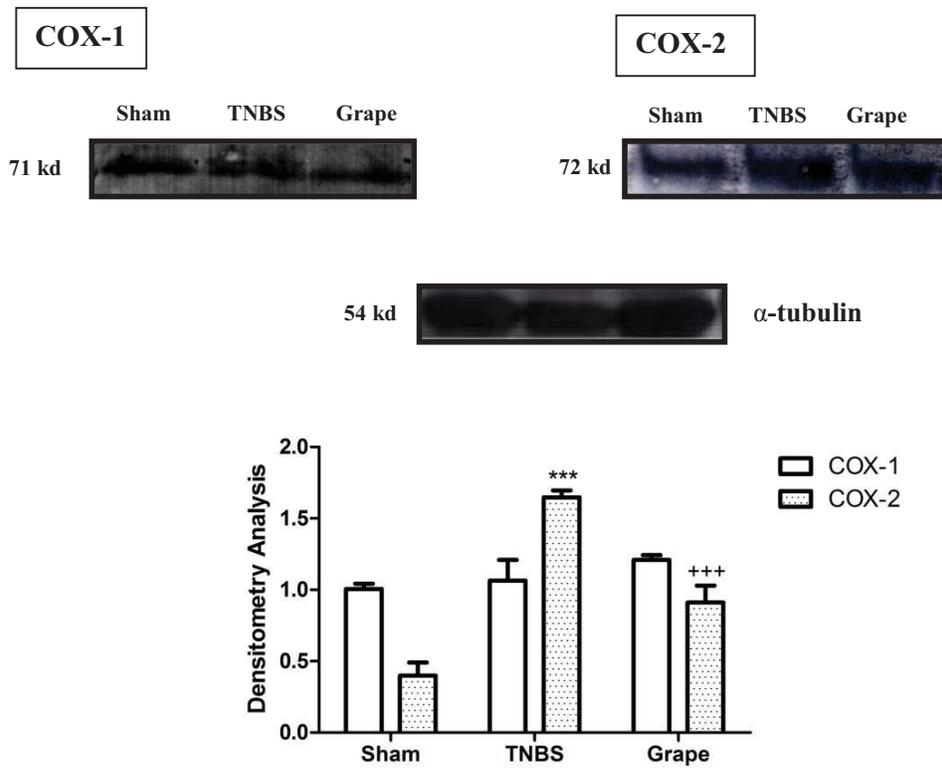
Group	GSH ($\mu\text{mol/g}$ of protein)	GSH-Px (mmol/min/mg protein)	GSSG-Rd (mmol/min/mg protein)	SOD (U/mg protein)	MPO activity (U/ g protein)
Sham	0.39 ± 0.02	6.2 ± 1.1^e	5.9 ± 1.6^e	5.7 ± 0.8^d	23.4 ± 1.4^e
TNBS	0.24 ± 0.01^a	13.0 ± 0.7^b	10.6 ± 1.5^b	2.8 ± 0.3^a	80 ± 4.2^b
Grape	0.42 ± 0.04^d	7.6 ± 0.5^d	7.2 ± 0.9^d	4.5 ± 0.3^c	$53.2 \pm 2.2^{b,d}$

Table 2

Group	IL-6 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-12 (pg/mL)
Sham	152.0 ± 3.3 ^d	98.6 ± 8.1	58.3 ± 6.5 ^d
TNBS	229.7 ± 11.2 ^b	110.8 ± 16.5	181.7 ± 10.5 ^b
Grape	174.9 ± 7.9 ^d	164.2 ± 9.0 ^{b,c}	114.9 ± 10.9 ^{a,d}

Table 3

A



B

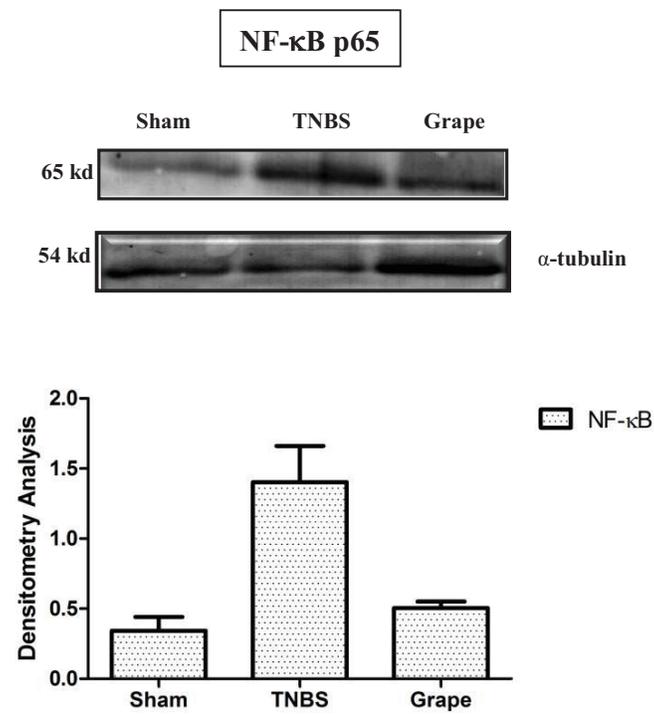


Figure 1

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. Can Food forestall aging? **Agric. Res.**, 14: 17, 1999.
- AHMAD, M.S.; KRISHNAN, S.; RAMAKRISHNA, B.S.; MATHAN, M.; PULIMOOD, A.B.; MURTH, S.N. Butyrate and glucose metabolism by colonocytes in experimental colitis in mice. **Gut**, 46: 493-499, 2000.
- AKERBOOM, T.P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol.**, 77: 373-382, 1981.
- ALEX, P.; ZACHOS, N.C.; NGUYEN, T.; GONZALES, L.; CHEN, T.E.; CONKLIN, L.S.; CENTOLA, M.; LI, X. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. **Inflamm. Bowel. Dis.** 15: 341-52, 2009.
- ALSTEAD, E.M. The pill: safe sex and Crohn's disease?. **Gut**, 45: 165–166, 1999.
- ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymol.**, 113: 548-555, 1985.
- ARAKI, Y.; ANDOH, A.; FUJIYAMA, Y.; ITOH, A. ,BAMBA, 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.**, 9: 627-631, 2002.
- ARDIZZONE, S.; BIANCHI PORRO, G. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. **J. Intern. Med.**, 252: 475-96, 2002.
- ARELLANO, M.; KADDOURI, S.; ROQUES, C.; COUDERC, F.; PUIG, P.H. Capillary electrophoresis and indirect UV detection as a fast and simple analytical tool for bacterial taxonomy. **J. Chromatogr.A**, 781: 497-501, 1997.
- ATREYA, I.; ATREYA, R.; NEURATH, M.F. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. **Intern. Med.**, 263: 591-6, 2008.
- ATREYA, R.; MUDTER, J.; FINOTTO, S.; MÜLLBERG, J.; JOSTOCK, T.; WIRTZ, S.; SCHÜTZ, M.; BARTSCH, B.; HOLTMANN, M.; BECKER, C.; STRAND, D.; CZAJA, J.; SCHLAAK, J.F.; LEHR, H.A.; AUTSCHBACH, F.; SCHÜRMAN, G.; NISHIMOTO, N.; YOSHIZAKI, K.; ITO, H.; KISHIMOTO, T.; GALLE, P.R.; ROSE-JOHN, S.; NEURATH, M.F. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. **Nat. Med.** 6:583-588, 2000.

- BABBS, C.F. Oxygen radicals in ulcerative colitis, **Free Radic. Biol. Med.**, 13: 169–181, 1992.
- BACH, J.F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. **N Engl J Med.**, 347: 911-920, 2002.
- BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A.; WURTELE, E.S.; BOLLINGER, W.H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, 228:1154-60, 1985.
- BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med.**, 336:1066-1071, 1997.
- BARRETT, J.C.; HANSOUL, S.; NICOLAE, D.L.; CHO, J.H.; DUERR, R.H.; RIOUX, J.D.; BRANT, S.R.; SILVERBERG, M.S.; TAYLOR, K.D.; BARMADA, M.M.; BITTON, A.; DASSOPOULOS, T.; DATTA, L.W.; GREEN, T.; GRIFFITHS, A.M.; KISTNER, E.O.; MURTHA, M.T.; REGUEIRO, M.D.; ROTTER, J.I.; SCHUMM, L.P.; STEINHART, A.H.; TARGAN, S.R.; XAVIER, R.J.; NIDDK IBD GENETICS CONSORTIUM.; LIBIOULLE, C.; SANDOR, C.; LATHROP, M.; BELAICHE, J.; DEWIT, O.; GUT, I.; HEATH, S.; LAUKENS, D.; MNI, M.; RUTGEERTS, P.; VAN GOSSUM, A.; ZELENKA, D.; FRANCHIMONT, D.; HUGOT, J.P.; DE VOS, M.; VERMEIRE, S.; LOUIS, E.; BELGIAN-FRENCH IBD CONSORTIUM.; WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM.; CARDON, L.R.; ANDERSON, C.A.; DRUMMOND, H.; NIMMO, E.; AHMAD, T.; PRESCOTT, N.J.; ONNIE, C.M.; FISHER, S.A.; MARCHINI, J.; GHORI, J.; BUMPSTEAD, S.; GWILLIAM, R.; TREMELLING, M.; DELOUKAS, P.; MANSFIELD, J.; JEWELL, D.; SATSANGI, J.; MATHEW, C.G.; PARKES, M.; GEORGES, M.; DALY, M.J. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. **Nat. Genet.**, 40: 955–962, 2008.
- BAUDITZ, J.; WEDEL, S.; LOCHS, H. Thalidomide reduces tumour necrosis factor alpha and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease. **Gut**, 50: 196-200, 2002.
- BAUGH, M.D.; PERRY, M.J.; HOLLANDER, A.P.; DAVIES, D.R.; CROSS, S.S.; LOBO, A.J.; TAYLOR, C.J.; EVANS, G.S. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 117: 814-822, 1999.
- BAUR, J.A.; SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. **Nat. Rev. Drug Discov.**, 5:493–506, 2006.
- BELL, C.J.; GALL, D.G.; WALLACE, J.L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **Am. J. Physiol.**, 268: G622-630, 1995.

- BENGMARK, S. Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NF{ κ }B, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. **J. Parenter. Enteral. Nutr.**, 30: 45–51, 2006.
- BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; MANDELI, K.K.; PEREIRA, M.A.; FATURI, J.L. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: Revisão. *Rev. Bras.Coloproct.*, 23: 172-182, 2003.
- BONEN, D.K.; CHO, J.H.; The genetics of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 124: 521-536, 2003
- BOBIN-DUBIGEON, C.; COLLIN, X.; GRIMAUD, N.; ROBERT, J.M.; LE BAUT, G.; PETIT, J.Y. Effects of tumor necrosis factor synthesis inhibitors on rat trinitrobenzene sulphonic acid-induced chronic colitis. **Eur. J. Pharmacol.**, 42: 103–110, 2001.
- BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nat. Rev. Immunol.**, 3: 521-533, 2003.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding 4. **Anal.Biochem.**, 72: 248-254, 1976.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, 56: 317–33, 1998.
- BRISKIN, M.; WINSOR-HINES, D.; SHYJAN, A.; COCHRAN, N.; BLOOM, S.; WILSON, J.; MCEVOY, L.M.; BUTCHER, E.C.; KASSAM, N.; MACKAY, C.R.; NEWMAN, W.; RINGLER, D.J. Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. **Am. J. Pathol.**, 151: 97–110, 1997.
- CAMARGO PENTEADO, V. (2009). Análise da ação da mistura de fibras vegetais sobre a mucosa intestinal de animais submetidos ao modelo de colite. Dissertação de Mestrado não publicada. Universidade Estadual de Campinas.
- CAMUESCO, D.; COMALADA, M.; RODRÍGUEZ-CABEZAS, M.E.; NIETO, A.; LORENTE, M.D.; CONCHA, A.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. **Br. J. Pharmacol.**, 143: 908–918, 2004.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol.**, 113: 484-490, 1985.

- CARTY, E.; DE BRABANDER, M.; FEAKIN, R.M.; RAMPTON, D.S. Measurement of in vivo rectal mucosal cytokine and eicosanoid production in ulcerative colitis using filter paper. **Gut**, 46: 487–492, 2000.
- CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J.; THAYER, W.R.; MERKAL, R.S.; COUTU, J.A. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease I. An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. **Dig. Dis. Sci.**, 29: 1073-1079, 1984.
- CHO, J.H. The Nod2 gene in Crohn's disease: implications for future research into the genetics and immunology of Crohn's disease. **Inflamm. Bowel Dis.**, 7: 271-5, 2001.
- CHO, J.H. Significant role of genetics in IBD: the NOD2 gene. **Rev. Gastroenterol. Disord.**, 3:S18-S22, 2003.
- CHO, J.H.; ABRAHAM, C. Inflammatory bowel disease genetics: Nod2. **Annu. Rev. Med.**, 58: 401-416, 2007.
- CHO, J.Y.; CHANG, H.J.; LEE, S.K.; KIM, H.J.; HWANG, J.K.; CHUN, H. S. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of β -caryophyllene, a sesquiterpene **Life Science**, 80: 932-939, 2007.
- CHU, F.F.; ESWORTHY, R.S.; DOROSHOW, J.H. Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. **Free Radic. Biol. Med.**, 36:1481-1495, 2004.
- CHUNG, C.K.; KOO, H.N.; CHUNG, K.Y.; SHIN, T.; KIM, H.R.; CHAE, H.J.; AN N.H.; KIM, C.H.; KIM, H.M. Inhibitory effect of sodium salicylate on nitric oxide production from TM4 sertoli cells. **Int. J. Immunopharmacol.**, 2000, 22: 685-92.
- COHEN, S.; KESSLER, R.C.; GORDON, L.U. **Measuring stress. A guide for health and social scientists.** New York: Oxford, 1997.
- COLLINS, S.M. Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, 280: G315-318, 2001.
- CONNER, E.M.; GRISHAM, M.B. Inflammation, free radicals, and antioxidants. **Nutrition**, 12: 274-2777, 1996.
- CONNOR, E.M.; EPIHIMER, M.J.; MORISE, Z.; GRANGER, D.N.; GRISHAM, M.B. Expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in acute and chronic inflammation. **J. Leukoc. Biol.**, 65: 349–355, 1999.
- CREED, T.J.; PROBERT, C.S.; NORMAN, M.N.; MOORGHEN, M.; SHEPHERD, N.A.; HEARING, S.D.; DAYAN, C.M: Basiliximab for the treatment of steroid-resistant

- ulcerative colitis: further experience in moderate and severe disease. **Aliment Pharmacol. Ther.**, 23: 1435–1442, 2006.
- CUMMINGS, J.H. Short chain fatty acids in the human colon. **Gut**, 22: 763-779, 1981.
- CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; SERRAINO, I.; DUGO, L.; CENTORRINO, T.; CICCOLO, A.; SAUTEBIN, L.; CAPUTI, A.P. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor reduces the severity of experimental colitis induced by dinitrobenzene sulfonic acid in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 431: 91–102, 2001.
- D'ARGENIO, G.; MAZZACA, G. Short chain fatty in the huma colon. Relation to inflammatory bowel disease and colon cancer. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 472: 149-158, 1999.
- DANESE, S.; DE LA MOTTE, C.; STURM, A.; VOGEL, J.D.; WEST, G.A.; STRONG, S.A.; KATZ, J.A.; FIOCCHI, C. Platelets trigger a CD40-dependent inflammatory response in the microvasculature of inflammatory bowel disease patients. **Gastroenterology**, 124: 1249-1264, 2003a.
- DANESE, S.; FIOCCHI, C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World J. Gastroenterol.**, 12: 4807-12, 2006.
- DANESE, S.; KATZ, J.A.; SAIBENI, S.; PAPA, A.; GASBARRINI, A.; VECCHI, M.; FIOCCHI, C. Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients. **Gut**, 52: 1435-1441, 2003b.
- DANESE, S.; SANS, M.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. **Autoimmun. Rev.**, 5: 394-400, 2004.
- DE LA LASTRA, C.A.; VILLEGAS, I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. **Mol. Nutr. Food Res.**, 49: 405–430, 2005.
- DELHALLE S, BLASIIUS R, DICATO M, DIEDERICH M. A beginner's guide to NF-kappa B signaling pathways. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1030: 1–13, 2004.
- D'HAENS, G.R.; GEBOES, K.; PEETERS, M.; BAERT, F.; PENNINCKX, F.; RUTGEERTS, P. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. **Gastroenterology**, 114: 262-267, 1998.
- DIAS, A.S.; PORAWSKI, M.; ALONSO, M.; MARRONI, N.; COLLADO, P.S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Quercetin decreases oxidative stress, NF- κ B activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Nutr.**, 135: 2299–2304, 2005.

- DIJKSTRA, G.; MOSHAGE, H.; JANSEN, P.L. Blockade of NFkappaB activation and donation of nitric oxide: new treatment options in inflammatory bowel disease? **Scand. J. Gastroenterol.**, 236: 37–41, 2002.
- DREWE, E.; POWELL, R.J. Clinically useful monoclonal antibodies in treatment. **J. Clin. Pathol.**, 55: 81-85, 2002.
- DUBUQUOY, L.; DHARANCY, S.; NUTTEN, S.; PETTERSSON, S.; AUWERX, J.; DESREUMAUX, P. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. **Lancet**, 2: 1410–1418. 2002.
- DUERR, R.H. Update on the genetics of inflammatory bowel disease. **J. Clin. Gastroenterol.**, 37: 358-367, 2003.
- DUERR, R.H.; TAYLOR, K.D.; BRANT, S.R.; RIOUX, J.D.; SILVERBERG, M.S.; DALY, M.J.; STEINHART, A.H.; ABRAHAM, C.; REGUEIRO, M.; GRIFFITHS, A.; DASSOPOULOS, T.; BITTON, A.; YANG, H.; TARGAN, S.; DATTA, L.W.; KISTNER, E.O.; SCHUMM, L.P.; LEE, A.T.; GREGERSEN, P.K.; BARMADA, M.M.; ROTTER, J.I.; NICOLAE, D.L.; CHO, J.H. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. **Science**, 314: 1461-1463, 2006.
- EASTWOOD, MA. A molecular biological basis for the nutritional and pharmacological benefits of dietary plants. **Q.J.M.**, 94:45–48, 2001.
- ELSON, C.O.; CONG, Y.; WEAVER, C.T.; SCHOEB, T.R.; MCCLANAHAN, T.K.; FICK, R.B.; KASTELEIN, R.A. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. **Gastroenterology**, 132: 2359–2370, 2007.
- ELSON, C.O.; SARTOR, R.B.; TENNYSON G.S.; RIDDELL, R.H. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 109: 1344–1367, 1995.
- ESWORTHY, R.S.; CHU, F.F.; GEIGER, P.; GIROTTI, A.W.; DOROSHOW, J.H. .Reactivity of plasma glutathione peroxidase with hydroperoxide substrates and glutathione. **Arch. Biochem. Biophys.**, 307: 29-34, 1993.
- EVANS, M.J.; ECKERT, A.; LAI, K.; ADELMAN, S.J.; HARNISH, D.C. Reciprocal antagonism between estrogen receptor and NF-kappaB activity in vivo. **Circ. Res.**, 89: 823-30, 2001.
- FARKAS, S.; HERFARTH, H.; ROSSLE, M.; SCHROEDER, J.; STEINBAUER, M.; GUBA, M.; BEHAM, A.; SCHOLMERICH, J.; JAUCH, K.W.; ANTHUBER, M. Quantification of mucosal leucocyte endothelial cell interaction by in vivo fluorescence microscopy in experimental colitis in mice. **Clin. Exp. Immunol.**, 126:250–258, 2001.

- FARKAS, S.; HORNING, M.; SATTLER, C.; EDTINGER, K.; STEINBAUER, M.; ANTHUBER, M.; SCHLITT, H.J.; HERFARTH, H.; GEISSLER, E.K. Blocking MAdCAM-1 in vivo reduces leukocyte extravasation and reverses chronic inflammation in experimental colitis. **Int. J. Colorectal Dis.**, 21: 71-78, 2006.
- FEAGAN, B.G.; GREENBERG, G.R.; WILD, G.; FEDORAK, R.N.; PARE, P.; MCDONALD, J.W.; DUBE, R.; COHEN, A.; STEINHART, A.H.; LANDAU, S.; AGUZZI, R.A.; FOX, I.H.; VANDERVOORT, M.K. Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. **N. Engl. J. Med.**, 352: 2499-507, 2005.
- FERRAZ, J.G.; SHARKEY, K.A.; REUTER, B.K.; ASFAHA, S.; TIGLEY, A.W.; BROWN, M.L.; MCKNIGHT, W.; WALLACE, J.L. Induction of cyclooxygenase 1 and 2 in rat stomach during endotoxemia: role in resistance to damage. **Gastroenterology**, 113: 195-204, 1997.
- FIOCCHI, C. **The normal intestinal mucosa: a state of “controlled inflammation”**. In: TARGAN, S.R.; SHANAHAN, F, editors. Inflammatory Bowel Disease. From Bench to Bedside. Second edition ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 101-120, 2003.
- FLICKINGER, E.A.; WOLF, B.W.; GARLEB, K.A.; CHOW, J.; LEYER, G.J.; JOHNS, P.W.; FAHEY, G.C. Glucose-based oligosaccharides exhibit different in vitro fermentation patterns and affect in vivo apparent nutrient digestibility and microbial populations in dogs. **J. Nutr.**, 130:1267-73, 2000.
- FONG, S.; JONES, S.; RENZ, M.E.; CHIU HH RYAN, A.M.; PRESTA, L.G.; JACKSON, D. Mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1). Its binding motif for alpha 4 beta 7 and role in experimental colitis. **Immunol. Res.**, 16: 299–311, 1997.
- FREI, B.; HIGDON, J.V. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. **J. Nutr.**, 133: 3275S–3284S, 2003.
- FUSS, I.J.; HELLER, F.; BOIRIVANT, M.; LEON, F.; YOSHIDA, M.; FICHTNER-FEIGL, S.; YANG, Z.; EXLEY, M.; KITANI, A.; BLUMBERG, R.S.; MANNON, P.; STROBER, W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. **J. Clin. Invest.**, 113: 1490-1497, 2004.
- GABURRI, P.D.; CHEBLI J.M.F.; CASTRO, L.E.V.V.; FERREIRA, J.O.D.; LOPES, M.H.M.; RIBEIRO, A.M.B.; ALVES, R.A.; FROEDE, E.C.; OLIVEIRA, K.S.; GABURRI, A.K.; GABURRI, D.; MEIRELLES, G.S.P.; SOUZA, A.F.M. Epidemiologia, aspectos clínicos e evolutivos da doença de Crohn: estudo de 60 casos. **Arq. Gastroenterol.**, 35: 240-246, 1998.
- GALVEZ, J.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M.E.; ZARZUELO, A. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. **Mol. Nutr. Food Res.**, 49: 601-608, 2005.

- GASCHE, C. Complications of inflammatory bowel disease. **Hepatogastroenterology**, 47: 49-56, 2000.
- GASSULL MA. Review article: the intestinal lumen as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. **Aliment Pharmacol. Ther.**, 24:90-95, 2006.
- GIRAR, B.; MAZZA, G. **Functional grape and citrus products**. In MAZZA, G, editor. *Functional Foods. Biochemical and Processing Aspects*, Lancaster, PA: Technomic Publishing Company, 139–192, 1998.
- GIRARDIN, S.E.; HUGOT, J.P.; SANSONETTI, P.J. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. **Trends Immunol.**, 24: 652-658, 2003.
- GOÑI I. Indigestible components of grape seeds modify cecal enzyme activity in rats. **Ann. Nutr. Metab.**, 48: 369-73, 2004.
- GOLDMAN, M, MARCHANT A, AND SCHANDENE L. Endogenous interleukin-10 in inflammatory disorders: regulatory roles and pharmacological modulation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 796: 282-293, 1996.
- GOMOLLÓN F, LÓPEZ SG. Treatment with anti-TNFalpha agents in Crohn's disease: what drug we have to use and when? **Acta Gastroenterol Latinoam.**, 38: 133-145, 2008
- GRISHAM, M.B.; GRANGER, D.N. Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. **Dig. Dis. Sci.**, 33: 6S–15S, 1988.
- GRISHAM, M.B.; VOLKMER, C.; TSO, P.; YAMADA, T. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. **Gastroenterology**, 101: 540-547, 1991.
- GROUX, H.; O'GARRA, A.; BIGLER, M.; ROULEAU, M.; ANTONENKO, S.; DE VRIES, J. E.; RONCAROLO, M.G. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature**, 389: 737–742, 1997.
- GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, 361: 512-519, 2003.
- GUSLAND, M Microcirculation in inflammatory bowel diseases. **Int. J. Colorectal. Dis.** 14:265, 1999.
- HALTER, F.; TARNAWSKI, A.S.; SCHMASSMANN, A.; PESKAR, B.M. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. **Gut**, 49: 443-53, 2001.
- HAN, W.; MERCENIER, A.; AIT-BELGNAOUI, A.; PAVAN, S.; LAMINE, F.; VAN SWAM, I.I.; 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.** 12:1044-1052, 2006.
- HANAUER, S.B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflamm. Bowel Dis.** 12 Suppl 1: S3-9, 2006.
- HANAUER, S.B.; SANDBORN, W. Management of Crohn's disease in adults. **Am. J. Gastroenterol.**, 96: 635-43, 2002.
- HART, A.; KAMM, M.A. Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 16: 2017-28, 2002.
- HART, A.L.; AL-HASSI, H.O.; RIGBY, R.J.; BELL, S.J.; EMMANUEL, A.V.; KNIGHT, S.C.; KAMM, M.A.; STAGG, A.J. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, 129: 50-65, 2005.
- HEISS, C.; KLEINBONGARD, P.; DEJAM, A.; PERRÉ, S.; SCHROETER, H.; SIES, H.; KELM, M. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. **J Am. Coll. Cardiol.**, 46:1276–83, 2005.
- HUGOT, J.P.; CHAMAILLARD, M.; ZOUALI, H.; LESAGE, S.; CEZARD, J.P.; BELAICHE, J.; ALMER, S.; TYSK, C.; O'MORAIN, C.A.; GASSULL, M.; BINDER, V.; FINKEL, Y.; CORTOT, A.; MODIGLIANI, R.; LAURENT-PUIG, P.; GOWER-ROUSSEAU, C.; MACRY, J.; COLOMBEL, J.F.; SAHBATOU, M.; THOMAS, G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, 411: 599-603, 2001.
- IGARTUBURU, J.M.; PANDO, E.; RODRÍGUEZ LUIS, F.; GIL-SERRANO, A. A Hemicellulose B Fraction from Grape Skin (*Vitis vinifera*, Palomino Variety). **J. Nat. Prod.**, 64: 1174–1178, 2001.
- IGARTUBURU, J.M.; MASSANET, G.M.; MONTIEL, J.A.; PANDO, E.; RODRÍGUEZ LUIS, F. **Grasas y Aceites**, , 38: 220–223, 1987.
- INA, K.; ITOH, J.; FUKUSHIMA, K.; KUSUGAMI, K.; YAMAGUCHI, T.; KYOKANE K IMADA, A.; BINION, D.G.; MUSSO, A.; WEST, G.A.; DOBREA, G.M.; MCCORMICK, T.S.; LAPETINA, E.G.; LEVINE, A.D.; OTTAWAY, C.A.; FIOCCHI, C. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. **J. Immunol.**, 163: 1081-1090, 1999.
- INOHARA, N.; OGURA, Y.; FONTALBA, A.; GUTIERREZ, O.; PONS, F.; CRESPO, J.; FUKASE, K.; INAMURA, S.; KUSUMOTO, S.; HASHIMOTO, M.; FOSTER, S.J.; MORAN, A.P.; FERNANDEZ-LUNA, J.L.; NUÑEZ, G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. **J. Biol. Chem.**, 278: 5509-5512, 2003.

- IRVING, P.M.; PASI, K.J.; RAMPTON, D.S. Thrombosis and inflammatory bowel disease. **Clin. Gastroenterol Hepatol.**, 3: 617-628, 2005.
- IYER, S.; LAHANA, R.; BUELOW, R: Rational design and development of RDP58. **Curr. Pharm. Des.**, 8: 2217–2229, 2002.
- JAFRI, S., PASRICHA, P.J. **Agentes utilizados para diarreia, prisão de ventre e doença inflamatória intestinal, agentes utilizados para doença biliar e pancreática.** In: HARDMAN, J.G; LIMBIRD, L.E (Ed) Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica, 10^a ed. Rio de Janeiro: Mac Graw-Hill, p.788, 2003.
- JIANG, H.; DENG, C.S.; ZHANG, M.; XIA, J. Curcumin-attenuated trinitrobenzene sulphonic acid induces chronic colitis by inhibiting expression of cyclooxygenase-2. **World J. Gastroenterol.**, 12: 3848–3853, 2006.
- JIMÉNEZ, J.P.; SERRANO, J.; TABERNERO, M.; ARRANZ, S.; DÍAZ-RUBIO, M.E.; GARCÍA-DIZ, L.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO F. Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. **Nutrition**, 24: 646-653, 2008.
- JOE, B.; VIJAYKUMAR, M.; LOKESH, B.R. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 44: 97–111, 2004.
- JUMP, R.L.; LEVINE, A.D. Mechanisms of natural tolerance in the intestine: implications for inflammatory bowel disease. **Inflamm. Bowel. Dis.**, 10: 462-478, 2004
- KAGA, S.; ZHAN, L.; MATSUMOTO, M.; MAULIK, N. Resveratrol enhances neovascularization in the infarcted rat myocardium through the induction of thioredoxin-1, heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor. **J. Mol. Cell Cardiol.**, 39:813–822, 2005.
- 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.**, 33: 179-188, 1998.
- KARIN, M.; YAMAMOTO, Y.; WANG, Q.M. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, 3:17–26, 2004.
- KATO, S.; HOKARI, R.; MATSUZAKI, K.; IWAI, A.; KAWAGUCHI, A.; NAGAO, S.; MIYAHARA, T.; ITOH, K.; ISHII, H.; MIURA, S. Amelioration of murine experimental colitis by inhibition of mucosal addressin cell adhesion molecule-1. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 295:183–189, 2000.
- KATZ, J.A. Treatment of inflammatory bowel disease with corticosteroids. **Gastroenterol. Clin. North. Am.**, 33: 171-189, 2004.
- KAWACHI, S; JENNINGS, S.; PANES, J.; COCKRELL, A.; LAROUX, F.S.; GRAY, L.; PERRY, M.; VAN DER HEYDE, H.; BALISH, E.; GRANGER, D.N.; SPECIAN, R.A.; GRISHAM, M.B. Cytokine and endothelial cell adhesion molecule expression in

- interleukin-10-deficient mice. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, 278: G734-743, 2000.
- KELLY, D.; CONWAY, S.; AMINOV, R. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. **Trends Immunol.** 26: 326-333, 2005.
- KIM, H.; KONG, H.; CHOI, B.; YANG, Y.; KIM, Y.; LIM, M.J.; NECKERS, L.; JUNG, Y. Metabolic and pharmacological properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. **Pharm. Res.**, 22: 1499–1509, 2005.
- KIM, Y.H.; KIM, M.H.; KIM, B.J.; KIM, J.J.; CHANG, D.K.; SON, H.J.; RHEE, P.L.; RHEE, J.C. Inhibition of cell proliferation and invasion in a human colon cancer cell line by 5 aminosalicylic acid. **Dig. Liver Dis.**, 41: 328-37, 2009.
- KOBAYASHI, K.S.; CHAMAILLARD, M.; OGURA, Y.; HENEGARIU, O.; INOHARA, N.; NUÑEZ, G.; FLAVELL, R.A. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. **Science**, 307: 731-734, 2005.
- KRAWISZ, J.E.; SHARON, P.; STENSON, W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, 87:1344-1350, 1984.
- KRIS-ETHERTON, P.M.; LEFEVRE, M.; BEECHER, G.R.; GROSS, M.D.; KEEN, C.L.; ETHERTON, T.D. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function:the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis.**Annu. Rev. Nutr.**, 24: 511–538, 2004.
- KRUIDENIER, L.; KUIPER, I.; VAN DUIJN, W.; MARKLUND, S.L.; VAN HOGEZAND, R.A.; LAMERS, C.B.; VERSPAGET, H.W. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. **J. Pathol.**, 201: 7-16, 2003.
- KUHN, R.; LOHLER, J.; RENNICK, D.; RAJEWSKY, K.; MULLER, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, 75: 263-274, 1993.
- KUNIN, S.; GALLILY, R. Recognition and lysis of altered-self cells by macrophages. I. Modification of target cells by 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid. **Immunology**, 48: 265-72, 1983.
- KWIECIEN, S.; BRZOSOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **J.Physiol. Pharmacol.**, 53: 39-50, 2002.
- KWON, K.H.; MURAKAMI, A.; TANAKA, T.; OHIGASHI, H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in

- mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. **Biochem. Pharmacol.**, 69: 395–406, 2005.
- LATINNE, D.; FIASSE, R. New insights into the cellular immunology of the intestine in relation to the pathophysiology of inflammatory bowel diseases. **Acta Gastroenterol. Belg.** 69: 393-405, 2006.
- LEVENSTEIN, S.; PRANTERA, C.; VARVO, V.; SCRIBANO, M.L.; ANDREOLI, A.; LUZI, C.; ARCA, M.; BERTO, E.; MILITE, G.; MARCHEGGIANO, A. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. **Am. J. Gastroenterol.**, 95: 1213-1220, 2000.
- LICHTMAN, S.N.; BALFOUR SARTOR, R. Extraintestinal manifestation of inflammatory bowel disease: clinical aspects and natural history. In: TARGAN, S.R.; SHANAHAN, F. eds. **Inflammatory Bowel Disease: From Bench To Beside.** Baltimore. Maryland: Williams and Wilkins, 317-335, 1994.
- LIH-BRODY, L.; POWELL, S.R.; COLLIER, K.P.; REDDY, G.M.; CERCHIA, R.; KAHN, E.; WEISSMAN, G.S.; KATZ, S.; FLOYD, R.A.; MCKINLEY, M.J. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. **Dig Dis Sci.**, 41: 2078–2086, 1996.
- LODES, M.J.; CONG, Y.; ELSON, C.O.; MOHAMATH, R.; LANDERS, C.J.; TARGAN, S.R.; FORT, M.; HERSHBERG, R.M. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. **J. Clin. Invest.**, 113: 1296-1306, 2004.
- LOFTUS, E.V.JR. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, 126: 1504–1517, 2004.
- LOPEZ-CUBERO, S.O.; SULLIVAN, K.M.; MCDONALD, G.B. Course of Crohn's disease after allogeneic marrow transplantation. **Gastroenterology**, 114: 433-440, 1998.
- LOUIS, M.; ROSATO, R.R.; BRAULT, L.; OSBILD, S.; BATTAGLIA, E.; YANG, X.H.; 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.**, 25:1701-11, 2004.
- LU, S.C. S-Adenosylmethionine. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 32: 391, 2000.
- MACDERMOTT, R.P.; NASH, G.S.; BERTOVICH, M.J.; MOHRMAN, R.F.; KODNER, I.J.; DELACROIX, D.L.; VAERMAN, J.P. Altered patterns of secretion of monomeric IgA and IgA subclass 1 by intestinal mononuclear cells in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 91: 379-385 1986.
- MACDONALD, T.T.; MONTELEONE, G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. **Science**, 307: 1920-1925, 2005.

- MACPHERSON, A.J.; HARRIS, N.L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, 4: 478-485, 2004.
- MAHADEVAN, U.; LOFTUS, E.V. JR.; TREMAINE, W.J.; SANDBORN, W.J. Safety of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in inflammatory bowel disease. **Am. J. Gastroenterol.**, 97: 910-914, 2002.
- MACFARLANE, G.T.; GIBSON, G.R. Formation of glycoprotein degrading enzymes by *Bacteroides fragilis*. **FEMS Microbiol Lett**, 15: 289-293, 1991.
- MARCHESI, J.R.; HOLMES, E.; KHAN, F.; KOCHHAR, S.; SCANLAN, P.; SHANAHAN, F.; WILSON, I.D.; WANG, Y. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. **J. Proteome Res.**, 6: 546-551. 2007.
- MARTENSSON, J.; JAIN, A.; MEISTER, A. Glutathione is required for intestinal function. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, 5:1715-1759, 1990.
- MARTÍN, A.R.; VILLEGAS, I.; SANCHEZ-HIDALGO, M.; DE LA LASTRA, C.A. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. **Br. J. Pharmacol.**, 147: 873-85, 2006.
- MAUL, J.; LODDENKEMPER, C.; MUNDT, P.; BERG, E.; GIESE, T.; STALLMACH, A.; ZEITZ, M.; DUCHMANN, R. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 128: 1868-1878, 2005.
- MAUNDER, R.G.; LANCEE, W.J.; GREENBERG, G.R.; HUNTER, J.J.; FERNANDES, B.J. Insecure attachment in a subgroup with ulcerative colitis defined by ANCA status. **Dig. Dis. Sci.**, 45: 2127-32, 2000.
- MAYER, L.; EISENHARDT, D. Lack of induction of suppressor T cells by intestinal epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. **J. Clin. Invest.**, 86: 1255-1260, 1990.
- MAZZON, E.; MUIA, C.; PAOLA, R.D.; GENOVESE, T.; MENEGAZZI, M.; DE SARRO, A.; SUZUKI, H.; CUZZOCREA, S. GREEN TEA POLYPHENOL EXTRACT ATTENUATES COLON INJURY INDUCED BY EXPERIMENTAL COLITIS. **Free Radic. Res.**, 39: 1017-1025, 2005.
- MONTELEONE, G.; BIANCONE, L.; MARASCO, R.; MORRONE, G.; MARASCO, O.; LUZZA, F.; PALLONE, F. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. **Gastroenterology**, 112: 1169-1178, 1997.

- MONTELEONE, I.; VAVASSORI, P.; BIANCONE, L.; MONTELEONE, G.; PALLONE, F. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. **Gut**, 50: 60-64, 2002.
- MORRIS, G.P.; BECK, P.L.; HERRIDGE, M.S.; DEPEW, W.T.; SZEWCZUK, M.R.; WALLACE, J.L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, 96: 795-803, 1989.
- MURASE, M.; KIMURA, Y.; NAGATA, Y. Determination of portal short-chain fatty acids in rats fed various dietary fibers by capillary gas chromatography. **J. Chromatogr. B Biomed. Appl.**, 664: 415-20, 1995.
- NAGAMOTO, H.; MAEDA, T.; HARUTA, J.P.; MIYAKODA, G.; MORI, T.; TOMINAGA, M. OPC-6535 suppresses symptoms and colonic damage in a rat model of DSS-induced chronic colitis. **Gastroenterology**, 26: 1045, 2006.
- NAKAMURA, T.; NAGAHORI, M.; KANAI, T.; WATANABE, M. Current pharmacologic therapies and emerging alternatives in the treatment of ulcerative colitis. **Digestion**, 77: 36-41, 2008.
- NAKATAMI, N., KAYANO, S., KIKUZAKI, H., SUMINO, K., KATAGIRI, K., MITANI, T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). **J. Agric. Food Chem.**, 48: 5512-5516, 2000.
- NAKAZAWA, A.; DOTAN, I.; BRIMNES, J.; ALLEZ, M.; SHAO, L.; TSUSHIMA, F.; AZUMA, M.; MAYER, L. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. **Gastroenterology**, 126: 1347-1357, 2004.
- NEURATH, M.F.; BECKER, C.; BARBULESCU, K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. **Gut**, Dec;43: 856-60, 1998.
- NEURATH, M.F.; FUSS, I.; KELSALL, B.L.; STÜBER, E.; STROBER, W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **J. Exp. Med.**, 182:1281-90, 1995.
- NEURATH, M.F.; PETTERSSON, S.; MEYE ZUM BUSCHENFELDE, K.H.; STROBER, W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. **Nat. Med.**, 2: 998-1004, 1996.
- NEURATH, M.F.; WEIGMANN, B.; FINOTTO, S.; GLICKMAN, J.; NIEUWENHUIS, E.; IIJIMA, H.; MIZOGUCHI, A.; MIZOGUCHI, E.; MUDTER, J.; GALLE, P.R.; BHAN, A.; AUTSCHBACH, F.; SULLIVAN, B.M.; SZABO, S.J.; GLIMCHER, L.H.; BLUMBERG, R.S. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. **J. Exp. Med.**, 195: 1129-1143, 2002.

- NIELSEN, O.H.; KIRMAN, I.; RUDIGER, N.; HENDEL, J.; VAINER, B. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. **Scand. J. Gastroenterol.**, 38: 180-185, 2003.
- NIETO, N.; TORRES, M.I.; FERNANDEZ, M.I.; GIRON, M.D.; RIOS, A.; SUAREZ, M.D.; GIL, A. Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. **Dig. Dis. Sci.**, 45:1820-1827, 2000.
- O'NEIL, G.P.; FORD-HUTCHINSON, A.V. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. **FEBS Lett.**, 30: 156-60, 1993.
- OGAWA, Y.; DURU, E.A.; AMEREDES, B.T. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation. **Curr. Mol. Med.**, 8: 437-45, 2008.
- OGURA, Y.; BONEN, D.K.; INOHARA, N.; NICOLAE, D.L.; CHEN, F.F.; RAMOS, R.; BRITTON, H.; MORAN, T.; KARALIUSKAS, R.; DUERR, R.H.; ACHKAR, J.P.; BRANT, S.R.; BAYLESS, T.M.; KIRSCHNER, B.S.; HANAUER, S.B.; NUNEZ, G.; CHO, J.H. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, 411: 603-606, 2001.
- ORHOLM, M.; MUNKHOLM, P.; LANGHOLZ, E.; NIELSEN, O.H.; SØRENSEN, T.I.; BINDER, V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. **N. Engl. J. Med.**, 324: 84-8, 1991.
- OUYANG, Q.; TANDON, R.; GOH, K.L.; OOI, C.J.; OGATA, H.; FIOCCHI, C. The emergence of inflammatory bowel disease in the Asian Pacific region. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, 21: 408-13, 2005.
- OZ, H.S.; CHEN, T.S.; MCCLAIN, C.J.; DE VILLIERS, W.J. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. **J. Nutr. Biochem.**, 16: 297-304, 2005.
- PERIS, P. G.; LESMES, I.B.; COMPES, C.C.; ÁLVARES, M.C. Metabolismo Colónico de la fibra. **Nutrición Hospitalar**. XVII 2: 11-16, 2002.
- PIZARRO, T.T.; MICHIE, M.H.; BENTZ, M.; WORARATANADHARM, J.; SMITH, M.F. JR, FOLEY, E.; MOSKALUK, C.A.; BICKSTON, S.J.; COMINELLI, F. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. **J. Immunol.**, 162: 6829-6835, 1999.
- PLEVY, S.E.; SALZBERG, B.A.; REGUEIRO, M. A humanized anti-CD3 monoclonal antibody, visilizumab, for treatment of severe steroidrefractory ulcerative colitis: preliminary results of a phase I study. **Gastroenterology**, 124: A7, 2003.
- PODOLSKY, D.K. Inflammatory bowel disease, **N. Engl. J. Med.**, 347: 417-429, 2002.

- PODOLSKY, D.K.; FIOCCHI, C. **Cytokines, chemokines, growth factors, eicosanoids and other bioactive molecules in IBD.** In: KIRSNER, J.B.; editor. *Inflammatory Bowel Disease*. Philadelphia: W.B. Saunders, 191-207, 1999.
- POHL, C.; HOMBACH A KRUIS, W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. **Hepatology**, 47: 57-70, 2000.
- PUCIŁOWSKA, J.B.; WILLIAMS, K.L.; LUND, P.K. Fibrogenesis. IV. Fibrosis and inflammatory bowel disease: cellular mediators and animal models. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, 279: G653-659, 2000.
- REIF, S.; KLEIN, I.; LUBIN, F.; FARBSTEIN, M.; HALLAK, A.; GILAT, T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. **Gut**, 40: 754-760, 1997.
- REIMUND, J.M.; ALLISON, A.C.; MULLER, C.D.; DUMONT, S.; KENNEY, J.S.; BAUMANN, R. Antioxidants inhibit the in vitro production of inflammatory cytokines in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Eur. J. Clin. Invest.**, 28: 145-150, 1998.
- REN, H.; MUSCH, M.W.; KOJIMA, K.; BOONE, D.; MA, A.; CHANG, E.B. Short-chain fatty acids induce intestinal epithelial heat shock protein 25 expression in rats and IEC 18 cells. **Gastroenterology**, 121: 631-9, 2001.
- RENNICK, D.M.; FORT, M.M. Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10(-/-)) mice and intestinal inflammation. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, 278: G829-G833, 2000.
- RODRÍGUEZ-CABEZAS, M.E.; GÁLVEZ, J.; LORENTE, M.D.; CONCHA, A.; CAMUESCO, D.; AZZOUZ, S.; OSUNA, A.; REDONDO, L.; ZARZUELO, A. Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. **J. Nutr.**, 132: 3263-3271. 2002.
- ROSIGNOLI, P.; FABIANI, R.; DE BARTOLOMEO, A.; SPINOZZI, F.; AGEA, E.; PELLI, M.A.; MOROZZI, G. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. **Carcinogenesis**, 22:1675-1680, 2001.
- RUTGEERTS, P.; SANDBORN, W.J.; FEAGAN, B.G.; REINISCH, W.; OLSON, A.; JOHANNS, J.; TRAVERS, S.; RACHMILEWITZ, D.; HANAUER, S.B.; LICHTENSTEIN, G.R.; DE VILLIERS, W.J.; PRESENT, D.; SANDS, B.E.; COLOMBEL, J.F. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. **N. Engl. J. Med.**, 353: 2462-2476, 2005.
- RUBIN, D.T.; HANAUER, S.B. Smoking and inflammatory bowel disease. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, 12: 855-862, 2000.

- SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat. Immunol.**, 6: 345-352, 2005.
- SANCHEZ-MUÑOZ, F.; DOMINGUEZ-LOPEZ, A.; YAMAMOTO-FURUSHO, J. K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.**, 21: 14(27): 4280-4288, 2008.
- SANDBORN, W.J.; FEAGAN, B.G. The efficacy of azathioprine and 6-mercaptopurine for the prevention of postoperative recurrence in patients with Crohn's disease remains uncertain. **Gastroenterology**, 127: 723-729, 2004.
- SARTOR, R.B. Clinical applications of advances in the genetics of IBD. **Rev. Gastroenterol. Disord.**, 3: S9-S17, 2003.
- SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.**, 45:287-306, 2005.
- SCHREIBER, S.; KESHAVARZIAN, A.; ISAACS, K.L.; SCHOLLENBERGER, J.; GUZMAN, J.P.; ORLANDI, C.; HANAUER, S.B. A randomized, placebo-controlled, phase II study of tetomilast in active ulcerative colitis. **Gastroenterology**, 132: 76-86, 2007.
- SCOTT, M.G.; NAHM, M.H.; MACKE, K.; NASH, G.S.; BERTOVICH, M.J.; MACDERMOTT, R.P. Spontaneous secretion of IgG subclasses by intestinal mononuclear cells: differences between ulcerative colitis, Crohn's disease, and controls. **Clin. Exp. Immunol.**, 66: 209-215, 1986.
- SEGUI, J.; GIRONELLA, M.; SANS, M.; GRANELL, S.; GIL, F.; GIMENO, M.; CORONEL, P.; PIQUE, J.M.; PANES, J. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. **J. Leukoc. Biol.**, 76: 537-544, 2004.
- SEIBOLD, F. Does conservative therapy of chronic inflammatory bowel diseases still play a role. **Swiss Surg.**, 9: 127-130, 2003.
- SHIGEMATSU, T.; SPECIAN, R.D.; WOLF, R.E.; GRISHAM, M.B.; GRANGER, D.N. MAdCAM mediates lymphocyte-endothelial cell adhesion in a murine model of chronic colitis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, 281: G1309-1315, 2001.
- SINGER, I.I.; KAWKA, D.W.; SCHLOEMANN, S.; TESSNER, T.; RIEHL, T.; STENSON, W.F. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 115: 297-306, 1998.
- SONNENBERG, A. Geographic and temporal variations of sugar and margarine consumption in relation to Crohn's disease. **Digestion**, 41: 161-171, 1988.

- SOUZA, M.H.L.P.; TRONCON, L.E.A.; RODRIGUES, C.M.; VIANA, C.F.G.; ONOFRE, P.H.C.; MONTEIRO, R.A.; PASSOS, A.D.C.; MARTINELLI, A.L.C.; MENEGHELLI, U.G. Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do Sudeste do Brasil. **Arq. Gastroenterol.**, 39: 98-105, 2002.
- SPADARO, A.C.C. **Cromatografia por troca iônica**. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas :Editora da UNICAMP, p. 89-105, 2006.
- SPEHLMANN, M.E.; ECKMANN, L. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, 25: 92-9, 2009.
- SPIIK, A.K.; RIDDERSTAD, A.; AXELSSON, L.G.; MIDTVEDT, T.; BJORK, L.; PETTERSSON, S. Abrogated lymphocyte infiltration and lowered CD14 in dextran sulfate induced colitis in mice treated with p65 antisense oligonucleotides. **Int. J. Colorectal Dis.**, 17: 223–232, 2002.
- STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M., BOWEN, P.P., HUSSAIN, E.A., DAMAYANTI-WOOD, B.I., FARNSWORTH, N.R. Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food? **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 41: 251-286, 2001.
- STAGG, A.J.; HART, A.L.; KNIGHT, S.C.; KAMM, M.A. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. **Gut**, 52: 1522-1529, 2003.
- STALLMACH, A.; SCHUPPAN, D.; RIESE, H.H.; MATTHES, H.; RIECKEN, E.O. Increased collagen type III synthesis by fibroblasts isolated from strictures of patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, 102: 1920-1929, 1992.
- STEIN, J.; KULEMEIER, J.; LEMBCKE, B.; CASPARY, W.F. Simple and rapid method for determination of short-chain fatty acids in biological materials by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **J. Chromatogr.**, 576: 53-61, 1992.
- STEINWURZ, F. Epidemiologia, aspectos clínicos e evolutivos da doença de Crohn. **Arq. Gastroenterol.** 35: 237-239, 1998.
- STURM, A.; LEITE, A.Z.; DANESE, S.; KRIVACIC, K.A.; WEST, G.A.; MOHR, S.; JACOBBERGER, J.W.; FIOCCHI, C. Divergent cell cycle kinetics underlie the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Gut**, 53: 1624-1631, 2004.
- SUGIMOTO K, HANAI H, TOZAWA K, AOSHI, T.; UCHIJIMA, M.; NAGATA, T.; KOIDE, Y. Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. **Gastroenterology**, 123:1912–1922, 2002.
- SUMMERS RW. Novel and future medical management of inflammatory bowel disease. **Surg. Clin. North Am.**, 87: 727-41, 2007.

- SUZUKI, E. (2008). Efeito das fibras alimentares de abobora na inflamação intestinal induzida em ratos. Dissertação de mestrado, Universidade de Estadual de Campinas.
- SWIDSINSKI, A.; LADHOFF, A.; PERNTHALER, A.; SWIDSINSKI, S.; LOENING-BAUCKE, V.; ORTNER, M.; WEBER, J.; HOFFMANN, U.; SCHREIBER, S.; DIETEL, M.; LOCHS, H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 122: 44-54, 2002.
- SZULC, P.; MEUNIER, P.J. Is vitamin K deficiency a risk factor for osteoporosis in Crohn's disease? **Lancet**, 357:1995-1996, 2001.
- TAKAHASHI, F.; DAS, K.M. Isolation and characterization of a colonic autoantigen specifically recognized by colon tissue-bound immunoglobulin G from idiopathic ulcerative colitis. **J. Clin. Invest.**, 76: 311-318, 1985.
- TARGAN, S.R.; LANDERS, C.J.; YANG, H.; LODES, M.J.; CONG, Y.; PAPADAKIS, K.A.; VASILIAUSKAS, E.; ELSON, C.O.; HERSHBERG, R.M. Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. **Gastroenterology** 128: 2020-2028, 2005a.
- TARGAN, S.R.; SALZBERG, B.A.; MAYER, L. A phase I-II study: multiple dose levels of visilizumab are well tolerated and produce rapid and sustained improvement in ulcerative colitis patients refractory to treatment with intravenous steroids (IVSR-UC). **Gastroenterology**, 128: A-75, 2005b.
- THAM, D.M.; WHITIN, J.C.; COHEN, H.J. Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. **Pediatr. Res.** 51: 641-646, 2002.
- THOMAS, A.G.; MILLER, V.; SHENKIN, A.; FELL, G.S.; TAYLOR, F. Selenium and glutathione peroxidase status in paediatric health and gastrointestinal disease. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, 19: 203-219, 1994.
- THOMAS, G.A.; SWIFT, G.L.; GREEN, J.T.; NEWCOMBE, R.G.; BRANIFF-MATHEWS, C.; RHODES, J.; WILKINSON, S.; STROHMEYER, G.; KREUZPAINTER, G. Controlled trial of antituberculous chemotherapy in Crohn's disease: a five year follow up study. **Gut**, 42: 497-500, 1998.
- THOMAS, M.J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition**, 16:716-8. 2000.
- TOPPING, D.L.; CLIFTON, P.M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiol. Rev.**, 81:1031-1064. 2001.

- TRAVIS, S.; YAP, L.M.; HAWKEY, C.; WARREN, B.; LAZAROV, M.; FONG, T.; TESI, R.J. RDP58 is a novel and potentially effective oral therapy for ulcerative colitis. **Inflamm. Bowel Dis.**, 11: 713–719, 2005.
- URAO, M.; FUJIMOTO, T.; LANE, G.J.; SEO, G.; MIYANO, T. Does probiotic administration decrease serum of endotoxin level in infants?. **J. Pediatr. Surg.**, 34: 273-276, 1999.
- VAN ASSCHE, G., VERMEIRE, S., RUTGEERTS, P. Medical treatment of inflammatory bowel diseases. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, 21: 443-447, 2005.
- VAN ASSCHE, G.; RUTGEERTS, P. Antiadhesion molecule therapy in inflammatory bowel disease. **Inflamm. Bowel Dis.**, 8: 291–300, 2002.
- VARILEK, G.W.; YANG, F.; LEE, E.Y.; DEVILLIERS, W.J.; ZHONG, J.; OZ, H.S.; WESTBERRY, K.F.; MCCLAIN, C.J. Green tea polyphenol extract attenuates inflammation in interleukin-2-deficient mice, a model of autoimmunity. **J. Nutr.**, 131: 2034–2039, 2001.
- VELÁZQUEZ, M.; DAVIES, C.; MARETT, R.; SLAVIN, J.L.; FEIRTAG, J. M. Effect of oligosaccharides and fibre substitutes on short-chain fatty acid production by human faecal microflora. **Anaerobe**, 6: 87-92, 2000.
- VOGEL, J.D.; WEST, G.A.; DANESE, S.; DE LA MOTTE, C.; PHILLIPS, M.H.; STRONG, S.A.; WILLIS, J.; FIOCCHI, C. CD40-mediated immune-nonimmune cell interactions induce mucosal fibroblast chemokines leading to T-cell transmigration. **Gastroenterology**, 126: 63-80, 2004.
- VON LAMPE, B.; BARTHEL, B.; COUPLAND, S.E.; RIECKEN, E.O.; ROSEWICZ, S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, 47: 63-73, 2000.
- WEYRICH, A.S.; ZIMMERMAN, G.A. Platelets: signaling cells in the immune continuum. **Trends Immunol.**, 25: 489-495, 2004.
- WILLS-KARP, M.; SANTELIZ, J.; KARP, C.L. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. **Nat. Rev. Immunol.**, 1: 69-75, 2001.
- WIRTZ, S.; NEUFERT, C.; WEIGMANN, B.; NEURATH, M.F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nat. Protoc.**, 2: 541-6, 2007.
- WOLIN, M.J., MILLER, T.L. Interactions of microbial populations in cellulose fermentation. **Fed. Proc.**, 42: 109-113, 1983.
- WONG, J.M.; DE SOUZA, R.; KENDALL, C.W.; EMAM, A.; JENKINS, D.J. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **J. Clin. Gastroenterol.**, 40: 235-43. 2006.

- XAVIER, R.J.; PODOLSKY, D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, 448: 427–434, 2007.
- YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y.; KISHI, A.; TOMII, T.; KANEKO, T.; IINUMA, S.; ICHIKAWA, H.; YASUDA, M.; TAKAHASHI, S.; KONDO, M. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. **Gut**, 34: 732-737, 1993.
- YOSHIKAWA, T.; TAKAHASHI, S.; KONDO, M. Possible role of free radicals in the chronic inflammation of the gut. **EXS**, 62: 353-8, 1992.
- ZELKO, I.N.; MARIANI, T.J.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a 567 comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radic. Biol. Med.**, 33: 337-349, 2002.
- ZHANG, M.; DENG, C.; ZHENG, J.; XIA, J.; SHENG, D. Curcumin inhibits trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Int. Immunopharmacol.**, 6:1233–42, 2006.
- ZHENG, C.Q.; HU, G.Z.; ZENG, Z.S.; LIN, L.J.; GU, G.G. Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. **World J. Gastroenterol.**, 9: 1646-1456, 2003.
- ZURIGUEL, V.; CAUSSÉ, E.; BOUNÉRY, J. D.; NOUADJE, G.; SIMÉON, N.; NERTZ, M.; SALVAYRE, R.; COUDERC, F. Short chain fatty acids by capillary electrophoresis and indirect UV detection or laser- induced fluorescence. **J. Chromatogr.A**, 781: 233-238, 1997.



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1188-1, sobre "Avaliação antiinflamatória em ratos suplementados com dietas ricas em fibras na vigência de colite induzida por diferentes agentes", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito / Anderson Luiz Ferreira, 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 28 de março de 2007.

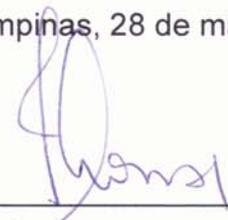
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1188-1, entitled "Antiinflammatory evaluation in rats supplemented with diets rich in fibers in the validity of induced colitis for different agents", 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 March 28, 2007.

Campinas, 28 de março de 2007.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva