

ERIKA SUZUKI

***EFEITO DAS FIBRAS ALIMENTARES DE ABÓBORA NA
INFLAMAÇÃO INTESTINAL INDUZIDA EM RATOS***

CAMPINAS

2008

ERIKA SUZUKI

***EFEITO DAS FIBRAS ALIMENTARES DE ABÓBORA NA
INFLAMAÇÃO INTESTINAL INDUZIDA EM RATOS***

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.

ORIENTADORA: PROF^a DR^a ALBA REGINA MONTEIRO SOUZA BRITO



UNICAMP

CAMPINAS

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Su99e Suzuki, Erika
Efeito das fibras alimentares de abóbora na inflamação intestinal induzida em ratos. / Erika Suzuki. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Alba Regina Monteiro Souza Brito
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fibra alimentar. 2. Abóbora. 3. Ácidos graxos de cadeia curta. 4. Inflamação. 5. Enzimas. 6. Antioxidantes. 7. Interleucina-12. I. Souza-Brito, Alba Regina Monteiro. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Pumpkin dietary fiber effects on induced intestinal inflammation in rats

Keywords:

- Dietary fiber
- Pumpkin
- Short-chain fatty acids
- Inflammation
- Antioxidant
- Enzymes
- Interleukin-12

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Alba Regina Monteiro Souza Brito
Prof^a. Dr^a. Ana Beatriz Albino Almeida
Prof. Dr. Cláudio Saddy Rodrigues Coy

Data da defesa: 29 - 01 - 2008

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Membros:

Prof^a. Dr^a. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Prof^a. Dr^a. Ana Beatriz Albino Almeida

Prof. Dr. Cláudio Saddy Rodrigues Coy

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/01/2008

Aos meus pais, Carlos e Emiko.

AGRADECIMENTOS

À Profa Alba, pela acolhida ao laboratório. Sempre me deixou à vontade para pensar e seguir o que achava ser o certo. Agradeço o apoio e incentivo. O que ainda me encanta são suas histórias de vida... Obrigada!!

À Dra Elisângela, pelas metodologias novas e a disposição em ajudar.

Ao Prof Lauro Kubota e Jailson C. Dias, do Instituto de Química, pelas análises dos ácidos graxos de cadeia curta. Etapa fundamental para que os testes biológicos pudessem ser iniciados.

Ao Léscio e Washington, pelos cuidados diários com os ratos no biotério.

Ao Anderson, pela ajuda durante todo o mestrado; exemplo de bom humor e disposição. À Aninha, por me ajudar pacientemente com as análises de antioxidantes.

Ao Laboratório de Produtos Naturais (Ademir, Anderson, Aninha, Bitá, Chris, Cibele, Cinza, Déborah, Demétrio, Dunder, Elis, Felipe, Pati, Silene, Victor) pelo ambiente de trabalho gostoso, pela ajuda nos experimentos e pela troca de informações sobre tudo, principalmente sobre pesquisa...

Aos Profs Edson Antunes, Miguel Arcanjo e Cláudio Coy, pelas sugestões e correções no exame de qualificação.

Aos meus pais, Carlos e Emiko, pelo incentivo nos estudos e a compreensão de que cada filho tem a sua cabeça, o seu jeito e o seu caminho a seguir...

Ao Leo, Karina e Celso, meus melhores vínculos com o passado e aqueles que no futuro, provavelmente, nunca me deixarão na mão.

Aos queridíssimos amigos Jú, Fábio, Karina, Edu, Nádia, Cris e Dani pela amizade e carinho.

Ao meu Fê, por me fazer feliz. Tenho certeza de que a nossa caminhada será longa.

À Capes e à FAPESP pelo apoio financeiro.

“O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
1.1. Doenças Inflamatórias Intestinais.....	17
1.1.1. Epidemiologia.....	17
1.1.2. Fatores Genéticos.....	18
1.1.3. Fatores Ambientais.....	19
Fumo.....	20
Fármacos.....	20
Estresse.....	21
Fatores microbianos.....	22
Fatores alimentares.....	23
1.2. Terapêutica Atual e Perspectivas.....	24
1.3. Fibras Alimentares.....	29
1.3.1. Espécie Estudada.....	32
1.4. Cromatografia de Íons.....	32
2. Objetivos.....	34
3. Materiais e Métodos.....	35
3.1. Fibras.....	35
3.2. Teste <i>in vitro</i>	35
3.3. Cromatografia de Íons.....	36
3.4. Animais.....	37
3.5. Inflamação Intestinal Induzida por TNBS.....	38
3.6. Drogas Utilizadas.....	39
3.6. Detecção da lesão do cólon.....	39
3.7. Avaliação da Atividade Antioxidante.....	39
3.7.1. Dosagem de Proteínas Totais.....	39
3.7.2. Grupamentos Sulfidríla.....	39
3.7.3. Glutationala Peroxidase.....	40
3.7.4. Glutationala Redutase.....	40
3.7.5. Peroxidação Lipídica.....	40
3.7.5. Mieloperoxidase.....	40

3.8. Interleucina 12.....	41
3.9. Análise Estatística.....	41
4. Resultados.....	42
4.1. Teste <i>in vitro</i>	42
4.2. Inflamação Intestinal Induzida por TNBS.....	43
4.2.1. Grupamentos Sulfidríla.....	46
4.2.2. Glutathione Peroxidase.....	47
4.2.3. Glutathione Redutase.....	48
4.2.4. Peroxidação Lipídica.....	49
4.2.5. Mieloperoxidase.....	50
4.2.6. Interleucina 12.....	51
5. Discussão.....	52
6. Conclusões e Perspectivas.....	57
7. Referências Bibliográficas.....	58

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Esquema 1 - Efeito das fibras solúveis, insolúveis e a combinação delas no trato gastrointestinal.....	31
Esquema 2 - Cromatógrafo de Exclusão de Íons.....	37
Esquema 3 - Inflamação intestinal induzida por TNBS.....	38
Figura 1 - Abóbora (<i>Cucurbita</i> sp).....	32
Figura 2 - Processamento da abóbora.....	35
Figura 3 - Região cólica após inflamação induzida por TNBS.....	43
Fluxograma 1 - Teste <i>in vitro</i>	36
Gráfico 1 - Produção média dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC) no teste <i>in vitro</i>	42
Gráfico 2 - Área da lesão na região cólica.....	43
Gráfico 3 - Peso dos animais durante o experimento.....	44
Gráfico 4 - Área sob a curva nos 3 dias após a indução.....	45
Gráfico 5 - Área sob a curva nos 7 dias após a indução.....	45
Gráfico 6 - Concentração dos Grupamentos Sulfidril (GSH).....	46
Gráfico 7 - Concentração da enzima Glutathione Peroxidase (GPx).....	47
Gráfico 8 - Concentração da enzima Glutathione Redutase (GR).....	48
Gráfico 9 - Níveis de Peroxidação Lipídica (LPO).....	49
Gráfico 10 - Atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	50
Gráfico 11 - Concentração de Interleucina-12.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC = Ácido graxo de cadeia curta
AINE = Antiinflamatório não-esteroidal
AM = Anticorpo monoclonal
5-ASA = Ácido 5-aminosalicílico
BAL = Bactérias ácido lácticas
CARD15 = Caspase recruitment domain 15
CD = Crohn's disease
CEI = Cromatografia de exclusão de íons
CI = Cromatografia de íons
CLAE = Cromatografia líquida de alta eficiência
COX = Ciclooxygenase
CRF = Fator liberador de corticotrofina
DC = Doença de Crohn
DII = Doenças inflamatórias intestinais
DTNB = ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzóico
ELAM = Molécula-1 de aderência aos leucócitos endoteliais
ERO = Espécies reativas de oxigênio
FA = Fibras alimentares
FI = Fibras insolúveis
FS = Fibras solúveis
FT = Fibras totais
GPx = Glutathione peroxidase
GSH = Grupamentos sulfidril
IBD = Inflammatory bowel disease
ICAM = Molécula-1 de aderência intercelular
IFN- γ = Interferon gama
IL = Interleucina
LPO = Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica
MHC = Complexo principal de histocompatibilidade

MPO = Mieloperoxidase

NF κ B = Fator nuclear κ B

NK = Natural killer

NOD2 = Intracellular nucleotide oligomerization domain 2

OCNT = Transportador de cátions orgânicos

RCUI = Retocolite ulcerativa inespecífica

SP = Substância P

SPF = Specific pathogen free

TGI = Trato gastrointestinal

TLR = Toll-like receptor

TNBS = Ácido trinitrobenzenossulfônico

TNF α = Fator de necrose tumoral alfa

UC = Ulcerative colitis

RESUMO

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), que englobam a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa Inespecífica (RCUI), representam um grande problema para a saúde, uma vez que um único tipo de tratamento com corticosteróides, imunomoduladores ou anti-TNF- α não é eficaz para manter as remissões. Além disso, esses medicamentos possuem efeitos colaterais e o custo do tratamento é elevado. O número de pessoas que desenvolvem as DII está aumentando substancialmente; isso se deve, principalmente, a fatores genéticos e, secundariamente, a fatores ambientais como alimentação, fumo, fármacos, estresse e a flora comensal. As DII são consideradas superexpressões do sistema imune, que levam ao ataque do trato gastrointestinal do próprio hospedeiro. Nesse contexto, fibras alimentares (FA) são indicadas como adjuvantes no tratamento das DII. Esse estudo teve como objetivo investigar o efeito protetor e/ou terapêutico das FA de abóbora na prevenção da inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos. As fibras solúveis, ao serem fermentadas pelas bactérias intestinais anaeróbicas, produzem ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) entre outras substâncias. AGCC são de elevada importância nas DII, principalmente o butirato, por fornecer energia aos enterócitos, permitindo o crescimento e a rápida recuperação dos tecidos lesionados. Além disso, as FA de abóbora possuem efeito antioxidante e antiinflamatório, são de fácil acesso aos consumidores e seu custo é baixo. Para a escolha da proporção de FA que mais produziu butirato, foi realizado o teste *in vitro*, onde diferentes proporções de FA de polpa e semente de abóbora foram incubadas com bactérias anaeróbicas intestinais; os AGCC foram quantificados por Cromatografia de Exclusão de Íons. Durante 23 dias os ratos, do grupo tratado, foram suplementados com FA na proporção 0,1 g de polpa + 0,4 g de semente de abóbora/kg/dia. No 16º dia foi realizada a indução da inflamação intestinal por TNBS e no 24º dia, a eutanásia. Os 8 cm finais do intestino grosso foram coletados para a dosagem de algumas enzimas antioxidantes, atividade da mieloperoxidase e níveis de interleucina 12. Os dados obtidos neste trabalho foram: aumento estatisticamente significativo dos níveis de Peroxidação Lipídica

no grupo não-tratado ($2,8 \pm 1,2$ pmol/mg proteína) comparado ao grupo tratado com FA ($1,8 \pm 0,6$ pmol/mg proteína); aumento estatisticamente significativo da infiltração de neutrófilos e macrófagos no grupo não-tratado ($35,8 \pm 11$ U/g proteína) comparado ao grupo tratado com FA ($17,6 \pm 2,6$ U/g proteína); e aumento estatisticamente significativo da interleucina 12 no grupo não-tratado ($102,2 \pm 42$ pg/mL) comparado ao grupo tratado com FA ($45,7 \pm 9,2$ pg/mL). Assim, as FA de abóbora podem ser consideradas fortes candidatas como adjuvantes no tratamento das inflamações intestinais por possuírem um forte potencial antiinflamatório no cólon.

ABSTRACT

Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC) are known as Inflammatory Bowel Disease (IBD). They are considered a large problem in the health, because the therapy using corticosteroids, immunomodulators and anti-TNF- α are not totally efficient to maintain the remission. Also, they offer many side effects and the treatment cost is high. The number of patients with IBD is increasing. IBD is mainly due to genetic factors and secondary to environmental factors, such as diet, smoking, stress, and comensal flora. IBD is the overexpression of immune system, leading to the gastrointestinal tract injury. In this context, dietary fibers (DF) are suggested to help IBD therapies. The aim of this work was investigate the potential protector and/or therapeutic effects of pumpkin DF in TNBS-induced intestinal inflammation in rats. Soluble fibers are fermented by anaerobical bacteria from intestine and produce short-chain fatty acids (SCFA) among others substances. These SCFA have a lead role, mainly butyrate. Butyrate supply energy for the enterocytes, and helps injured tissues development and recuperation. Pumpkin DF have antioxidant and anti-inflammatory effects also. Pumpkin is sold almost everywhere and is cheap. To choose pumpkin DF mixture that produces high amount of butyrate, an *in vitro* test was realized. In this test, different pumpkin pulp/seeds mixture were incubated with anaerobical intestinal bacteria. SCFA were quantified by Ion Exclusion Chromatography. The rats of the treated group were supplemented with 0.1 g of pulp + 0.4 g of seeds/kg/day during 23 days. The intestinal inflammation was induced by TNBS on 16th day and the euthanasia was realized on 24th day. The colon latest 8 cm were removed from the rats for some antioxidants enzyme analysis, myeloperoxidase activity and interleukin 12 levels. The results suggest a good anti-inflammatory and antioxidant effect of this DF in the colon. The non-treated group (2.8 ± 1.2 pmol/mg protein) had the lipid peroxidation levels increased significantly compared to treated group (1.8 ± 0.6 pmol/mg protein). The non-treated group (35.8 ± 11 U/g protein) also had the neutrophils and macrophage infiltration increased significantly compared to treated group (17.6 ± 2.6 U/g protein). And finally, the non-treated group (102.2 ± 42

pg/mL) had the interleukin 12 levels increased significantly compared to treated group (45.7 ± 9.2 pg/mL). Thus, pumpkin DF may considered good to help usual intestinal inflammation therapies.

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS (DII)

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

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

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

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

1.1.1. EPIDEMIOLOGIA

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

Em geral, as taxas mais altas de incidência e prevalência, tanto para DC quanto para RCUI, são descritos no norte da Europa, Reino Unido e América do Norte. Entretanto, existe uma

incidência e prevalência crescentes em outras áreas como o sul e centro da Europa, Ásia, África e América Latina, indicando que as DII têm um processo dinâmico (Loftus *et al.*, 2004).

No Brasil, os dados epidemiológicos são escassos. Souza *et al.* (2002) estudaram a evolução da ocorrência das DII num hospital universitário do sudeste do Brasil. A conclusão é de que há um aumento na frequência das DII nesse hospital, com tendência da DC ser mais prevalente que a RCUI. As características demográficas, clínicas e evolutivas dos pacientes foram, de modo geral, semelhantes às já descritas. Além disso, confirmou-se que manifestações sistêmicas e a ocorrência de pancolite associaram-se à maior gravidade da RCUI, enquanto que idades inferiores a 50 anos e o tabagismo associaram-se à taxas mais altas de complicações da DC.

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

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

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

Levando em conta que deve-se interpretar com muita cautela os dados epidemiológicos, parece claro que as DII são mais frequentes em indivíduos da raça branca. As DII são incomuns em indivíduos da raça negra, nos hispano-americanos e asiáticos. Entretanto, é previsível que com a progressiva aquisição dos hábitos ocidentais por esses grupos, a incidência se aproxime da raça branca.

1.1.2. FATORES GENÉTICOS

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

Pesquisadores identificaram ao menos 7 loci (*inflammatory bowel disease* 1-7, IBD 1-7) em cromossomos que se relacionam com genes de susceptibilidade, centrando-se nas mutações dos

genes NOD2/CARD15 (*intracellular nucleotide oligomerization domain 2/caspase recruitment domain 15*), de MHC II (complexo principal de histocompatibilidade da classe II), de citocinas, de receptores de citocinas e de moléculas de adesão (Duerr, 2003; Sartor, 2003; Zheng *et al.*, 2003). Alguns loci têm mostrado ser específicos para RCUI, como o IBD 2 (Bonen e Cho, 2003) ou para DC, como o IBD 1 (Cho, 2001; Cho, 2003), enquanto que outros conferem uma susceptibilidade comum a ambas.

Recentemente, novos genes associados à DC foram identificados. O primeiro deles se encontra no cromossomo 5 e codifica o transportador de cátions orgânicos (OCTN) onde suas mutações afetam a capacidade dos transportadores para bombear xenobióticos e aminoácidos através das membranas celulares (Peltekova *et al.*, 2004). No cromossomo 10 encontra-se o segundo gene que faz parte da família da guanilato quinase, cuja mutação dificulta a manutenção da polaridade na célula epitelial (Stoll *et al.*, 2004). Ambos os genes podem ser importantes na permeabilidade epitelial; uma falha na sua função poderia provocar uma exposição inapropriada do sistema imunitário da mucosa a produtos bacterianos (Peran, 2007).

1.1.3. FATORES AMBIENTAIS

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

A variação na incidência das DII nas populações de mesma etnia que habitam lugares distintos, junto com a desarmonia existente entre gêmeos monozigóticos, reforça a importância dos fatores ambientais na patogenia da DII crônica.

São numerosos os fatores ambientais reconhecidos como de risco para as DII: fumo, fármacos, estresse, microorganismos e alimentação (Danese *et al.*, 2004).

Fumo

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

Os mecanismos de ação do tabaco na DC e na RCUI ainda não são claros, apesar de estar comprovado que o cigarro afeta tanto a imunidade sistêmica, quanto a da mucosa intestinal, alterando numerosas funções imunológicas inatas e adaptativas (Sopori, 2002): altera a relação entre células T *helper* e T supressoras, reduz a proliferação das células T, modula a apoptose e diminui significativamente os níveis de imunoglobulinas no soro e mucosas. Além disso, provoca um aumento na produção cólica de muco (Cope *et al.*, 1986), alteração no fluxo sanguíneo (Srivastava *et al.*, 1990) e, como a nicotina, uma redução da motilidade cólica (Coulie *et al.*, 2001).

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

Fármacos

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

Mulheres que utilizam contraceptivos orais apresentam uma pior evolução clínica nas DII. Considerando o estado de hipercoagulação presente na DII ativa, o uso concomitante de contraceptivos orais pode agravar o risco de processos tromboembólicos, ainda que faltem dados relacionando esses fatores. (Alstead, 1999). Entretanto, não se podem descartar outros mecanismos imunomoduladores, como os relacionados com o fator de transcrição NFκB (Evans *et al.*, 2001). Os contraceptivos orais de baixas doses parecem não afetar, significativamente, a atividade clínica da enfermidade, pelo menos na DC (Alstead, 1999).

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

Evidências indicam que a idéia da enzima ciclooxigenase 1 (COX-1) ser constitutiva e a COX-2 ser induzida é simplista. Na realidade, ambas as COX são constitutivas e também induzíveis na inflamação e na citoproteção (Halter *et al.*, 2001). Dois estudos com ratos mostram que, apesar dos inibidores seletivos de COX-1 ou COX-2 não serem ulcerogênicos, a inibição combinada da COX-1 e da COX-2 induz graves lesões no estômago e no intestino delgado, sugerindo uma importante contribuição da COX-2 na manutenção da integridade da mucosa intestinal (Wallace *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2002). Além disso, inibidores da COX parecem ser lesivos durante a cicatrização da úlcera (Halter *et al.*, 2001); a indometacina e o diclofenaco atrasam a cicatrização da úlcera, tanto na experimentação animal quanto em humanos (Schmassman, 1998).

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

Estresse

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

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

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

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

Fatores microbianos

Durante muito tempo procurou-se estabelecer uma relação entre um agente infeccioso específico e DII, mas sem resultados satisfatórios. Atualmente, a flora intestinal comensal recebe sua devida importância no desenvolvimento dessas doenças.

Os agentes infecciosos específicos, do tipo microbiano, sugeridos como sendo responsáveis pela DC e RCUI são muitos: *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium paratuberculosis*. O papel etiológico desta última na DC tem sido de grande controvérsia, já que essa bactéria é o agente causador da Doença de Johne, uma ileíte granulomatosa crônica em ruminantes que se assemelha à DC (Chiodini *et al.*, 1984).

Antes do nascimento, o TGI do bebê é estéril, mas durante o trabalho de parto natural ocorre a primeira exposição microbiana pela flora fecal e vaginal da mãe. Durante os meses após o nascimento, estabelece-se uma flora comensal estável (Fanaro *et al.*, 2003).

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

Na sua convivência com as bactérias, os vertebrados desenvolvem receptores de reconhecimento de indicadores específicos de bactérias, fungos e vírus que não se encontram nos eucariotos. Esses indicadores podem ser o lipopolissacarídeo, o peptideoglicano ou as flagelinas. Dentre os receptores estão os *toll-like receptor* (TLR) e os NOD, que são imprescindíveis para o início da resposta inflamatória inata e cuja ativação gera uma cascata de sinalização que leva a produção de citocinas pró-inflamatórias. As cascatas de sinalização de TLR proporcionam uma

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

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

Fatores alimentares

Dado que as DII são doenças digestivas, é evidente a possibilidade de haver produtos da alimentação envolvidos em sua patogenia. Entretanto, os dados objetivos são escassos, principalmente porque proporcionam apenas uma evidência indireta da possível relação causa-efeito entre fatores alimentares específicos e DII. Tem-se sugerido que na DC, certos alimentos poderiam atuar como antígenos, com um efeito desencadeante da sintomatologia. Nesse sentido, têm-se utilizado, com fins terapêuticos, dietas de exclusão, onde os pacientes excluem os possíveis desencadeadores. Essa opção terapêutica mostrou efeitos positivos numa pequena porcentagem dos doentes (Jones *et al.*, 1985); entretanto, não foi comprovado que a reintrodução destes alimentos leve à remissão da doença. Levando em conta que a maior incidência de DII possa estar associada com mudanças nos hábitos de vida, incluindo os alimentos, e que o intestino é a principal localização do processo inflamatório, seria muito provável que alguns nutrientes presentes na luz intestinal pudessem atuar como antígenos, os quais poderiam interferir nos processos imunitários e reparadores da mucosa intestinal. Um estudo, no qual determinou-se o fluxo de sangue retal e a proliferação de linfócitos após a exposição a alimentos específicos, demonstrou sensibilização a alguns antígenos alimentares em pacientes com DC (Van Den Bogaerde *et al.*, 2002).

1.2. TERAPÊUTICA ATUAL E PERSPECTIVAS

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

O tratamento deve começar pelo diagnóstico preciso. Este depende do conjunto de dados obtidos do histórico clínico e dos exames (físico, endoscópico, radiológico, histológico e laboratorial). O resultado desta investigação permite distinguir a DC de RCUI; entretanto, em aproximadamente 10% dos pacientes, pelo menos inicialmente, isto não é possível (Podolsky 2002). Marcadores sorológicos podem auxiliar no diagnóstico daqueles doentes para os quais os critérios habituais não foram suficientes (Biondo-Simões *et al.*, 2003).

O manejo das DII dependerá da gravidade, da extensão e do local envolvido. A dieta elementar tem sido sugerida como tratamento inicial, porém, a adesão dos pacientes é baixa, além do que é de alto custo, o que a torna inviável para a maioria dos doentes (Griffiths *et al.*, 1995). Uma dieta elementar, por definição, contém aminoácidos, glicose e uma pequena quantidade de ácidos graxos essenciais. Não possui sacarose, maltose, frutose, polissacarídeos, peptídeos, nem proteínas. Essa dieta surgiu na década de 70, junto com a viagem à Lua. A pessoa se alimenta somente do elemento mais simples do nutriente e não ficam resíduos; portanto, o bolo fecal não é produzido (ABCD, 2008). Um grande número de drogas que atuam como antiinflamatórios gerais ou seletivos têm sido empregados, atingindo-se a remissão das crises, mas não a cura da doença (Biondo-Simões *et al.*, 2003). O tratamento cirúrgico é reservado para as complicações da DC ou quando os sintomas graves persistem mesmo após tratamento intensivo com drogas antiinflamatórias ou imunossupressoras (Biondo-Simões *et al.*, 2003).

Terapia convencional

Ácido 5-aminosalicílico (5-ASA)

Tem boa atividade nos pacientes portadores da doença com atividade moderada de RCUI e de DC. Estudos demonstraram que o 5-ASA é funcionalmente ativo, bloqueando a produção de prostaglandinas e leucotrienos, inibindo o peptídeo bacteriano capaz de induzir a quimiotaxia dos neutrófilos e a secreção de adenosina induzida, que retira os metabólitos reativos do oxigênio e, talvez, inibindo a ativação do NF κ B (Podolsky, 2002).

Nos últimos 15 anos uma variedade de novos compostos de 5-aminosalicilatos tem sido avaliada. Em geral, compostos de 5-aminosalicilatos podem ser selecionados com base na

localização da doença. Para pacientes com doença cólica distal, supositórios ou enemas podem ser úteis; compostos orais com 5-ASA são apropriados para doença cólica proximal. Estes incluem sulfasalazina, olsalazina e, mais recentemente, a balsalazida. Formulações tópicas podem ser usadas sozinhas ou em combinação com formulações orais, quando a doença é limitada ao cólon descendente. Formulações orais, de liberação lenta ou pH dependentes, podem fornecer concentrações terapêuticas para o cólon proximal ou íleo distal. Assim, comprimidos, revestidos de eudragit liberam a mesalamina em pH acima de 7, no íleo ou no ceco (Asacol®). Formulações com revestimento de etilcelulose permitem a absorção da água. A água dissolve o 5-ASA que se difunde para fora do comprimido e penetra na luz intestinal. A olsalazina é constituída por 2 moléculas de 5-ASA unidas por um elo azo que utiliza o princípio da redutase bacteriana azo para fracionar a molécula em dois componentes idênticos (Biondo-Simões *et al.*, 2003).

O tratamento de manutenção com 5-ASA pode ser efetivo para manter a remissão da RCUI (Biondo-Simões *et al.*, 2003).

Corticosteróides

Corticosteróides têm sido empregados quando o 5-ASA não mostra eficácia. Eles, provavelmente, agem pelas mesmas propriedades funcionais relativas dos processos inflamatórios. Parecem controlar a doença de uma maneira complexa que pode incluir a modulação da fosfolipase A, interleucina 1 (IL-1), TNF- α (Bauditz *et al.*, 2002), moléculas-1 de aderência aos leucócitos endoteliais (ELAM-1) e de aderência intercelular (ICAM-1), além da lise dos linfócitos e dos eosinófilos. O uso tópico de corticosteróides, como enemas de hidrocortisona, pode ser indicado como alternativa ao 5-ASA para doentes como proctite ulcerativa ou colite ulcerativa distal. Prednisona ou prednisolona oral são usadas com moderação em colites severas, 60 a 80 mg/dia, sendo a administração intravenosa reservada para pacientes graves que requerem hospitalização (Podolsky, 2002). Cuidados especiais devem ser tomados no uso prolongado de corticosteróides, pois não é infreqüente o aparecimento de hipertensão arterial, diabetes e osteoporose (Síndrome de Cushing) (Rang *et al.*, 2004).

Agentes imunossupressores e imunorreguladores

O papel dos imunomoduladores no tratamento de pacientes com DII torna-se cada vez mais importante; são geralmente úteis quando a dose de corticosteróide não pode ser diminuída ou descontinuada. Estas drogas, da mesma forma que os corticosteróides, expõem os doentes ao risco de infecção oportunista.

A Azatioprina e seu metabólito ativo 6-mercaptopurina têm sido usados como agentes imunossupressores para pacientes com DII, apesar dos riscos aumentados para linfoma (Lewis *et al.*, 2001). Estudos clínicos têm demonstrado que este agente é eficiente para manter a remissão, mas não é efetivo no controle dos casos agudos. Entre os efeitos colaterais da azatioprina relata-se a supressão medular; portanto, a contagem dos leucócitos dos pacientes tratados deve ser

rigorosamente monitorada. O mecanismo de ação da azatioprina permanece desconhecido, mas pode-se incluir a supressão da geração específica de células T. O que se sabe é que esta droga é análoga à purina, e que ela inibe competitivamente a biossíntese dos nucleotídeos da purina. Fraser *et al.* (2002 a) concluíram que a azatioprina é um tratamento efetivo tanto para DC quanto para RCUI e que sua eficácia é razoavelmente bem sustentada por no mínimo cinco anos com toxicidade mínima, sem óbitos por sepsis devido à neutropenia.

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 b) reviram 70 pacientes, 48 com DC e 22 com RCUI. A duração média do tratamento foi de 17 semanas e a dose média usada foi de 20 mg/semana. A remissão aconteceu em 34 dos 55 pacientes que completaram 3 meses de tratamento (62%). Após 1 ano do final do tratamento, apenas 12% dos pacientes mostravam-se assintomáticos.

A Ciclosporina pode ser efetiva no tratamento de RCUI severas, em pacientes hospitalizados que necessitam de proctocolectomia. Age, provavelmente, pelo bloqueio da ativação dos linfócitos. O mecanismo de ação parece ser a transcrição inibida de IL-2 e de seu receptor nos linfócitos T auxiliares e a produção de fatores que ativam as células B e de IFN- γ pelas células T auxiliares. Altas doses podem controlar da doença. A ciclosporina é indicada quando a terapia com altas doses de corticosteróides não alcançou resultado; é usualmente administrada por 7 a 10 dias por via intravenosa, na dose de 4 mg/kg/dia, e depois por via oral (McCormack *et al.*, 2002). Os efeitos adversos associados à ciclosporina incluem hipertensão, nefrotoxicidade, tremores, hiperplasia gengival, hirsutismo, disfunção hepática (rara) e crises convulsivas.

Anticorpos monoclonais (AM) são uma recente e promissora opção terapêutica para as DII. São anticorpos específicos produzidos por ratos imunizados e derivados de um único clone de célula B, inicialmente produzido pela fusão de uma célula B com uma célula linfomatososa. Para reduzir eventuais episódios alérgicos em humanos, esses AM foram submetidos à tecnologia recombinante, tornando-se menos imunogênicos (Drewe e Powell, 2002). Uma opção terapêutica, já aprovada por órgãos competentes, é o Infliximab (Remicade®). Apesar dos resultados encorajadores na DC, seu uso pode ter efeitos colaterais como reações alérgicas agudas às infusões, reação de hipersensibilidade retardada com mialgia, artralgia, rash cutâneo e febre. Numa reexposição à droga, após 2-4 anos, aparecem doenças linfoproliferativas, além de uma suspeita da relação do Infliximab com lupus e tuberculose extrapulmonar. Embora o uso do Infliximab se mostre interessante para os doentes portadores de DC, seu uso para os portadores de RCUI permanece incerto. Além do Infliximab, há o Adalimumab, que foi aprovado recentemente pelo *Food and Drug Administration* (FDA) por induzir e manter a remissão da DC moderada a

severa em adultos, incluindo aqueles intolerantes e com perda de resposta ao Infliximab (Noble *et al.*, 2008).

Terapias em fase experimental

Citocinas e Anticitocinas

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

As citocinas da fase efetora incluem peptídeos pró-inflamatórios e antiinflamatórios. Citocinas pró-inflamatórias participam de reações inflamatórias agudas e crônicas, bem como nos processos de reparo. As citocinas pró-inflamatórias primárias incluem o TNF- α e a IL-1. São liberadas por macrófagos e por outras células, podendo desencadear uma cascata de citocinas secundárias entre as quais destacam-se as quimiocinas. Vários fatores de crescimento são importantes no processo de reparo e estão implicados na inflamação crônica. As citocinas antiinflamatórias, por sua vez, inibem aspectos da reação inflamatória, incluindo TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13. Essas citocinas podem inibir a produção de quimiocinas, e as últimas três têm a capacidade de inibir respostas mediadas por células Th1, isto é, as células cuja ativação inapropriada está envolvida em diversas doenças (Rang *et al.*, 2004).

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

1º) bloqueio da produção → ciclosporina e tacrolimos interferem na transcrição do gene da IL-2;

2º) inibição do processo intracelular que produz a proteína ativa → peptídeos metilketonas que inibem a enzima de conversão da IL-1 β /ácido hidroxâmico, inibindo a liberação proteolítica de TNF α ligado à célula;

3º) neutralização da citocina na circulação → anticorpos; receptores solúveis; e

4º) bloqueio de receptor → anticorpos; receptores antagônicos

As citocinas e outras substâncias mais utilizadas terapeuticamente são: proteína antagonista do receptor da Interleucina-1 (IL-1ra) (Henderson, 1997), IL-10 (Steidler *et al.* 2000;

Rogler e Andus, 2004), IL-11 (Greenwood-Van *et al.*, 2000), talidomida (Bauditz *et al.*, 2000), IL-18 (Sivakumar *et al.*, 2002) e 1,25-Diidroxicolecalciferol (Cantorna *et al.*, 2000).

Antioxidantes

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

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 elevado número de radicais livres, muito reativos, conhecidos como Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). As ERO são resultantes de um metabolismo incompleto do oxigênio molecular (O_2), gerando ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($OH^\bullet$), por possuírem um elétron não pareado na última camada de valência. Por serem extremamente reativas as ERO atacam moléculas biológicas levando a danos celulares como peroxidação lipídica, degradação de proteínas, quebra do DNA e até morte celular. Para controle do processo de ataque oxidativo o organismo possui sistemas de defesa como as enzimas superóxido dismutase, peroxidases e catalase (Thomas, 2000).

Outra fonte de radicais livres é o processo inflamatório. Quando ocorre uma agressão a um determinado tecido, há produção de agentes quimiotáticos como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, produtos bacterianos e virais. Esses agentes quimiotáticos atraem células fagocitárias que reduzem O_2 a O_2^- , no processo inflamatório, por ação da NADPH oxidase; o objetivo é a destruição dos agentes invasores (Conner e Grishan, 1996). Experimentalmente, há processos inflamatórios típicos que ocorrem no TGI que são geradores de radicais livres (como o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil). Bons exemplos são as colites experimentais, ulcerações intestinais em geral e danos à mucosa gástrica em modelos de úlcera experimental como aqueles induzidos por estresse, etanol, AINE, isquemia-reperfusão. Isto foi comprovado através da administração de superóxido dismutase, catalase, vitamina C ou outros antioxidantes, causando uma diminuição no Índice de Lesão Ulcerativa (Das e Banerjee, 1993).

Fibras

Estudos mais recentes têm utilizado suplementação de fibras alimentares e polissacarídeos não-digeríveis, no tratamento e controle das DII como alternativas terapêuticas (Hallert *et al.*, 2003). Essas substâncias apresentam propriedades e efeitos fisiológicos importantes no TGI, como produção de AGCC necessários para manutenção da função normal dos colonócitos (Galvez *et al.*, 2005). Rodríguez-Cabezas *et al.* (2003) relataram o efeito antiinflamatório das sementes de *Plantago ovata* na inflamação intestinal

1.3. FIBRAS ALIMENTARES

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

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

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

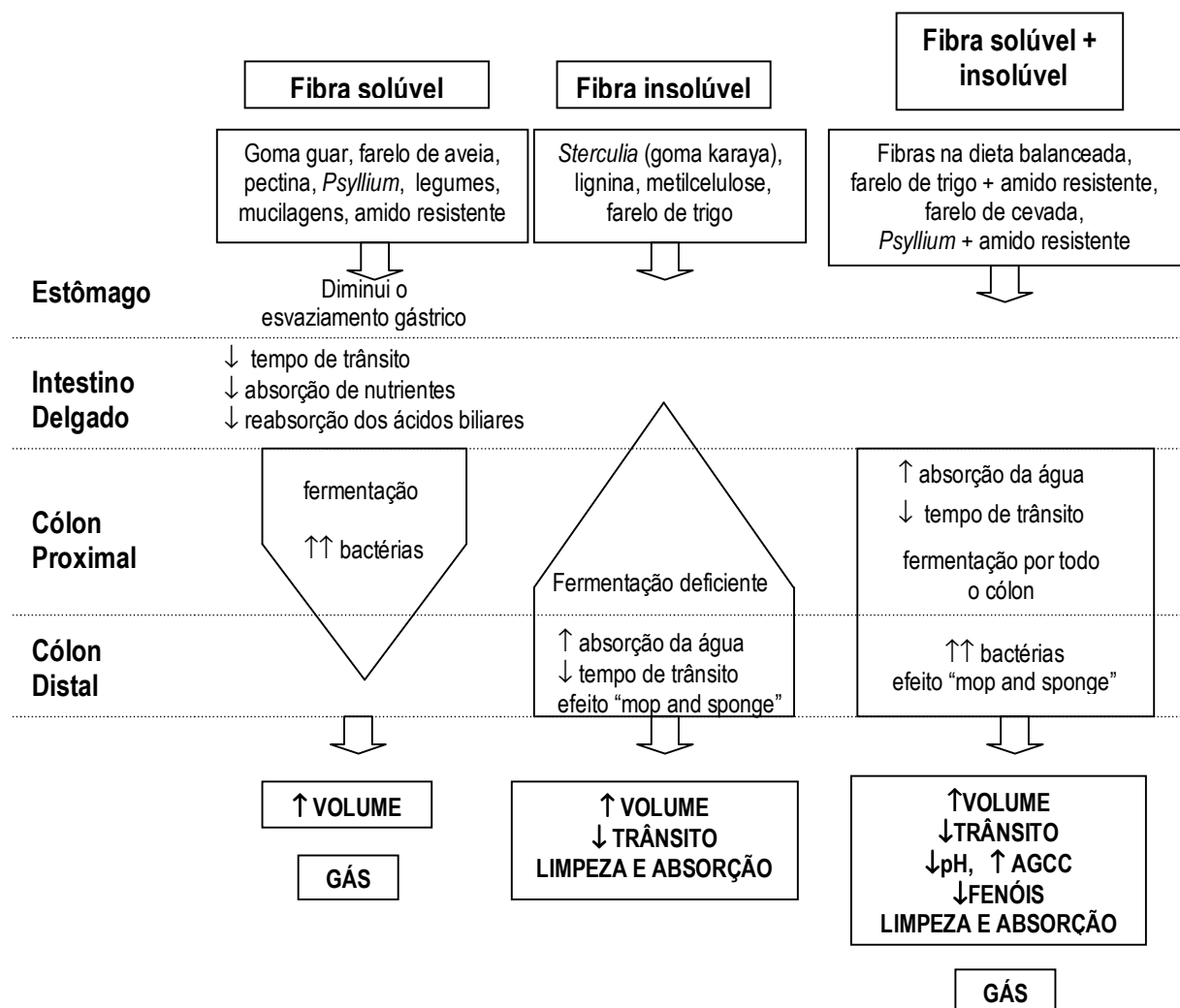
As FA possuem ainda propriedade de se ligar com a água, aumentando o volume e a viscosidade do conteúdo intestinal, sendo responsáveis pelo aumento do volume das fezes, melhora da motilidade intestinal e diminuição do tempo de trânsito (Mortensen e Clausen, 1996; Velázquez *et al.*, 1997). Essa propriedade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

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

O uso das FA como tratamento e estratégia preventiva nas DII é bastante atrativo por inúmeros motivos científicos e sociais. Porém, algumas dificuldades enfrentadas são a heterogeneidade das FA, o desconhecimento da dose ótima e a duração do tratamento. A maioria dos estudos necessita de parâmetros de comparação entre os tipos de fibras e de métodos para determinar a contribuição da ingestão dessas fibras (James *et al.*, 2003).

Assim, as fibras alimentares, têm sido sugeridas como moduladoras e positivas na composição da microflora intestinal através dos AGCC (Steer *et al.*, 2000). Prebióticos são ingredientes não digestíveis que estimulam crescimento e/ou atividade de um limitado número de microorganismos capazes de proporcionar um ambiente intestinal saudável ao hospedeiro (Gibson e Roberfroid, 1995). Os probióticos, por sua vez, são microorganismos vivos que, administrados em dose adequada, conferem ao hospedeiro benefícios à sua saúde (FAO/WHO-Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 2002).

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



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

1.3.1. ESPÉCIE ESTUDADA

A Abóbora é pertencente à família das *Cucurbitaceae*, gênero *Cucurbita* (Figura 2). Foram domesticadas pelos povos pré-hispânicos há cerca de 9.000 anos, nas civilizações Inca, Asteca e Maia. O interessante é que todas as partes da planta são utilizadas para o consumo, incluindo folhas e flores. Devido ao cruzamento entre as diversas espécies, intencionalmente ou não, a identificação das espécies não recebe o seu devido valor.

A abóbora utilizada nesse trabalho é conhecida popularmente como abóbora kabotyá ou abóbora japonesa. Ela é um fruto rico em vitamina A, fornece vitaminas do complexo B, cálcio e fósforo. O fruto cru possui 1,1 g de fibras totais/100 g de abóbora (Spiller, 1993).



Figura 1 - Abóbora (*Cucurbita* sp).

Polpa, sementes e folhas são indicadas popularmente para erisipela, febres, dores e inflamações em geral, queimaduras, verminoses, anemia, cegueira noturna, náuseas, vômitos, seborréia e acne. Possui propriedades anti-helmíntica (Guarrera, 1999), hipoglicêmica (Alarcon-Aguilar *et al.*, 2002), antiinflamatória e anticâncer (Jayaprakasam *et al.*, 2003).

Nesse tipo de pesquisa o interesse relaciona-se à necessidade da descoberta de novas substâncias de origem natural com ação comprovada e pouca toxicidade para os humanos. Nesse sentido, o uso popular de algumas plantas, freqüentemente consolidado por uma longa tradição, pode fornecer diretrizes e indicações úteis para possíveis aplicações, as quais podem ser posteriormente confirmadas por testes químicos e farmacológicos (Guarrera, 1999).

1.4. CROMATOGRAFIA DE ÍONS (CI)

A cromatografia de exclusão de íons (CEI) é uma variante da cromatografia de íons (CI), a qual, por sua vez, é um tipo de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na CEI, o sinal da

carga elétrica dos grupos funcionais dissociados da resina de troca iônica é o mesmo dos compostos iônicos analisados. Isto significa que analitos carregados negativamente (por exemplo, compostos ácidos dissociados) são separados usando resinas de troca catiônica, as quais apresentam grupos trocadores aniônicos (ácidos sulfônicos). Similarmente, analitos carregados positivamente (bases) são separados usando resinas de troca aniônica, as quais contêm grupos trocadores catiônicos (tetralquilamônio). As fases estacionárias empregadas em CEI também podem ser usadas em procedimentos convencionais de cromatografia de troca iônica (Glód, 1997).

O mecanismo de retenção, que ocorre no processo de exclusão de íons, foi descrito por Haddad e Jackson (1990) e por Glód (1994). Moléculas neutras e não dissociadas penetram na resina, enquanto os co-íons são repelidos pela presença de grupos funcionais dissociados imobilizados na fase estacionária. Por analogia ao equilíbrio da membrana de Donnan, a resina hidratada se comporta como uma membrana semi-permeável entre as fases móvel e estacionária. Com exceção dos grupos funcionais ligados covalentemente, todas as outras espécies são livremente trocadas através dessa membrana hipotética.

A exclusão de íons, raramente, é o único mecanismo de retenção, mesmo em resinas de exclusão iônica. A CEI, assim como outros métodos cromatográficos, é classificada de acordo com os mecanismos primários de retenção do soluto. Além disso, a exclusão de íons permite a adsorção hidrofóbica na resina (assim como na cromatografia de fase reversa), exclusão por tamanho, efeito da seleção do grupo funcional na amostra analisada, retenção da fase normal, interação de van der Waals e interações polares dos compostos da amostra com o suporte (Glód, 1997).

Nadkarni e Brewer (1987) relataram o uso do detector condutimétrico, quimicamente suprimido na CEI, para determinar ácidos graxos voláteis e não voláteis, em amostras aquosas com limite de detecção abaixo de 1 ppm.

A CEI, com supressão química e detecção condutimétrica, foi o método escolhido para a quantificação dos AGCC neste trabalho. Tal escolha deve-se ao caráter aquoso das amostras, já que este é um inconveniente para o uso de cromatografia gasosa, por exemplo.

2. OBJETIVOS

Geral

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

Específicos

- a) Quantificar a produção dos AGCC produzidos *in vitro*, principalmente butirato, a partir de diferentes combinações de polpa e semente de abóbora;
- b) Suplementar ratos com a mistura que mais produziu butirato para observar seu possível efeito protetor na inflamação intestinal induzida por TNBS;
- c) Analisar as lesões, algumas enzimas antioxidantes (GSH, GPx e GR), atividade da mieloperoxidase, peroxidação lipídica e interleucina-12 das porções cólicas dos animais submetidos à inflamação por TNBS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. FIBRAS

A abóbora, proveniente de cultivo orgânico, foi lavada e descascada. A polpa e as sementes foram secas em estufa à 40°C e trituradas no moinho de facas (Figura 3).

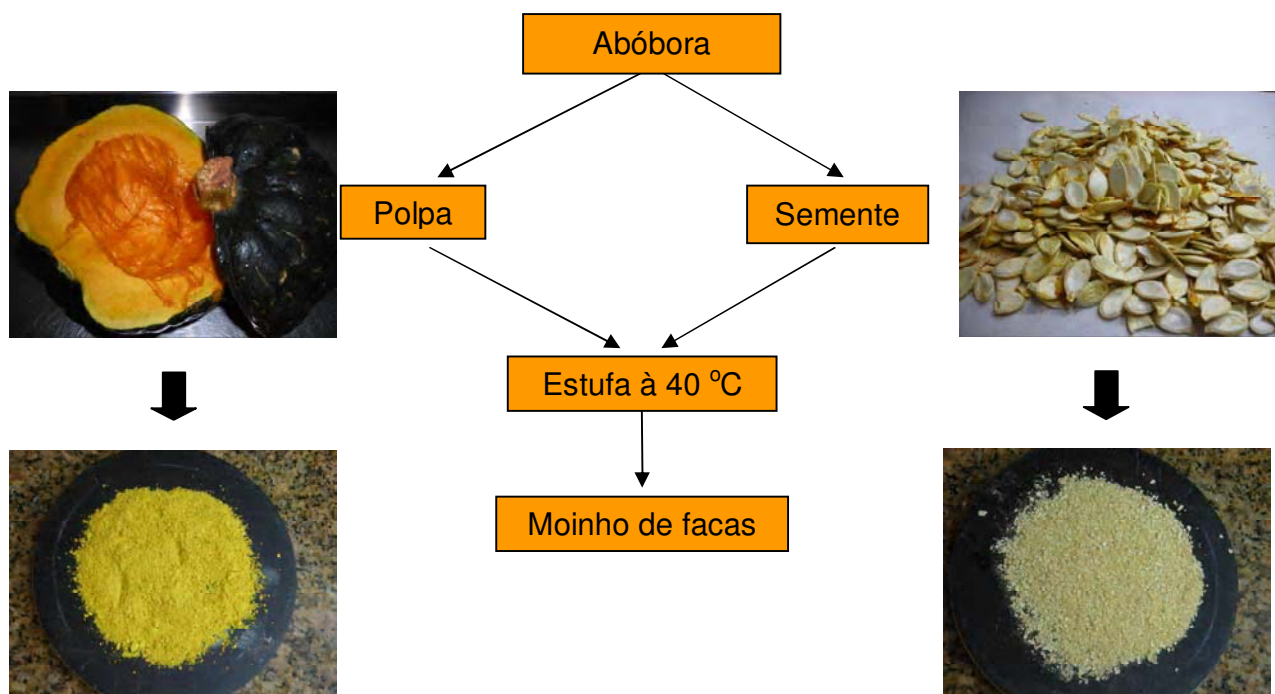


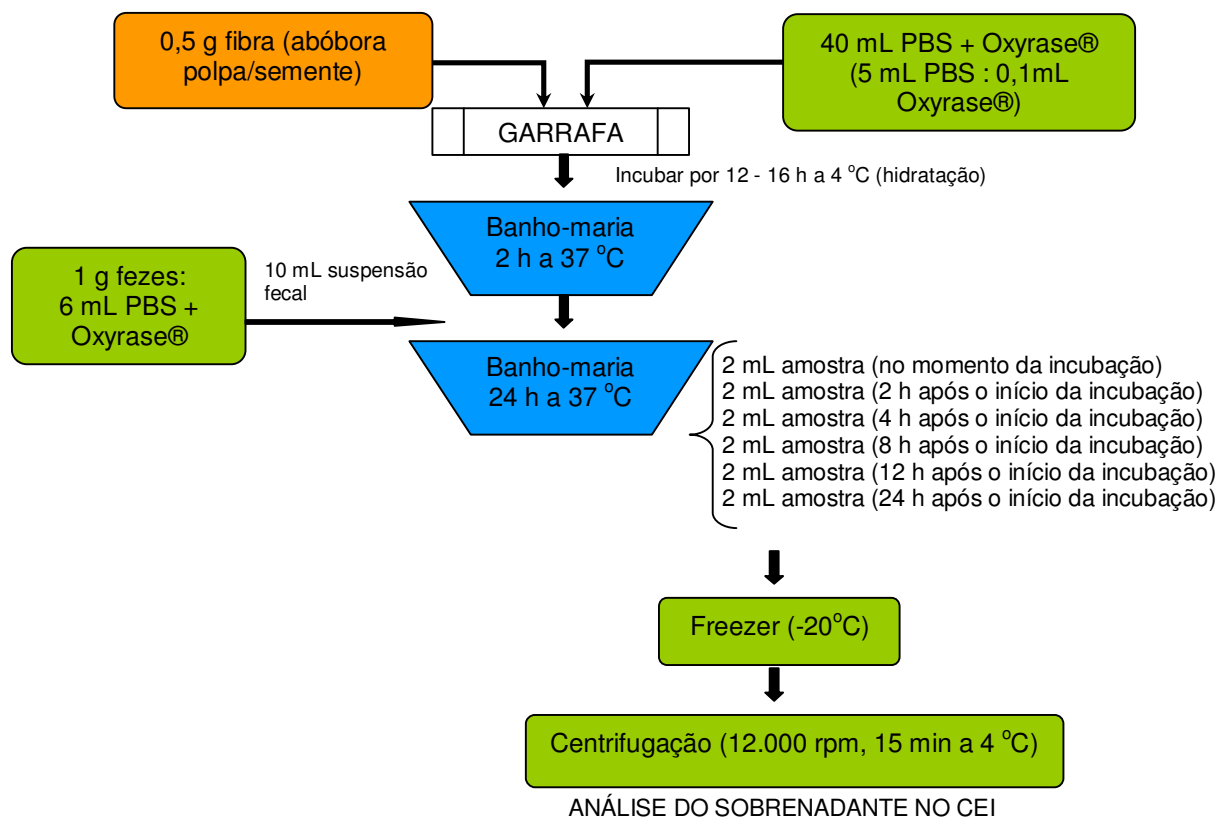
Figura 2 - Processamento da abóbora.

3.2. TESTE *IN VITRO*

Na etapa *in vitro*, as proporções de polpa/semente utilizadas foram: 0,5 g polpa; 0,4 g polpa + 0,1 g semente; 0,3 g polpa + 0,2 g semente; 0,25 g polpa + 0,25 g semente; 0,2 g polpa + 0,3 g semente; 0,1 g polpa + 0,4 g semente e 0,5 g semente. Cada mistura foi colocada em garrafa de plástico e hidratada com PBS pH 7,4 e Oxyrase® por 12 a 16 horas à 4°C. O Oxyrase® é uma enzima que retira o oxigênio do ambiente onde se encontra para permitir o crescimento das bactérias anaeróbicas intestinais. Após a hidratação das fibras, 10 mL de suspensão fecal de rato (suspendido em PBS pH 7,4 acrescido de Oxyrase® na proporção de 1:6) foram adicionados a essas fibras e incubadas por 24 horas, à 37°C, sob suave agitação. Durante essas 24 horas foram retiradas alíquotas de 2 mL nos tempos 0 (momento da incubação), 2, 4, 8, 12 e 24 horas. Foi adicionado 1 mL de solução de sulfato de cobre (10 g/L) em cada alíquota para inibir o crescimento

microbiano. Essas amostras foram armazenadas em freezer a -20°C para posterior quantificação dos AGCC (Velázquez *et al.*, 2000) (Figura 4).

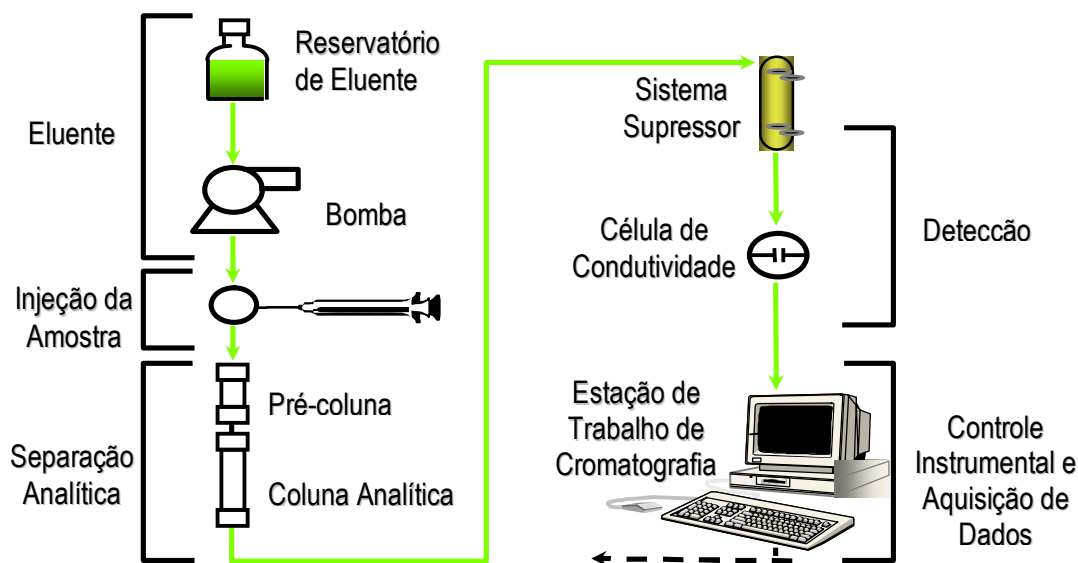
Os AGCC foram analisados por CEI no Laboratório do Prof. Dr. Lauro Kubota, no Instituto de Química da UNICAMP, com a finalidade de determinar qual mistura produziu mais butirato.



Fluxograma 1 - Teste *in vitro*

3.3. CROMATOGRAFIA DE ÍONS

Os AGCC foram quantificados no cromatógrafo de íons modular da marca Metrohm® usando uma coluna de exclusão de íons (Metrosep Organic Acids 100 x 7,8 mm, com partículas de $10\ \mu\text{m}$ à base de um copolímero de poliestireno-divinilbenzeno funcionalizado com grupos sulfônicos), e um volume de amostragem de $10\ \mu\text{L}$, sob eluição isocrática com uma solução de H_2SO_4 $0,5\ \text{mmol/L}$ a uma vazão de $0,6\ \text{mL/min}$, seguida por supressão inversa usando uma solução regenerante de LiCl $50\ \text{mmol/L}$ (Figura 5).



Esquema 2 - Cromatógrafo de Exclusão de Íons

3.4. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 180 e 250 g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram aclimatados às condições do biotério local, por cerca de 15 dias, antes dos ensaios experimentais, sob temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro-escuro controlado de 12 h, alimentados com ração Nuvital (Nuvilab) e água *ad libitum*.

Composição da ração: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos.

Níveis de garantia por kg do produto:

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

Os protocolos experimentais dos testes utilizados nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UNICAMP (Protocolo nº 861-1).

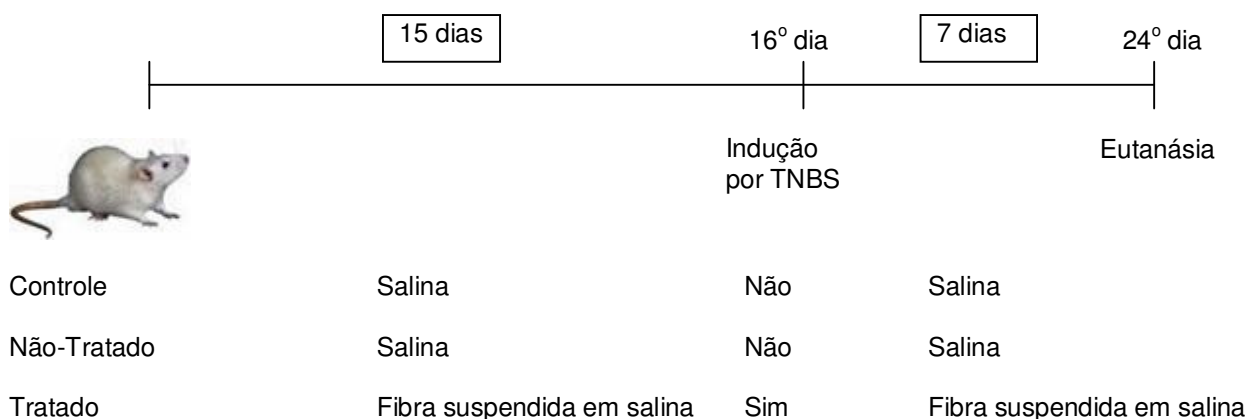
3.5. INFLAMAÇÃO INTESTINAL INDUZIDA POR TNBS

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

Foram utilizados 10 animais para cada grupo. Os grupos foram: controle (solução salina, 9 g/L), não-tratado (solução salina + indução por TNBS) e tratado (mistura 0,1 g de polpa + 0,4 g de semente de abóbora/kg + indução por TNBS).

Durante os 15 dias que antecederam a indução da inflamação e 7 dias após a indução, os grupos controle e não-tratado receberam, além da alimentação habitual, solução salina por gavagem (10 mL/kg). O grupo tratado recebeu a mistura de fibras que mais produziu butirato, isto é, 0,1 g de polpa e 0,4 g de semente de abóbora/kg em solução salina (Figura 6).

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



Esquema 3 - Inflamação intestinal induzida por TNBS.

3.6. DROGAS UTILIZADAS

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

3.7. DETECÇÃO DA LESÃO DO CÓLON

Após a eutanásia dos animais, a porção cólica (8 cm a partir do ânus) foi retirada e colocada rapidamente em placas de vidro resfriadas, removendo-se o mesentério e as gorduras aderidas. O colón foi aberto em seu sentido longitudinal, lavado, fotografado, dividido em 3 partes e congeladas a -80 °C, para determinações das enzimas antioxidantes (dosagem de grupamentos sulfidríla, glutathiona peroxidase e redutase) da atividade da mieloperoxidase e determinação do índice de peroxidação lipídica.

A lesão do cólon foi medida utilizando-se o programa AVSoft Bioview 4 Spectra Module, utilizando imagens das porções cólicas.

3.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

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

3.8.1. DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

Foi baseado no método de Bradford (1976). A absorbância foi lida no espectrofotômetro VersaMax microplate reader (Molecular Devices, USA) com o programa SoftMax® Pro a 600 nm.

3.8.2. QUANTIFICAÇÃO DOS GRUPAMENTOS SULFIDRILA (GSH)

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

3.8.3. ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

A atividade da GPx foi determinada de acordo com o método de Yoshikawa *et al.* (1993). Aos sobrenadantes foram adicionados 25 mM de H₂O₂, 10 mM de Glutathiona Reduzida, 0,8 mM de NADPH e 1 U de enzima glutathiona redutase em PBS, pH 7,4. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 365 nm, dentro de 3 a 10 minutos. Os resultados foram expressos em nmol/min por mg de proteína.

3.8.4. ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR)

Seguiu-se o método de Carlberg e Mannervik (1985). A reação enzimática foi constituída de: 0,1 M de tampão fosfato, pH 7,4, 0,2 mM de EDTA, 1 mM de GSSG e 0,1 mM de NADPH. A absorbância foi medida em espectrofotômetro à 365 nm. A atividade da enzima foi definida como nmol NADPH consumido/min/mg. O coeficiente de extinção para o NADPH utilizado foi 6,22 M⁻¹ cm⁻¹.

3.8.5. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)

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

3.8.6. ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

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

3.9. INTERLEUCINA 12 (IL-12)

A determinação da interleucina 12 foi realizada utilizando-se o kit imunoenzimático DuoSet DY 419 para IL-12 (p70) bioativa, da R & D Systems.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

5. RESULTADOS

5.1. TESTE *IN VITRO*

No teste *in vitro*, a mistura que mais produziu AGCC (acetato, propionato e butirato) em 24 horas de fermentação foi: 0,5 g de semente de abóbora com 16,3 % de AGCC (8,7 % acetato, 3,5 % propionato e 4,1 % butirato), seguida da mistura 0,1 g de polpa de abóbora + 0,4 g de semente de abóbora com 15,2 % de AGCC (8,8% acetato, 2,7 % propionato e 3,7 % de butirato) (Figura 7).

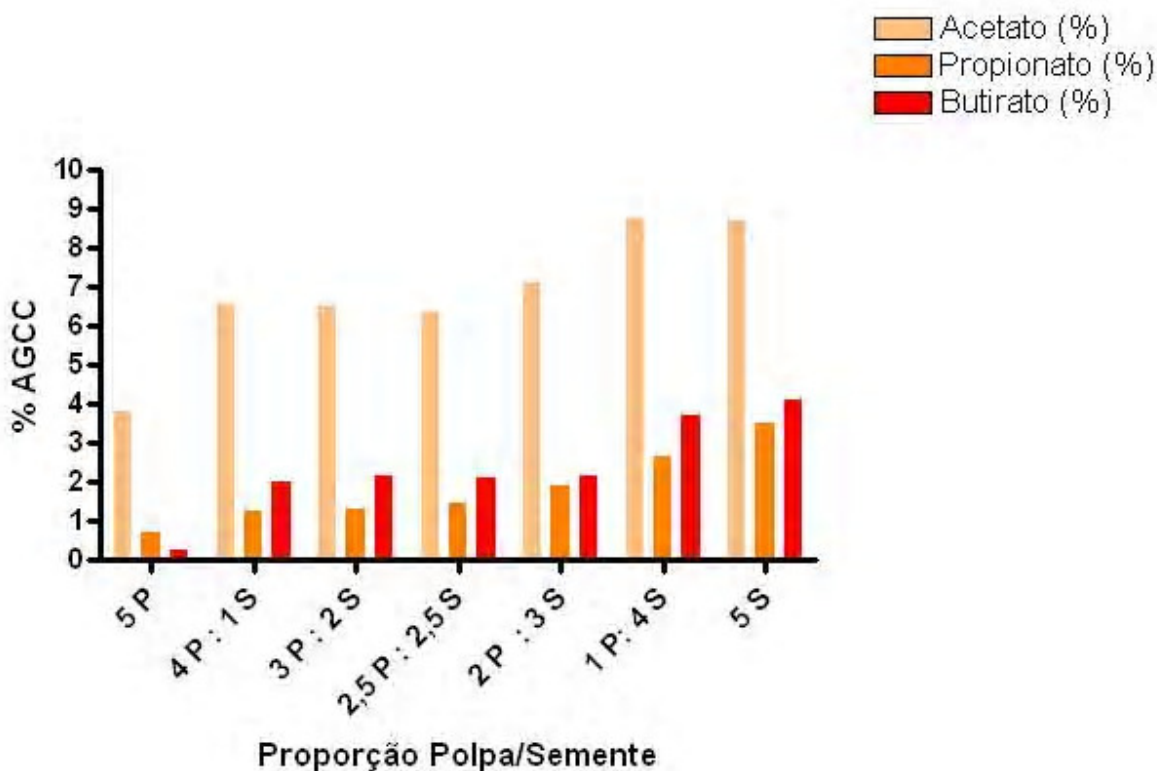


Gráfico 1 - Produção média dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC) no teste *in vitro*. Acetato, propionato e butirato produzidos durante 24 horas de fermentação de fibras alimentares pelas bactérias intestinais de rato a partir de diferentes proporções de polpa (P) e semente (S) de abóbora.

5.2. INFLAMAÇÃO INTESTINAL INDUZIDA POR TNBS

Na avaliação macroscópica o grupo tratado, que recebeu a mistura 0,1 g de polpa de abóbora + 0,4 g de semente/kg, apresentou o cólon bem menos inflamado que o grupo não-tratado, praticamente igualando-se ao controle (Figura 8). Metade dos 10 ratos do grupo tratado não apresentou diarreia. O grupo tratado teve a média da área de lesão de $54 \pm 18,29 \text{ mm}^2$ enquanto o grupo não-tratado teve essa média de $128 \pm 25,19 \text{ mm}^2$ (Figura 9).



Figura 3 - Região cólica após inflamação induzida por TNBS. Durante os 15 dias que antecederam a indução da inflamação e 7 dias após a indução, os grupos controle e não-tratado receberam, além da alimentação habitual, solução salina por gavagem (10 mL/kg). O grupo tratado recebeu uma mistura de fibras contendo 0,1 g de polpa + 0,4 g de semente de abóbora/kg em solução salina (n=10 para cada grupo).

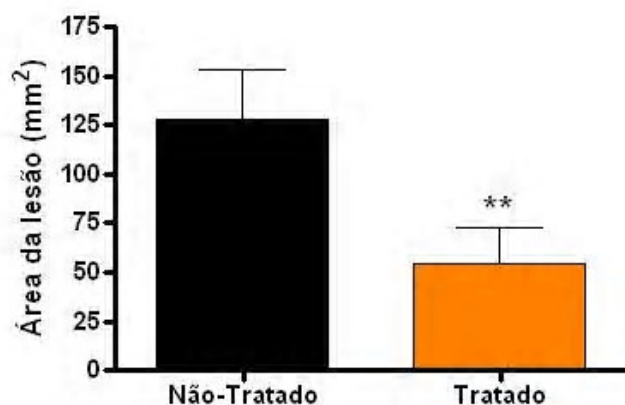


Gráfico 2 - Área da lesão na região cólica. Grupo que recebeu suplementação com a mistura de abóbora comparado ao grupo que não recebeu suplementação. Dados expressos em média $\pm$ d.p.. Teste t não-pareado (** $p < 0,05$ comparado ao grupo não-tratado).

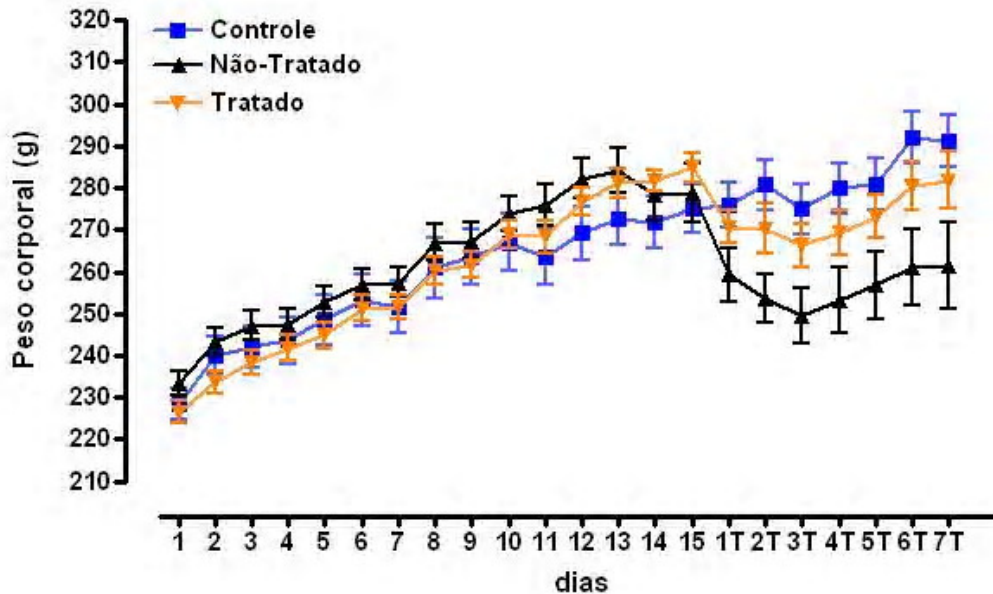


Gráfico 3 - Peso dos animais durante o experimento. A inflamação intestinal induzida por TNBS foi realizada no 15º dia. Dados expressos em média $\pm$ d.p.. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett ($p > 0,05$ comparados ao grupo controle).

Não houve diferença estatisticamente significativa para o peso (Figura 10).

O peso dos animais foi também avaliado em relação a área sob a curva. Nota-se que nos 3 dias após a indução da inflamação, a perda de peso dos grupos não-tratado e tratado com a mistura de abóbora foi acentuada (Figura 11). Porém, 7 dias após a indução o peso já é o mesmo nos 3 grupos (Figura 12).

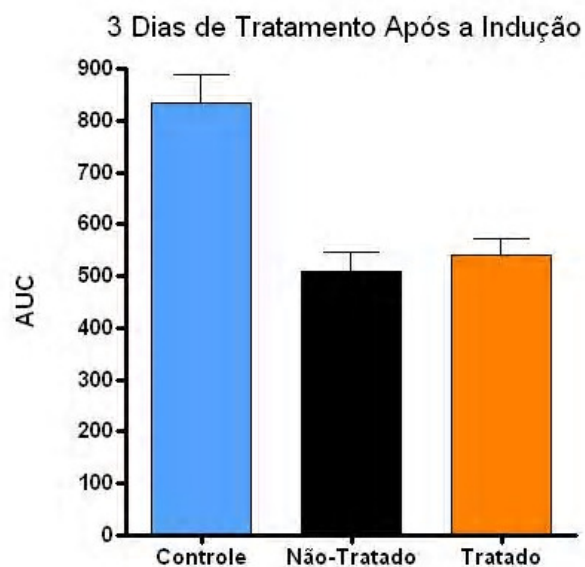


Gráfico 4 - Área sob a curva nos 3 dias após a indução. Dados expressos em média $\pm$ d.p.. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett ($p > 0,05$ comparados ao grupo controle).

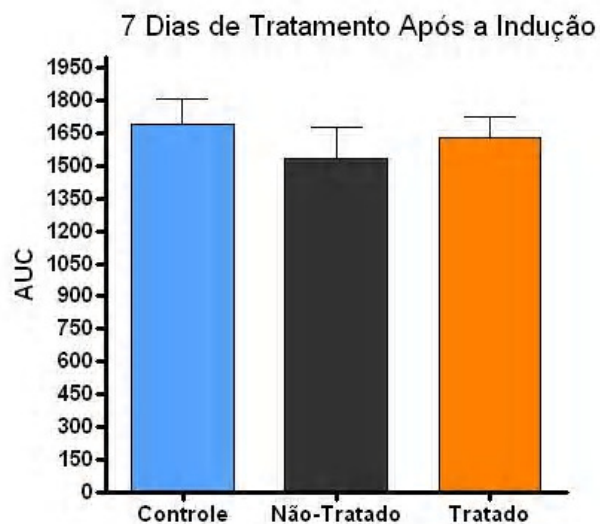


Gráfico 5 - Área sob a curva nos 7 dias após a indução. Dados expressos em média $\pm$ d.p.. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett ($p > 0,05$ comparados ao grupo controle).

5.2.1. GRUPAMENTOS SULFIDRILA (GSH)

Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de GSH entre os grupos não-tratado ($2,4 \pm 0,5$ nmol/mg proteína), tratado com a mistura de abóbora ($3,5 \pm 2$ nmol/mg proteína) e o controle ($4,3 \pm 2,1$ nmol/mg proteína) (Figura 13).

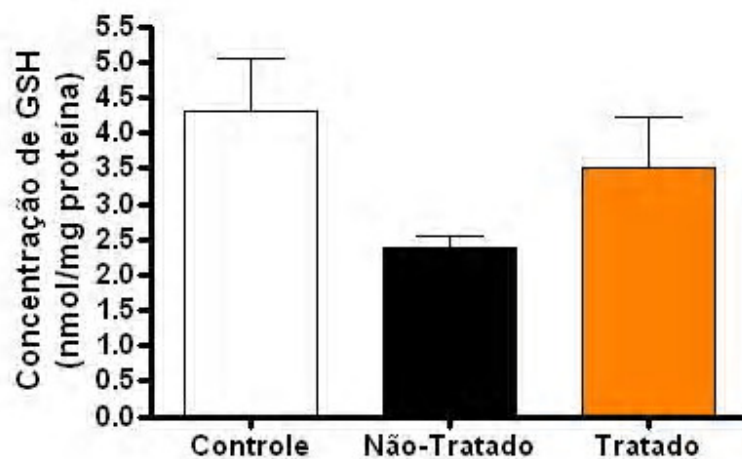


Gráfico 6 - Concentração dos Grupamentos Sulfidrila (GSH). Dados expressos em média $\pm$ e.p.m.. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett ($p > 0,05$ comparados ao grupo controle).

5.2.2. ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratado com a mistura de abóbora ($46,7 \pm 11,3$ nmol/min/mg proteína), não-tratado e o controle (61 ± 24 nmol/min/mg proteína). (Figura 14).

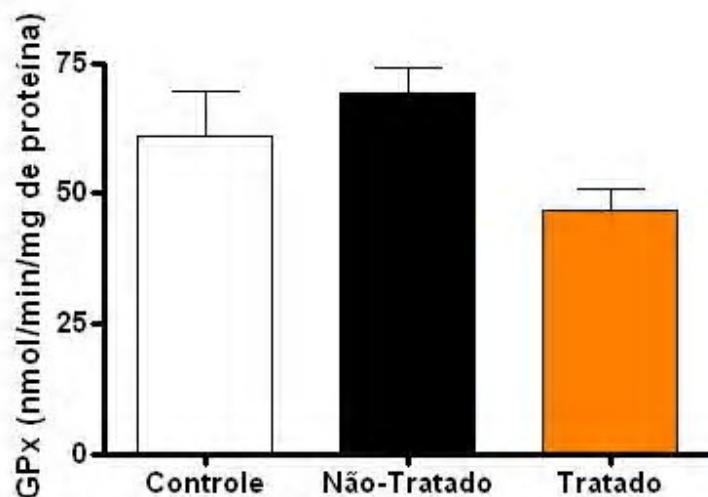


Gráfico 7 - Concentração da enzima Glutathione Peroxidase (GPx). Dados expressos em média $\pm$ e.p.m.. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett ($p > 0,05$ comparado ao grupo controle).

5.2.3. ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR)

Assim como em GSH e GPx, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle ($14,1 \pm 5,7$ nmol/min/mg proteína), não-tratado ($10,1 \pm 2$ nmol/min/mg proteína) e tratado com a mistura de abóbora ($13 \pm 3,4$ nmol/min/mg proteína) (Figura 15).

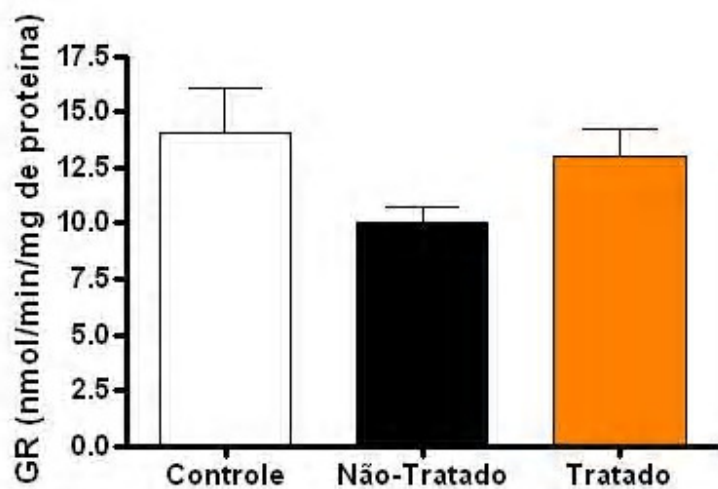


Gráfico 8 - Concentração da enzima Glutathione Redutase (GR). Dados expressos em média $\pm$ e.p.m.. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett ($p > 0,05$ comparados ao grupo controle).

5.2.4. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)

O nível de LPO teve aumento significativo no grupo não-tratado ($2,8 \pm 1,2$ pmol/mg proteína), enquanto que o grupo tratado com a mistura de abóbora ($1,8 \pm 0,6$ pmol/mg proteína) manteve-se no mesmo nível que o controle ($1,4 \pm 0,9$ pmol/mg proteína) (Figura 16).

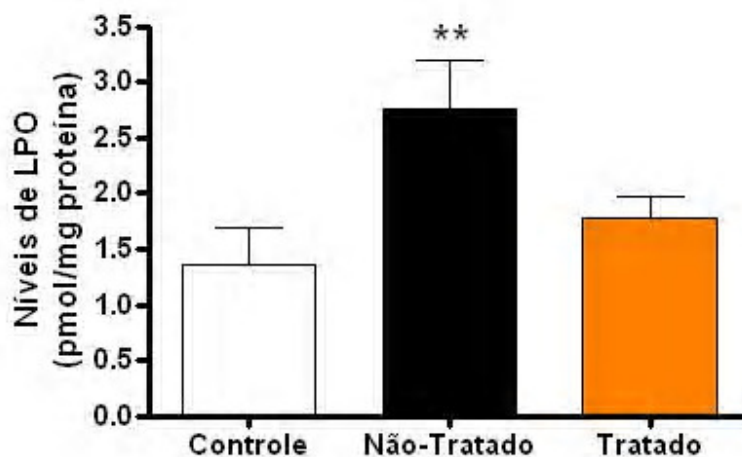


Gráfico 9 - Níveis de Peroxidação Lipídica (LPO). Dados expressos em média $\pm$ e.p.m.. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett (** $p < 0,05$ comparado ao grupo controle).

5.2.5. ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A MPO teve aumento significativo tanto no grupo tratado com a mistura de abóbora ($17,6 \pm 2,6$ U/g proteína) quanto no não-tratado ($35,8 \pm 11$ U/g proteína) em relação ao controle ($8,3 \pm 2,3$ U/g proteína). Além disso, há diferença estatisticamente significativa entre os grupos não-tratado e tratado (Figura 17).

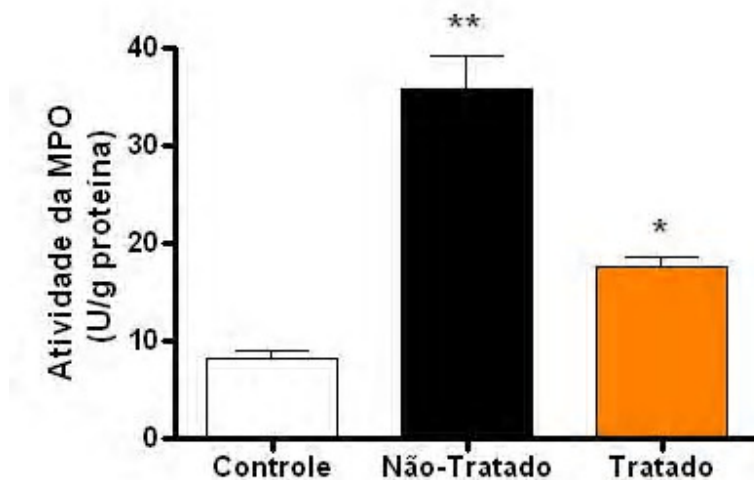


Gráfico 10 - Atividade da Mieloperoxidase (MPO). Dados expressos em média $\pm$ e.p.m.. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnet (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparados ao grupo controle).

5.2.6. INTERLEUCINA 12 (IL-12)

No grupo não-tratado ($102,2 \pm 42$ pg/mL) o nível de IL-12 foi significativamente maior, comparado ao controle ($52,4 \pm 12,1$ pg/mL). Os níveis de IL-12 entre os grupos controle e tratado com a mistura de abóbora ($45,7 \pm 9,2$ pg/mL) não se mostraram estatisticamente diferentes (Figura 18).

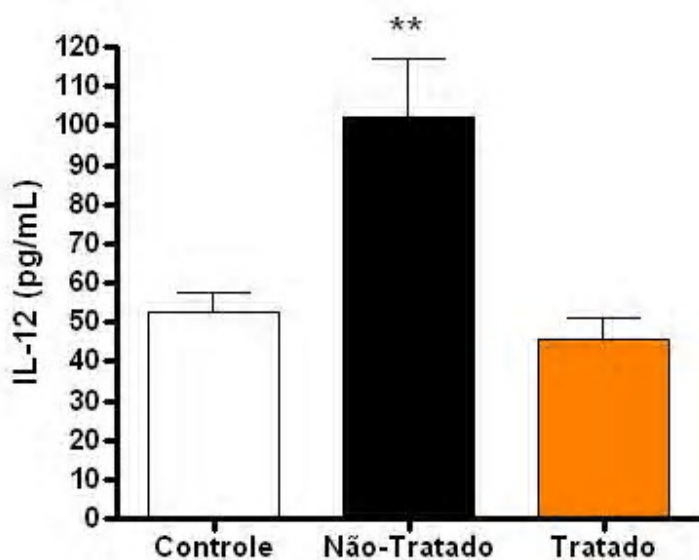


Gráfico 11 – Concentração de Interleucina-12. Dados expressos em média $\pm$ e.p.m.. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett (** $p < 0,05$ comparado ao grupo controle).

6. DISCUSSÃO

Carboidratos que chegam ao intestino grosso alteram a fisiologia cólica de duas maneiras: fisicamente (ao aumentar o volume das fezes, promovendo um efeito laxativo e diminuindo o tempo de trânsito intestinal) e quimicamente através da fermentação (Cummings, 1997). A fermentação gera energia - para o crescimento e manutenção microbiana - e produtos finais como: AGCC, gases (CO_2 , CH_4 e H_2) e um pouco de calor (Topping e Clifton, 2001). No cólon proximal, onde os substratos são abundantes, o número de bactérias benéficas (como *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*), a proliferação bacteriana e o grau de fermentação dos carboidratos são elevados; esses substratos são depletados no decorrer do trânsito intestinal, refletindo em uma menor produção de AGCC no cólon transversal e distal (MacFarlane e Gibson, 1995).

Os AGCC contribuem para o funcionamento normal do intestino grosso, prevenindo doenças através de suas ações no lúmen, na musculatura cólica e vascular e através de seu metabolismo pelos colonócitos. Acredita-se que o butirato, em particular, mantenha equilibrada a regeneração dos colonócitos (Topping e Clifton, 2001).

Dentre as técnicas existentes para quantificar os AGCC, apenas a fermentação *in vitro* oferece uma estimativa confiável da produção desses ácidos (Topping e Clifton, 2001).

No presente trabalho realizou-se o teste *in vitro* para a quantificação dos AGCC. Dentre as diferentes misturas de polpa e semente de abóbora fermentadas pelas bactérias anaeróbicas intestinais, a semente de abóbora sozinha foi a que mais produziu AGCC. Spiller (1993) afirma que 100 g de polpa de abóbora contêm 1 g de fibras totais (FT), sendo 0,6 g de fibras insolúveis (FI) e 0,4 g de fibras solúveis (FS). Já 100 g de sementes de abóbora contêm 6,8 g de FT, sendo 4,9 g de FI e 1,9 g de FS.

Tomando como base essas informações, observou-se que 0,5 g de semente foi a maior fornecedora de fibras totais, seguida da mistura 0,1 g de polpa + 0,4 g de semente. Verificou-se que há uma correlação entre as quantidades de FS e a produção de AGCC (Gráfico 1).

Sabe-se que, de modo geral, as FS produzem AGCC e as FI levam esses ácidos até a região final do intestino, onde se dá a inflamação. Uma vez que as quantidades de butirato produzidas tanto em 0,5 g de semente como na mistura 0,1 g de polpa + 0,4 g de semente foram elevadas, optou-se pela utilização da mistura, de tal modo que os ácidos produzidos no cólon ascendente fossem conduzidos até o cólon distal.

Para investigar a imunopatogênese das DII, modelos murinos de colite experimental têm sido desenvolvidos, sendo freqüentemente usados para avaliar novas estratégias antiinflamatórias (Bouma e Strober, 2003; Pizarro *et al.*, 2003; Andreakos *et al.*, 2004). Um dos modelos mais

utilizados é o da colite induzida pelo TNBS (Te Velde *et al.*, 2006). O etanol utilizado para a diluição do TNBS tem a função de desestruturar a mucosa, expondo o sistema imune à microflora intestinal (Te Velde *et al.*, 2006).

A avaliação macroscópica e a área de lesão (Figura 3 e Gráfico 2) do grupo tratado foram muito próximas ao grupo controle, mostrando uma forte proteção das FA de abóbora na inflamação intestinal induzida por TNBS. Esse efeito antiinflamatório observado deve-se, provavelmente, ao butirato, que pode inibir a ativação da transcrição do NF- κ B, reduzindo a formação de citocinas pró-inflamatórias (Segain *et al.*, 2000; Luhrs *et al.*, 2001)

Os Gráficos 3, 4 e 5 mostram uma rápida recuperação do peso corporal nos grupos com lesão induzida por TNBS, indicando que o agente lesivo não foi tóxico para os ratos. A perda de peso é o principal e mais importante índice de toxicidade de determinada substância (Souza Brito, 1994).

Na tentativa de compreender o mecanismo protetor das FA de abóbora na inflamação intestinal induzida por TNBS, analisou-se a participação da IL-12 e de algumas enzimas do sistema antioxidante. Acredita-se que os radicais de oxigênio sejam fatores patogênicos nas DII. Evidências experimentais sugerem que os efeitos mediados por ERO sejam importantes, tanto primária quanto secundariamente, nos mecanismos patofisiológicos das inflamações intestinais (Kruidenier e Verspaget, 2002).

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

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

estrutura e funções de membranas (Lu, 2000). O GSH pode ser consumido por uma reação indireta com compostos ativados pelo TNBS, conhecidos como mecanismo de inativação xenobiótica (Nieto *et al.*, 2000). Entretanto, no experimento realizado no laboratório, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Gráfico 6).

É descrito que o cólon humano tem pequenas quantidades de enzimas antioxidantes como catalase, superóxido dismutase e GPx. O desequilíbrio entre essas enzimas seqüestradoras de radicais livres e a produção de ERO pode levar a danos no tecido (Nieto *et al.*, 2000).

Um aumento da GPx, enzima que metaboliza peróxidos no epitélio cólico (Drew *et al.*, 2005), foi observado em ratos com colite induzida por TNBS (Nieto *et al.*, 2000). Porém, os dados obtidos no laboratório não tiveram diferença estatisticamente significativa (Gráfico 7).

A GR utiliza o cofator NADPH e converte GSH à sua forma reduzida, uma vez que a enzima GPx converte H_2O_2 em H_2O a partir da glutatona (Kwiecien *et al.*, 2002). Os dados obtidos indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Gráfico 8).

ERO podem atacar componentes celulares e extracelulares. Sabe-se que os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares da bicamada lipídica são os principais alvos das ERO (Gutteridge, 1995). Uma vez que o processo de LPO é iniciado, normalmente pelo OH, ele continua numa reação em cadeia gerando hidroperóxidos lipídeos e aldeídos. O acúmulo de hidroperóxidos na membrana celular tem um profundo efeito na sua fluidez e na atividade das enzimas transmembranas, transportadores, receptores e outras proteínas de membrana (Jourd'Heuil *et al.*, 1993). Como consequência, a LPO pode causar mudanças na seletividade e permeabilidade da membrana, levando a alterações no volume e no metabolismo celular (Chen *et al.*, 1995). Além disso, hidroperóxidos e aldeídos são tóxicos para as células e suas organelas (Aw, 1998), possuem propriedades quimiotáticas de neutrófilos e podem regular a produção de citocinas (Jayatilleke e Shaw, 1998). O processo de LPO acelera quando o sistema de detoxificação celular falhou na remoção dos precursores de OH, em particular os hidroperóxidos. Uma vez iniciada, a LPO pode ser interrompida por antioxidantes lipossolúveis, como o α -tocoferol (vitamina E), e mais recentemente, o NO, que também mostrou ser um antioxidante capaz de interromper esse processo (Hogg e Kalyanaraman, 1999).

Nesse trabalho determinou-se o nível de LPO (Gráfico 9) e observou-se que esse nível nos animais suplementados com a mistura 0,1 g de polpa + 0,4 g de semente retomou o nível do grupo controle.

A atividade da MPO é uma medida indireta do nível de inflamação através da infiltração de neutrófilos. De acordo com Lührs *et al.* (2002), o butirato inibiu a ativação do NFkB e reduziu o número de neutrófilos nas criptas e superfície do epitélio em pacientes com RCUI. A atividade da

MPO, no grupo não-tratado, foi extremamente elevada em relação ao grupo suplementado com a mistura 0,1 g de polpa + 0,4 g de semente (Gráfico 10). Desse modo, a diminuição da atividade da MPO no grupo tratado indica, indiretamente, menor grau de inflamação e pode ser atribuído ao butirato.

Citocinas são mediadores locais produzidos por células da linhagem linfóide e dos macrófagos, bem como por células epiteliais e mesenquimais. Esses mediadores estão envolvidos em processos biológicos como ativação celular, crescimento e diferenciação, sendo importantes no processo inflamatório (Sartor, 1994; Elson, 1996). Células do sistema imune inato, como macrófagos e monócitos, são capazes de promover uma rápida resposta frente a um sinal de perigo, por exemplo, um agente infeccioso, secretando inúmeras citocinas próinflamatórias (Rang *et al.*, 2004).

Na última década, pesquisas com ratos e camundongos têm fornecido ferramentas para identificar citocinas envolvidas nas respostas inflamatórias em DII. Dentre as interleucinas, a IL-12 é apontada como uma das principais no desenvolvimento e perpetuação da colite, promovendo respostas Th1 (Bouma e Strober, 2003). No presente trabalho, a IL-12 (Gráfico 11) ficou extremamente aumentada no grupo não-tratado com FA de abóbora. Descobertas mais recentes sugerem que a IL-12 possa ser mediada pela IL-23. Alguns estudos afirmam que a IL-23 é a responsável por orquestrar toda a cascata de citocinas inflamatórias, aumentando o nível de TNF α , IL-6, IFN- γ e IL-17 no intestino (McGovern e Powrie, 2007).

Muitas plantas usadas na medicina popular para tratar inflamações contêm triterpenóides. Estes desempenham importante função antiinflamatória, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, incluindo supressões de prostanóides e da produção de citocinas, bem como inibição da peroxidação lipídica (Safayhi e Sailer, 1997).

A abóbora, da família das Cucurbitaceae, contém muitas cucurbitacinas, que são triterpenóides tetracíclicos altamente oxigenados. A ação antiinflamatória também pode ser explicada por essas cucurbitacinas (Escandell *et al.*, 2007). As sementes da abóbora, por sua vez, são ricas em ácidos graxos essenciais, incluindo os ácidos linoleico e linolênico, β -carotenos, luteína, gama e β -tocoferóis, fitoesteróis e selênio (Zambo, 1988), que possuem propriedades antioxidantes prevenindo a depleção de GSH e GR. Tocoferóis e selênio agem sinergisticamente em tecidos animais sendo um importante mecanismo de defesa antioxidante contra a peroxidação lipídica da membrana celular mediada por radicais livres. O selênio age reduzindo hidroperóxidos semiestáveis para álcoois menos reativos. Além disso, tocoferóis e glutathione peroxidase-selênio podem exercer um papel mais específico modulando oxidações enzimáticas do ácido araquidônico através da inibição das vias da ciclooxygenase e lipooxygenase, que sintetizam PGE₂ e LTB₄ (Reddanna *et al.*, 1980).

Portanto, a atividade antiinflamatória das FA de abóbora talvez possa ser atribuída, mais especificamente, às cucurbitacinas, à alteração do equilíbrio bactérias benéficas/potencialmente patógenas no intestino, ao aumento na produção do butirato e às substâncias antioxidantes das sementes.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- A suplementação de fibras alimentares de abóbora na proporção 0,1 g de polpa + 0,4 g de semente/kg por 15 dias antes e 7 dias após a inflamação intestinal induzida por TNBS atenuou a inflamação;
- Sugere-se um forte potencial antiinflamatório, onde os ratos suplementados com essa mistura tiveram a área de lesão, níveis de mieloperoxidase e interleucina-12 muito próximos daqueles do grupo controle;
- O efeito antioxidante foi observado apenas em relação à peroxidação lipídica; os grupamentos sulfidrila, glutathione redutase e glutathione peroxidase, do ponto de vista estatístico, mantiveram os mesmos níveis em todos os grupos.
- As fibras alimentares de abóbora podem ser fortes aliadas na prevenção das inflamações intestinais;
- Novas investigações deverão ser feitas para a elucidação do mecanismo de ação das fibras alimentares de abóbora na inflamação. Isso poderá ser realizado através da quantificação de outras interleucinas, como a IL-6, IL-10 e IL-23 e fatores pró-inflamatórios como o TNF- α e o NF κ B.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCD – Associação Brasileira de Colite e Doença de Crohn [acesso em 10 de jan de 2008]. Disponível em: URL:<http://www.abcd.org.br/revista/n12/index.htm>

Agrawal A, Rhodes JM. Smoking and IBD. IBD Monitor 2003; 4: 114-119.

Ahmad MS, Krishnan S, Ramakrishna BS, Mathan M, Pulimood AB, Murth SN. Butyrate and glucose metabolism by colonocytes in experimental colitis in mice. Gut 2000; 46: 493-499.

Alarcon-Aguilar FJ, Hernandez-Galicia E, Campos-Sepulveda AE, Xolalpa-Molina S, Rivas-Vilchis JF, Vazquez-Carrillo LI *et al.* Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) in different experimental models. J Ethnopharmacol 2002; 82: 185-189.

Alstead EM. The pill: safe sex and Crohn's disease? Gut 1999; 45(2): 165-166.

Andreaskos E, Foxwell B, Feldmann M. Is targeting Toll-like receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to modulating cytokine-driven inflammation? Immunol Rev 2004; 202: 250-265.

Ardite E, Sans M, Panes J, Romero FJ, Pique JM, Fernandez-Checa JC. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. Lab Invest 2000; 80: 735-744.

Aw TY. Determinants of intestinal detoxification of lipid hydroperoxides. Free Rad Res 1998; 28: 637-646.

Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. N Engl J Med 2002; 347(12): 911-920.

Bamias G, Nyce MR, De La Rue SA, Cominelli F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. Ann Inter Med 2005; 143: 895-904.

Bauditz J, Wedel S, Lochs H. 1,25-dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. J Nutr 2000; 130: 2648-2652.

Bauditz J, Wedel S, Lochs H. Thalidomide reduces tumours necrosis factor (alpha) and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease. *Gut* 2002; 50: 196-200.

Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369: 1627-1640.

Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007; 369: 1641-1657.

Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagause P *et al.* Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 2003; 52(6): 840-846.

Biondo-Simões MLP, Mandelli KK, Pereira MAC, Faturi JL. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. *Rev Bras Coloproct* 2003; 23(3): 172-182.

Bjornsson S, Johannsson JH. Inflammatory bowel disease in Iceland, 1990-1994: a prospective, nationwide, epidemiological study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12(1): 31-38.

Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003; 124(2): 521-536.

Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 521-533.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 172: 248-254.

Bridger S, Lee JC, Bjarnason I, Jones JE, Macpherson AJ. In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Gut* 2002; 51(1): 21-25.

Campbell JM, Fahey Jr GC, Wolf BW. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J Nutr* 1997; 127: 130-136.

Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Meth Enzymol* 1985;113: 484-499.

Chamaillard M, Philpott D, Girardin SE, Zouali H, Lesage S, Chareyre F *et al.* Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(6): 3455-3460.

Chen JJ, Bertrand H, Yu BP. Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products. *Free Rad Biol Med* 1995; 19: 583-590.

Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Thayer WR, Mercal RS, Coutu JA. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1984; 29(12): 1073-1079.

Cho JH. The nod2 gene in Crohn's disease: implications for future research into the genetics and immunology of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7(3): 271-275.

Cho JH. Significant role of genetics in IBD: the nod2 gene. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; 3(1): S18-S22.

Chu FF, Esworthy RS, Doroshov JH. Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Rad Biol Med* 2004; 36: 1481-1495.

Cipolla G, Crema F, Sacco S, Moro E, De Ponti F, Frigo G. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and inflammatory bowel disease: current perspectives. *Pharmacol Res* 2002; 46(1): 1-6.

Colombel JF, Rutgeerts P, Malchow H, Jacyna M, Nielsen OH, Rask-Madsen J *et al.* Interleukin 10 (Tenovil) in the prevention of postoperative recurrence of Crohn's disease. *Gut* 2001; 49: 42-46.

Conner EM, Grishan MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 1996; 12(4): 274-277.

Cope GF, Heatley RV, Kelleher JK. Smoking and colonic mucus in ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; 293(6545): 481.

Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 481-496.

Coulie B, Camilleri M, Bharucha AE, Sandborn WJ, Burton D. Colonic motility in chronic ulcerative proctosigmoiditis and the effect of nicotine on colonic motility in patients and healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15(5): 653-663.

Cummings JH. The large intestine in nutrition and disease. Brussels: Institute Danone, 1997.

Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 2004; 3(5): 394-400.

Das D, Banerjee RK. Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. *Mol Cell Biochem* 1993; 125: 115-125.

Drew JE, Farquharson AJ, Arthur JR, Morrice PC, Duthie GG. Novel sites of cytosolic GSH peroxidase expression in colon. *FEBS Lett.* 2005; 579: 6135-6139.

Drewe E, Powell RJ. Clinically useful monoclonal antibodies in treatment. *J Clin Pathology* 2002; 55: 81-85.

Duerr RH. Update on genetics of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37(5): 358-367.

Eastwood MA, Morris ER. Physical properties of dietary fiber that influence physiological function: a model for polymers along the gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1992, 55: 436-442.

Elson CO. Genes, microbes, and T cells – new therapeutic targets in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 614-616.

Elson CO. The basis of current and future therapy for inflammatory bowel disease. *Am J Med* 1996; 100: 656-662.

Engel GL. Psychological factors in ulcerative colitis in man and gibbon. *Gastroenterology* 1969; 57: 362-365.

Escandell JM, Recio MC, Manez S, Giner RM, Cerda-Nicolas M, Rios JL. Cucurbitacin R reduces the inflammation and bone damage associated with adjuvant arthritis in lewis rats by supression of tumor necrosis factor-alpha in T lymphocytes and macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320: 581-590.

Evans MJ, Eckert A, Lai K, Adelman SJ, Harnish DC. Reciprocal antagonism between estrogen receptor and NF-kappaB activity in vivo. *Circ Res* 2001; 89(9): 823-830.

Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 2003; 91: 48-55.

FAO/WHO – Food and Agriculture Organization of the United Nations e World Health Organization [acesso em 14 de nov de 2007]. Disponível em: URL:<http://www.sbaif.org.br>

Faure P, Lafond JL. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. *Anal Free Rad Biol Syst* 1995; 237-248.

Fraser AG, Morton D, McGovern D, Travis S, Jewell DP. The efficacy of methotrexate for maintaining remission in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002 b; 16: 693-697.

Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* 2002 a; 50: 485-489.

Galvez J, Rodriguez-Cabezas ME, Zarzuelo A. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 601-608.

Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concepts of prebiotics. *J Nutr* 1995; 125: 1401-1412.

Glód BK. Ion exclusion chromatography: parameters influencing retention. *Neurochem Res* 1997; 22(10): 1237-1248.

Glód BK. Retention mechanism of ion-exclusion chromatography. *Chem Anal Warsaw* 1994; 39: 399-422.

Greenwood-Van MB, Tyler K, Keith Jr JC. Recombinant human interleukin-11 modulates ion transport and mucosal inflammation in the small intestine and colon. *Lab Invest* 2000; 80: 1269-1280.

Griffiths AM, Ohlsson A, Sherman PM, Sutherland LR. Metaanalysis of enteral nutrition as a primary treatment of active Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995; 108: 1056-1067.

Grosfeld JL, Du X, Williams DA. Interleukin-11: its biology and prospects for clinical use. *J Parent Ent Nutr* 1999; 23: 67-69.

Guarrera PM. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *J Ethnopharmacol* 1999; 68: 183-192.

Guslandi M, Tittobello A. Pilot trial of nicotine patches as an alternative to corticosteroids in ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1996; 31(4): 627-629.

Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.

Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F *et al.* Induction of nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cell via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 2002; 277(44): 41701-41705.

Haddad PR e Jackson PE. *Ion Chromatography: Principles and Applications (Journal of Chromatography Library, volume 46)*. Netherlands: Elsevier; 1990.

Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8.

Hallert C, Bjorck I, Nyman M. *et al.* Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patientis by diet: controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9(2): 116-121.

Halter F, Tarnawski AS, Schmassmann A, Peskar BM. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. *Gut* 2001; 49: 443-453.

Head KA, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease part I: Ulcerative colitis – Pathophysiology and Conventional and Alternative Treatment Options. *Alt Med Rev* 2003; 8: 247-279.

Henderson AD. Gene delivery. *J Control Release* 1997; 46: 75-87.

Herfarth H, Scholmerich J. IL-10 therapy in Crohn's disease: at the crossroad. *Gut* 2002; 50: 146-147.

Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 378-384.

Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L *et al.* Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379(6568): 821-823.

Husebye E, Hellstrom PM, Sundler F, Chen J, Midtvedt. Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G368-G380.

Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S *et al.* Nod 1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 1999; 274(21): 14560-14567.

Inohara N, Ogura Y, Nunez G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5(1): 76-80.

Jackson LM, Hawkey CJ. COX-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs: do they really offer any advantages? *Drugs* 2000; 59: 1207-1216.

Jafri S, Pasricha PJ. Agentes utilizados para diarreia, prisão de ventre e doença inflamatória intestinal, agentes utilizados para doença biliar e pancreática. In: Hardman JG, Limbird LE (Ed) Goodman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: Mac Graw-Hill; 2003 p.788.

James SL, Muir JG, Curtis SL, Gibson PR. Dietary fibre: a roughage guide. Int Med J 2003; 33: 291-296.

Jayaprakasam B, Seeram NP, Nair MG. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from Cucurbita andreana. Cancer Letters 2003; 189: 11-16.

Jayatileke A, Shaw S. Stimulation of monocyte interleukin-8 by lipid peroxidation products: a mechanism for alcohol-induced liver injury. Alcohol 1998; 16: 119-123.

Jones VA, Dickinson RJ, Workman E, Wilson AJ, Freeman AH, Hunter JO. Crohn's disease: maintenance of remission by diet. Lancet 1985; 2(8448): 177-180.

Jourd'Heuil D, Vaananen P, Meddings JB. Lipid peroxidation of the brush-border membrane: membrane physical properties and glucose transport. Am J Physiol 1993; 264: G1009-1015.

Kanauchi O, Nakamura T, Agata K, Miissuyama K, Iwanaga T. Effects of germinated barley foodstuff on dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. J Gastroenterol 1998; 33: 179-188.

Karmeli F, Cohen P, Rachmilewitz D. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors ameliorate the severity of experimental colitis in rats. Eur J Gastroenterol Hepatol 2000; 12: 223-231.

Katz JA. Treatment of inflammatory bowel disease with corticosteroids. Gastroenterol Clin North Am 2004; 33(2): 171-189.

Keshavarzian A, Banan A, Farhadi A, Komanduri S, Mutlu E, Zhang Y *et al.* Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. Gut 2003; 52: 720-728.

Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984; 87: 1344-1350.

Kruidenier L, Verspaget HW. Oxydative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease – radical or ridiculous? *Alim Pharmacol Ther* 2002; 16 (12), 1997-2015.

Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S *et al.* Crohn's disease and nod2 gene: a role for Paneth cells. *Gastroenterology* 2003; 125(1): 47-57.

Langlands SJ, Hopkins MJ, Coleman N, Cummings JH. Prebiotic carbohydrates modify the mucosa-associated microflora of the human large bowel. *Gut* 2004; 53: 1610-1616.

Laroux FS, Pavlick KP, Wolf RE, Grisham MB. Dysregulation of intestinal mucosal immunity: implications in inflammatory bowel disease. *News Physiol Sci* 2001; 16: 272-277.

Lewis JD, Lichtenstein GR, Stein RB, Deren JJ, Judge TA, Fogt F *et al.* An open-label trial of the PPAR-gama ligand rosiglitazone for active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 3323-3328.

Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126: 1504-1517.

Loftus EV Jr, Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gut* 2000; 46(3): 336-343.

Lu SC. S-adenosylmethionine. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 391-395.

Lührs H, Gerke T, Müller JG, Melcher R, Schaubert J, Boxberger F *et al.* Butyrate inhibits NF- κ B activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 458-466.

Lührs H, Gerke T, Schaubert J, Dusel G, Scheppach W, Menzel T. Cytokine-activated degradation of inhibitory kappa B protein alpha is inhibited by the short chain fatty acid butyrate. *Int J Colorect Dis* 2001; 16: 195-201.

MacFarlane GT; Gibson GR. Microbial aspects of the production of short-chain fatty acids in the large bowel. In: *Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids*. Cummings JH, Rombau JL, Sakata S. Cambridge, UK: Cambridge Univ Press 1995, 87.

Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 2000; 288: 2222-2226.

Maeda Y, Noda S, Tanaka K, Sawamura S, Aiba Y, Ishikawa H *et al*. The failure of oral tolerance induction is functionally coupled to the absence of T cells in Peyer's patches under germfree conditions. *Immunobiology* 2001; 204: 442-457.

Martensson J, Jain A, Meister A. Glutathione is required for intestinal function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1715-1719.

Matsumoto S, Watanabe N, Imaoka A, Okabe Y. Preventive effects of *bifidobacterium* and *lactobacillus* fermented milk on the development of inflammatory bowel disease in senescence-accelerated mouse P1/Yit strain mice. *Digestion* 2001; 64: 92-99.

Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 2005; 54: 1481-1491.

Mayer EA. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut* 2000; 47: 861-869.

McCormack G, McCormick PA, Hyland JM, O'Donoghue DP. Cyclosporin therapy in severe ulcerative colitis: is it worth the effort? *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 1200-1205.

McGovern D, Powrie F. The IL23 axis play a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut* 2007; 56: 1333-1336.

Medzhitov R. Toll-like receptor and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 135-145.

Mittermaier C, Dejaco C, Waldhoer T, Oefflerbauer-Ernst A, Miehsler W, Beier M *et al.* Impact of depressive mood on relapse in patients with inflammatory bowel disease: a prospective 18-month follow-up study. *Psychosom Med* 2004; 66: 79-84.

Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803.

Mortensen PB, Clausen MR. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31(216): 132-148.

Nadkarni RA, Brewer JM. Applications of IC in Environmental Analysis. *Am Lab* 1987; 19(2):50.

Nieto N, Torres MI, Fernandez MI, Giron MD, Rios A, Suarez MD, Gil A. Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1820-1827.

Noble A, Baldassano R, Mamula P. Novel therapeutic options in the inflammatory bowel disease world. *Digest Liver Dis* 2008; 40: 22-31.

Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001; 276(7): 4812-4818.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2): 351-358.

Oz HS, Chen TS, McClain CJ, de Villiers WJ. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 297-304.

Pelteková VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X *et al.* Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004; 36(5): 471-475.

Peran L. Efecto antiinflamatorio intestinal de probióticos em el modelo de colitis experimental inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico em ratas [Tese-Doutorado]. Granada, Espanha: Universidad de Granada; 2007.

Pizarro TT, Arseneau KO, Bamias G, Cominelli F. Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol Med* 2003; 9: 218-222.

Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347(6): 417-429.

Pullan RD, Rhodes J, Ganesh S, Mani V, Morris JS, Williams GT *et al.* Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Engl J Med* 1994; 330(12): 811-815.

Reddanna P, Whelan J, Burgess JR, Eskew ML, Hildenbrandt G, Zarkower A *et al.* The role of vitamin E and selenium on arachidonic acid oxidation by way of the 5-lipoxygenase pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1989; 570: 136-145.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Hormônios locais, inflamação e reações imunológicas. In: *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p. 246-276.

Reimund JM, Allison AC, Muller CD, Dumont S, Kenney JS, Baumann R *et al.* Antioxidants inhibit the in vitro production of inflammatory cytokines in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 145-150.

Reuter BK, Asfaha S, Buret A, Sharkey KA, Wallace JL. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1996; 98: 2076-2085.

Rodriguez-Cabezas M, Galvez J, Lorente MD, Concha A, Camuesco D, Azzouz S *et al.* Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. *J Nutr* 2002; 132(11): 3263-3271.

Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *W J Surg* 2004; 22: 382-389.

Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seeger D *et al.* TNF-alpha and IFN-gama regulate the expression of the nod2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cell. *Gastroenterology* 2003; 124(4): 1001-1009.

Roth MP, Petersen GM, McElree C, Feldman E, Rotter JI. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989; 97(4): 900-904.

Rubin DT, Hanauer SB. Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12(8): 855-862.

Safayhi H, Sailer ER. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Plant Med* 1997; 63: 487-493.

Sandborn WJ, Feagan BG. The efficacy of azathioprine and 6-mercaptopurine for the prevention of postoperative recurrence in patients with Crohn's disease remains uncertain. *Gastroenterology* 2004; 127(3): 723-729.

Sansonetti PJ. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 953-964.

Sartor RB. Clinical applications of advances in the genetics of IBD. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; 3(1): S9-S17.

Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 1994; 106: 533-539.

Savage DC. Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. *Annu Rev Nutr* 1986; 6: 155-178.

Schmassmann A. Mechanisms of ulcer healing and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998; 104: 43S-51S, discussion 79S-80S.

Seibold F. Does conservative therapy of chronic inflammatory bowel diseases still play a role. *Swiss Surgery* 2003; 9(3): 127-130.

Segain JP, de la Blétière DR, Boureille A, Leray V, Gervois N, Rosales C *et al.* Butyrate inhibits inflammatory responses through NF κ B inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000; 47: 397-403.

Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P *et al.* Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003; 52: 237-242.

Sivakumar PV, Westrich GM, Kanaly S, Garka K, Born TL, Deny JM *et al.* Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage. *Gut* 2002; 50: 812-820.

Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(5): 372-377.

Souza Brito. Manual de ensaios toxicológicos in vivo. Campinas: Editora Unicamp 1994.

Souza MHLP, Troncon LEA, Rodrigues CM, Viana CFG, Onofre PHC, Monteiro RA *et al.* Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retoretocolite ulcerativa inespecífica idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudeste do Brasil. *Arq Gastroenterol* 2002; 39(2): 98-105.

Spiller GA. Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition: Dietary fiber values for common foods. Flórida: CRC Press; 1993. p. 567-571.

Srivastava ED, Russell MA, Feyerabend C, Rhodes J. Effect of ulcerative colitis and smoking on rectal blood flow. *Gut* 1990; 31(9): 1021-1024.

Steer T, Carpenter H, Tuohy K, Gibson GR. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutr Res Rev* 2000; 13: 229-254.

Steidler L, Hans W, Schotte L, Neirynck S, Obermeier F, Falk W *et al.* Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting inteleukin-10. *Science* 2000; 289: 352-354.

Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA *et al.* Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004; 36(5): 476-480.

Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Inv* 2007; 117: 514-521.

Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M *et al.* Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 44-54.

Tanaka A, Hase S, Miyazawa T, Takeuchi K. Up-regulation of cyclooxygenase-2 by inhibition of cyclooxygenase-1: a key to nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced intestinal damage. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 754-761.

Te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12(10): 995-999.

Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 2000; 16(7/8): 716-718.

Thomas GA, Rhodes J, Green JT. Inflammatory bowel disease and smoking – a review. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(2): 144-149.

Tilg H, van Montfrans C, van den Ende A, Kaser A, van Deventer SJ, Schreiber S *et al.* Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma. *Gut* 2002; 50: 191-195.

Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 2001; 81: 1031-1064.

Van Assche G, Vermeire S, Rutgeerts P. Medical treatment of inflammatory bowel diseases. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21(4): 443-447.

Van Den Bogaerde J, Cahill J, Emmanuel AV, Vaizey CJ, Talbot IC, Knight SC *et al.* Gut mucosal response to food antigens in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002, 16(11): 1903-1915.

Velázquez M, Davies C, Marett R, Slavin JL, Feirtag JM. Effect of oligosaccharides and fibre substitutes on short-chain fatty acid production by human faecal microflora. *Anaerobe* 2000; 6: 87-92.

Velázquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol* 1997; 427: 123-134.

Wallace JL, McKnight W, Reuter BK, Vergnolle N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology* 2000; 119: 706-714.

Welters CF, Heineman E, Thunnissen FBJM, van den Bogaard EJM, Soeters PB, Baeten CGMI. Effect of dietary inulin supplementation on inflammation of pouch mucosa in patients with an ileal pouch-anal anastomosis. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 621-627.

Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 2001; 1(1): 69-75.

Wolfe, MM, Lichtenstein DR, Singh G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 1999; 340: 1888-1899.

Wood JD, Peck OC, Tefend KS, Stonerook MJ, Caniano DA, Mutabagani KH *et al.* Evidence that colitis is initiated by environmental stress and sustained by fecal factors in the cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*). *Dg Dis Sci* 2000; 45: 385-393.

Yoshikawa T, Minamiyama Y, Ichikawa H, Takahashi S, Naito Y, Motoharu K. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indometacin in rats. *Gut* 1993; 3: 732-737.

Zambo I. Analytical standardization of peponen. *Mediflora* 1988; 89: 6.

Zheng CQ, Hu GZ, Zeng ZS, Lin LJ, Gu GG. Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. *World J Gastroenterol* 2003; 9(8): 1646-1656.