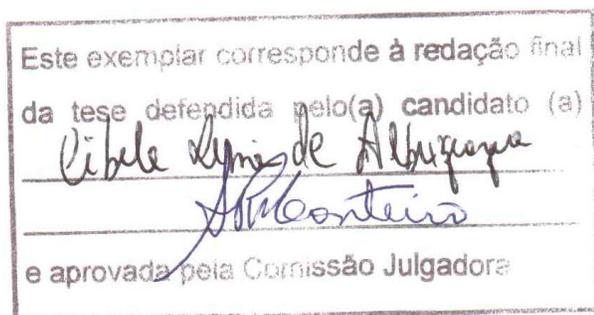


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Cibele Lima de Albuquerque

**“INVESTIGAÇÃO DE DIETAS RICAS EM FIBRAS E
COMPOSTOS FITOQUÍMICOS NA MODULAÇÃO DA
FLORA BACTERIANA E PREVENÇÃO/TRATAMENTO DE
DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS”**



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

Orientadora: Profa. Dra Alba Regina Monteiro Souza Brito

Co-orientadora: Elisângela Farias Silva

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

AL15i

Albuquerque, Cibele Lima de

Investigação de dietas ricas em fibras e compostos fitoquímicos na modulação da flora bacteriana e prevenção/tratamento de doenças inflamatórias intestinais / Cibele Lima de Albuquerque. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

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

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Couve. 2. Mamão. 3. Intestinos - Doenças inflamatórias. 4. Ácido trinitrobenzenosulfônico. 5. Prébióticos. I. Brito, Alba Regina Monteiro Souza. II. Silva, Elisângela Farias. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Título em inglês: Investigation of diets with high contents of fiber and phytochemical compounds in modulating of bacterial flora and prevention/treatment of inflammation bowel diseases.

Palavras-chave em inglês: Kale; Papaya; Inflammatory bowel diseases; Trinitrobenzenesulfonic acid; Prebiotics.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Alba Regina Monteiro Souza Brito, Clélia Akiko Hiruma Lima, Cláudio Saddy Rodrigues Coy, Cláudio Zoppi, Maíra Cola.

Data da defesa: 22/01/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 22 de janeiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

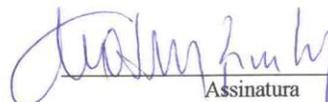
Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima


Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Saddy Rodrigues Coy


Assinatura

Prof. Dr. Claudio Zoppi


Assinatura

Profa. Dra Maíra Cola


Assinatura

Profa. Dra. Patricia da Silva Melo

Assinatura

Profa. Dra. Liana Melo

Assinatura

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior

Assinatura



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **823-2**, sobre "**INVESTIGAÇÃO DE DIETAS RICAS EM FIBRAS E SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES NA PROTEÇÃO CONTRA INFLAMAÇÃO DO INTESTINO**" sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito / Cibele Lima de Albuquerque** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 06 de julho de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **823-2**, entitled "**EFFECT OF FIBER RICH DIET AND ANTIOXIDANT SUBSTANCE IN THE PROTECTION AGAINST BOWEL INFLAMMATION**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on July 6, 2005.

Campinas, 06 de Julho de 2005.

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

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

Dedico esta tese

*À Deus,
fonte e autor de toda ciência, que me permitiu
a realização deste trabalho.*

*Aos meus pais,
Edson (in memoriam) e Teresa,
pelo amor incondicional, confiança
e por nunca terem medido esforços
em favor da minha educação.*

*Aos meus irmãos,
Éder, Fábio e Elson,
que são, e sempre serão, meus melhores amigos.*

*Ao Celso,
um anjo amado que Deus colocou em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer à Profa. Dra. Alba pela orientação, apoio e solicitude com que sempre me atendeu;

Ao Anderson, pela amizade, ensinamentos e por fazer os meus dias de trabalho mais divertidos;

Às minhas grandes amigas do laboratório Aninha, Patrícia, Érika e Fabi pelos conselhos, boas conversas e agradáveis momentos;

À todos os meus companheiros de laboratório Silene, Chris, Ricardo, Cinza, Vinícius, Felipe, Elisângela, Victor, Deborah e Maíra pelo apoio demonstrado a todo momento;

Ao Prof. Dr. Lauro Kubota e Jailson pelo imprescindível apoio na primeira etapa deste trabalho;

Aos vendedores Lazinho e Tadeu e aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Unicamp por estarem sempre solícitos.

Ao Prof. Dr. Julio Galvez e Prof. Dr. Zarzuelo Zurita por me acolherem em seu laboratório e pela excepcional orientação;

A todos do laboratório de Farmacologia da Universidade de Granada, em especial à Desi, Mónica, Rocío, Isabel, Elvira, Nati, Mercedes e Marga pelos ensinamentos, amizade e por fazer sentir-me em casa;

Ao Prof. Dr. Ross Butler e Profa. Dra. Andrea por me orientarem em terras tão distantes;

Aos docentes que compuseram a banca do exame de qualificação, Prof. Dr. Claudio Weneck, Prof. Dr. Claudio Zoppi, Prof. Dr. Mário Maróstica e Profa. Dra. Ana Beatriz Almeida, pelas correções e observações referentes à tese;

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

À FAPESP e à CAPES, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste doutorado, no Brasil e no exterior.

Sábio é aquele que conhece os limites da própria ignorância.

Sócrates

RESUMO

Apesar da amplitude de possibilidades terapêuticas, ainda não existe um tratamento ideal para as doenças inflamatórias intestinais (DII), com perfil adequado de eficácia e segurança. Por essa razão, é de grande interesse estudar agentes com pouco efeito colateral, como um nutracêutico, no tratamento/prevenção dessas enfermidades. Neste contexto, surgiu o interesse em se estudar couve e mamão, vegetais com alto teor de carotenóides e fibras dietéticas, além de ter baixo custo e ser de uso comum na dieta de brasileiros. Sabe-se que substâncias antioxidantes e os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente o ácido butírico, proveniente da fermentação de fibras dietéticas, podem estar envolvidas na prevenção e tratamento de doenças intestinais. O ácido butírico é substrato para a reparação do tecido inflamado e inibe fatores pró-inflamatórios; portanto, quantificar a produção desse ácido é imprescindível, dado que quanto maior for sua produção, maior será a eficiência da dieta para a recuperação do tecido. Para tanto, foi realizada uma análise *in vitro* que demonstrou que a dose de 0,3 g couve acrescido de 0,2 g de mamão era a dieta que produzia maiores quantidades de butirato, o dado foi obtido através da leitura por cromatografia de íons, metodologia essa padronizada e validada pelo grupo de pesquisa. Após a escolha da proporção dos vegetais, seguiu-se o estudo *in vivo*. A princípio, verificou-se a ação da mistura na modulação da microbiota intestinal em ratos saudáveis, assim como em ratos com colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), pelo aumento do número de colônias de bactérias benéficas e redução do número de colônias de bactérias potencialmente patogênicas. Estudos têm demonstrado que o efeito prebiótico é benéfico na prevenção ou melhora dos diferentes sinais e sintomas envolvidos nas DII. Isso foi confirmado no presente estudo, uma vez que o tratamento dos ratos colíticos com a mistura que apresentou efeito prebiótico foi capaz de exercer efeito antiinflamatório intestinal, já que os animais tratados apresentaram diminuição no escore da lesão e dos níveis de alguns mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- α , IL-1 β , atividade da MPO e expressão de iNOS. Os mesmos resultados não foram observados quando os animais foram tratados com os vegetais isolados. Conclui-se, que a mistura de couve e mamão mostrou habilidade em modular a microbiota intestinal, tanto em ratos saudáveis quanto em ratos com colite experimental induzida por TNBS; que esse efeito prebiótico veio acompanhado de recuperação da inflamação intestinal em ratos colíticos; e que houve

uma ação sinérgica dos componentes ativos da couve e do mamão, quando esses estão associados.

ABSTRACT

Despite the range of therapeutic possibilities, there is still no ideal treatment for inflammatory bowel disease (IBD), with the right profile of efficacy and safety. For this reason, it is of great interest to study agents with little side effect, as a nutraceutical, on the treatment/prevention of such diseases. In this context, emerged the interest in studying kale and papaya plants with high content of carotenoids and dietary fiber, in addition to low cost and their common use in the diet of Brazilians. It is known that antioxidants and short chain fatty acids (SCFA), especially butyric acid, obtained from the fermentation of dietary fiber, may be involved in the prevention and treatment of intestinal diseases. The butyric acid is a substrate for the repair of inflamed tissue and inhibits pro-inflammatory factors; for that reason, to quantify the production of this acid is mandatory, given that the higher the production, the greater the efficiency of the diet for tissue recovery. Therefore, an *in vitro* analysis showed that the dose of 0.3 g of kale with 0.2 g of papaya was the one that produced the greatest amount of butyrate. The data was obtained by ion chromatography readings, methodology standardized and validated by the research group. After choosing the proportion of the vegetables, the next step was an *in vivo* study. At first, the action of the mixture in the modulation of bacterial flora was checked in healthy rats, as well as in rats with colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), by the increase on the number of colonies of beneficial bacteria and the reduction on the number of potentially pathogenic bacteria colonies. Studies have demonstrated that the prebiotic effect is beneficial in the prevention or improvement of the different signs and symptoms involved in IBD. This was confirmed by this study, since the treatment of the affected rats with the mixture that showed prebiotic effect was able to exert intestinal anti-inflammatory effect, since the treated animals showed lower scores of the lesion and reduced some pro-inflammatory mediators such as TNF- α , IL-1 β , MPO activity and iNOS expression. The same results were not observed when the animals were treated with the isolated plants. It can be concluded that the mixture of kale and papaya showed ability to modulate the intestinal flora in both healthy rats and in rats with experimental colitis induced by TNBS, whereas this prebiotic effect was accompanied by recovery of intestinal inflammation in rats with colitis and that there was a synergistic action of the active components of kale and papaya, when these are combined.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1. Doenças Inflamatórias Intestinais.....	1
1.1. Aspectos gerais	1
1.2. Epidemiologia das DII.....	2
1.3. Etiologia das DII.....	4
1.3.1. Fatores Genéticos Relacionados as DII.....	4
1.3.2. Fatores Ambientais Relacionados as DII	5
1.4. Fisiopatologia das DII.....	7
1.5. Terapêutica no Tratamento das DII	8
1.5.1. Terapia Convencional.....	9
1.5.2. Terapias Não Convencional.....	10
1.5.3. Antioxidantes.....	12
2. Microbiota Intestinal	13
2.1. Funções da Microbiota Intestinal no Organismo Hospedeiro.....	13
2.2. Microbiota Intestinal e DII	16
2.3. Manipulação da Microbiota Intestinal	17
3. Espécies Estudadas	18
Mamão	18
Couve-comum.....	20
OBJETIVOS.....	22
Geral.....	22
Específicos	22
MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
1. Obtenção e Preparação dos Vegetais Estudados	23
2. Animais de Experimentação	23
3. Teste <i>In Vitro</i>	24
3.1. Quantificação de AGCC por Cromatografia de Íons.....	25
4. Ensaio <i>In Vivo</i>	26
4.1. Avaliação da Atividade Prebiótica das Dietas	26
4.2. Indução de Colite Ulcerativa por TNBS e Contagem de Lesão do Cólon.....	27

4.2.1.	Histologia	30
4.2.2.	Determinação da Atividade da Mieloperoxidase Colônica	31
4.2.3.	Determinação do Conteúdo Colônico de Glutathione Total	31
4.2.4.	Determinação dos Níveis Colônicos de TNF α e IL-1 β	32
4.2.5.	Determinação da Expressão de iNOS e COX-2	32
4.2.6.	Determinação do Conteúdo de Proteínas: Método do Ácido Bicinconínico (BCA).....	34
4.2.7.	Estudos Microbiológicos	34
4.2.8.	Quantificação de AGCC do Conteúdo Intestinal por Cromatografia Gasosa	35
5.	Análise Estatística	36
RESULTADOS		37
1.	Análise <i>In Vitro</i> de AGCC Produzidos pela Incubação de Fezes de Ratos com Vegetais Secos e Quantificados por Cromatografia de Íons.....	37
	Tempo (h)	39
2.	Avaliação da Atividade Prebiótica do Tratamento de Ratos Saudáveis com os Vegetais Secos	41
3.	Avaliação da Atividade Antiinflamatória dos Tratamentos com Vegetais Secos sobre Ratos com Colite Induzida por TNBS	48
	Grupos	56
	Lesão microscópica	56
3.1.	Estudo Dos Parâmetros Bioquímicos	57
3.2.	Manipulação da Microbiota Intestinal em Ratos com Colite Induzida por TNBS	63
DISCUSSÃO		68
1.	Produção de AGCC Proveniente da Fermentação dos Vegetais Secos.....	68
2.	Modulação da Microbiota Intestinal em Ratos Normais e Ratos com Colite Induzida por TNBS pelo Tratamento com Vegetais Secos	71
3.	Inibição da Inflamação Intestinal	74
CONCLUSÃO		80
PERSPECTIVAS		81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		82

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-ASA: Ácido 5-aminosalicílico
- AGCC: Ácido graxo de cadeia curta
- AM: Anticorpo monoclonal
- BCA: Ácido Bicinconínico
- CD: Grupamento de diferenciação
- COX: Ciclooxigenase
- CRF: Fator liberador de corticotrofina
- DAINE: Droga antiinflamatória não esteroidal
- DC: Doença de Crohn
- DII: Doença inflamatória intestinal
- DTNB : Ácido 5,5'-ditiobisnitrobenzóico
- EDTA : Ácido etilendiaminotetraacético
- ELAM: molécula de adesão leucócito-endotélio
- ERN: Espécies reativas de nitrogênio
- ERO: Espécies reativas de oxigênio
- GSH: Glutathiona reduzida
- GSSG: Glutathiona oxidada
- GSSGrd: Glutathiona redutase
- HTAB: Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio
- ICAM: molécula de adesão intercelular
- IFN: Interferon Gama
- Ig: Imunoglobulina
- IL: Interleucina
- iNOS : Óxido nítrico sintase induzida
- MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno
- MDP: Muramil dipeptídeo
- MPO: Mieloperoxidase
- MRS: Man, Rogosa e Sharpe
- NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

- NF- κ B: Fator nuclear- κ B
- NK: Natural killer
- NOD: Domínio de oligomerização de nucleotídeos
- PBS: Tampão de fosfato de sódio
- PDE: Fosfodiesterase tiazolo
- RCUI: Retocolite ulcerativa inespecífica
- SDS: Dodecil sulfato sódico
- SP: Substância P
- TBS-T: Tampão Tris salina contendo Tween[®]-20 a 0,1%
- TCA: Ácido tricloroacético
- TGF: Fator de crescimentos transformante
- TGI: Trato gastrintestinal
- Th: T helper
- TLR: Receptor do tipo toll
- TNBS: Ácido trinitrobenzenosulfônico
- TNF: Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabelas

- Tabela 1.** Características diferenciais entre RCUI e DC (Cho & Abraham, 2007). **2**
- Tabela 2.** Escala de valores do índice de lesões macroscópicas em modelos de colite experimental por TNBS em ratos Wistar (Bell *et al.*, 1995). **29**
- Tabela 3:** Escala de quantificação da lesão histológica em modelo de colite experimental induzida por TNBS. Escala de pontuação: 0, nenhuma; 1, ligeira; 2, leve; 3, moderado; 4, severo. Pontuação máxima: 59 pontos. **30**
- Tabela 4.** Quantificação de AGCC (mg.g^{-1}) em suspensão fecal de ratos acrescida de diferentes proporções de couve e mamão, nos tempos 0, 8, 12 e 24 horas de incubação (n=6). **39**
- Tabela 5.** Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) sobre a porcentagem de aderência, comprimento da lesão do cólon e escore macroscópico da lesão induzida por TNBS em ratos (n=6). Dados expressos em média \pm erro padrão, com exceção aos dados de aderência que estão expressos em porcentagem. *P < 0,05 versus grupo controle TNBS. **53**
- Tabela 6.** Efeito dos tratamentos com vegetais secos sobre o escore microscópico da lesão do cólon de ratos com colite induzida por TNBS (n=6). Dados expressos em mediana (range, 0-59). A escala do escore seguiu o critério de Stucchi (2000), porém com algumas modificações. *P < 0,05 versus grupo controle TNBS. **56**
- Tabela 7.** Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) sobre a produção de AGCC (mg.g^{-1}) no conteúdo luminal do cólon e cego de ratos Wistar com colite ulcerativa induzida por TNBS (n=6). Todos os grupos diferem significativamente do grupo controle (P < 0,01, dados não mostrados). ##P < 0,01 e ###P < 0,001 versus grupo controle. **67**

Figuras

- Figura 1.** Fatores relacionados à etiologia das DII. Adaptado de Danese *et al.*, 2004. 4
- Figura 2.** Foto ilustrativa da variedade de mamão usada nesse estudo. 19
- Figura 3.** Foto ilustrativa da variedade de couve usada nesse estudo. 21
- Figura 4.** Fluxograma do teste *in vitro*. 25
- Figura 5.** Esquema do experimento da avaliação da atividade prebiótica *in vivo*. 27
- Figura 6.** Esquema do experimento de indução da inflamação intestinal por TNBS. 28
- Figura 7.** Cromatograma dos padrões dos AGCC (acetato, propionato e butirato) usados na quantificação dos mesmos em amostras provenientes da fermentação de couve e mamão em diferentes proporções, pelas bactérias cólicas de ratos Wistar(n=6). 37
- Figura 8.** Cromatograma da fermentação de couve (0,5 g.kg⁻¹) pelas bactérias cólicas de ratos Wistar no tempo de 24 horas (n=6). 38
- Figura 9.** Quantificação de butirato (mg.g⁻¹) proveniente da fermentação de couve e mamão, em diferentes proporções, pelas bactérias cólicas de ratos Wistar, no tempo de 12 horas (n=6). 40
- Figura 10.** Quantificação de butirato (mg.g⁻¹) proveniente da fermentação de couve e mamão, em diferentes proporções, pelas bactérias cólicas de ratos Wistar, no tempo de 24 horas (n=6). 41
- Figura 11.** Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na porcentagem de água encontrada nas fezes coletadas durante o tratamento (n=6). *P < 0,05 e **P < 0,01 versus grupo não tratado. 42
- Figura 12.** Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na contagem de colônias de enterobactérias do conteúdo fecal do cólon de ratos saudáveis (n=6). Dados expressos em CFU log 10. *P < 0,05 e ***P < 0,001 versus grupo não tratado. 43
- 13.** Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na contagem de colônias de bifidobactérias do conteúdo fecal do cólon de ratos saudáveis(n=6). Dados expressos em CFU log 10. *P < 0,05 e **P < 0,01 versus grupo não tratado. 44

Figura 14. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na contagem de colônias de enterobactérias do conteúdo fecal do ceco de ratos saudáveis (n=6). Dados expressos em CFU log 10. **P < 0,01 versus grupo não tratado. **45**

Figura 15. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de animal) na contagem de colônias de lactobacilos do conteúdo fecal do ceco de ratos saudáveis (n=6). Dados expressos em CFU log 10. *P < 0,05 versus grupo não tratado. **46**

Figura 16. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na contagem de colônias de bifidobactéria do conteúdo fecal do ceco de ratos saudáveis (n=6). Dados expressos em CFU log 10. *P < 0,05 versus grupo não tratado. **47**

Figura 17. Análise ponderal (porcentagem em relação ao dia anterior ao início do tratamento) de ratos Wistar não colícticos e colícticos, tratados e não tratados com os vegetais (n=6). **48**

Figura 18. Análise ponderal (porcentagem em relação ao dia anterior ao início do tratamento) de ratos Wistar não colícticos e colícticos, tratados e não tratados com os vegetais no 4º dia após a indução de colite experimental por TNBS (n=6). ^{##}P < 0,01 e ^{###}P < 0,001 versus grupo controle; *P < 0,05 versus grupo controle TNBS. **49**

Figura 19. Análise ponderal (porcentagem em relação ao dia anterior ao início do tratamento) de ratos Wistar não colícticos e colícticos, tratados e não tratados com os vegetais no 21º dia após a indução de colite experimental por TNBS (n=6). [#]P < 0,05 e ^{##}P < 0,01 versus grupo controle. **50**

Figura 20. Consumo de ração (g) pelos ratos Wistar não colícticas e colícticas, tratadas e não tratadas com os vegetais, durante os 21 dias de estudo (n=6). **51**

Figura 21. Fotos do cólon de ratos Wistar não-colíctico ou colícticos, tratados e não tratados com vegetais mostrando lesões macroscópicas causada pela inflamação induzida pelo TNBS e a ação dos vegetais sobre o processo inflamatório. (A) Grupo Controle mostrando aspecto de cólon normal; (B) grupo controle com colite induzida por TNBS mostrando grande área com severa ulceração, inflamação, processo de necrose e engrossamento da parede intestinal; (C e D) grupo com colite induzida por TNBS e

tratados com couve (C) e mamão (D) mostrando também grande área com severa ulceração, inflamação, processo de necrose e engrossamento da parede intestinal; (E) grupo com colite induzida por TNBS e tratados com a mistura de couve e mamão mostrando recuperação da inflamação com menor área de ulceração/inflamação/necrose e menor engrossamento da parede intestinal. **52**

Figura 22. Seções histológicas da mucosa do cólon de ratos Wistar não-colíticos e colíticos, coradas com hematoxilina-eosina, na ausência ou presença do tratamento com a mistura de couve e mamão. (A) Grupo Controle mostrando histologia normal do cólon. (B) Grupo TNBS mostrando severa ulceração e inflamação envolvendo todas as camadas da parede intestinal. (C) Grupo colítico tratado com a mistura de couve e mamão com recuperação do processo inflamatório. **54**

Figura 23. Efeito do tratamento com couve, mamão e com mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) sobre os níveis totais de glutathione no cólon de ratos com colite induzida por TNBS (n=6). $^{###}P < 0,001$ versus grupo controle. **57**

Figura 24. Efeito do tratamento com couve, mamão e com mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) sobre a atividade da MPO no cólon de ratos com colite induzida por TNBS (n=6). $^{##}P < 0,01$ e $^{###}P < 0,001$ versus grupo controle; $^{*}P < 0,05$ e $^{**}P < 0,01$ versus grupo controle TNBS. **58**

Figura 25. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) sobre síntese de TNF α no tecido do cólon de ratos com colite induzida por TNBS (n=6). $^{##}P < 0,01$ versus grupo controle; e $^{***}P < 0,01$ versus grupo controle TNBS. **59**

Figura 26. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) sobre síntese de IL-1 β no tecido do cólon de ratos com colite induzida por TNBS (n=6). $^{###}P < 0,01$ versus grupo controle; e $^{**}P < 0,001$ versus grupo controle TNBS. **60**

Figura 27. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) sobre a expressão de iNOS e COX-2 no tecido do cólon de ratos com colite induzida por TNBS, mediante Western blot (n=6). $^{##}P < 0,01$ e $^{###}P < 0,001$ versus grupo controle; e $^{*}P < 0,05$ e $^{***}P < 0,001$ versus grupo controle TNBS. **61**

Figura 28. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na contagem de colônias de lactobacilos do conteúdo fecal do cólon de ratos com colite induzida por TNBS (n=6). Dados expressos em CFU log 10. ^{##}P < 0,01 versus grupo controle; e *P < 0,05 versus grupo controle TNBS. **63**

Figura 29. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na contagem de colônias de bactérias aeróbias do conteúdo fecal do cólon de ratos com colite induzida por TNBS (n=6). Dados expressos em CFU log 10. [#]P < 0,05 versus grupo controle; e *P < 0,05 e ^{**}P < 0,01 versus grupo controle TNBS. **64**

Figura 30. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na contagem de colônias de enterobactérias do conteúdo fecal do cólon de ratos com colite induzida por TNBS (n=6). Dados expressos em CFU log 10. [#]P < 0,05 e ^{###}P < 0,001 versus grupo controle; e *P < 0,05 versus grupo controle TNBS. **65**

Figura 31. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na relação do número de colônias de bactérias benéficas (lactobacilos e bifidobactérias)/bactérias potencialmente patogênicas (aeróbicas e enterobactérias) (n=6). [#]P < 0,05 versus grupo controle; e *P < 0,05 versus grupo controle TNBS. **66**

INTRODUÇÃO

1. Doenças Inflamatórias Intestinais

1.1. Aspectos gerais

A retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) e a doença de Crohn (DC) são doenças inflamatórias intestinais (DII) crônicas e recorrentes do trato gastrointestinal (TGI), com período de exacerbação dos sintomas seguidos de intervalos, mais ou menos prolongados, de remissão dos mesmos (Baumgart e Carding, 2007).

A RCUI é uma doença inflamatória, restrita ao cólon, não-transmural, pois afeta somente as camadas superficiais do cólon, como a mucosa e a submucosa; caracteriza-se por infiltrações de neutrófilos e eosinófilos, com formação freqüente de abscessos de criptas (Obrador e Riera, 1994; Stenson e McDermott, 1991), onde ocorre acúmulo de neutrófilos adjacentes às criptas, necrose do epitélio e presença de edema e hemorragia. A mucosa apresenta um aspecto granuloso, consequência da irregularidade da inflamação, e pólipos inflamatórios aparecem com freqüência (Geller, 1994). Também é freqüente a presença de diarreia sanguinolenta, acompanhada ou não de sintomas sistêmicos como febre, mal-estar geral, perda de peso, entre outros (Sutherland, 1994). Dependendo do envolvimento na extensão anatômica, pacientes podem ser classificados como tendo proctite (limitado ao reto) ou pancolite (todo o intestino grosso) (Baumgart e Sandborn, 2007).

Já a DC é uma doença inflamatória transmural, ou seja, se propaga por toda a parede intestinal e pode levar à perfuração da mucosa gastrintestinal, estenose e fístulas com os órgãos adjacentes (Levine, 1994; Gasche, 2000). Esta enfermidade pode afetar qualquer segmento do trato gastrointestinal (TGI), desde a boca até o ânus, porém é mais freqüente na região ileocecal (Gassull e Cabre, 1994). Manifestações típicas incluem envolvimento descontínuo e simultâneo de distintas zonas do TGI, separadas entre si por segmentos intactos (Baumgart e Sandborn, 2007).

Um resumo das características da RCUI e DC está apresentado na tabela 1.

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

Doença de Crohn	Colite Ulcerativa
Desde a boca até o ânus	Reto +/- cólon
Distribuição descontínua	Distribuição contínua
Transmural (afeta todas as camadas do intestino)	Afeta apenas a mucosa
<i>Anatomia patológica:</i>	<i>Anatomia patológica:</i>
Granulomas	Abscessos de criptas
Agregados linfóides	Depleção da mucina
Fibrose	Distorção glandular

Em ambas as enfermidades podem aparecer complicações auto-imunes que afetam órgãos extra-intestinais como articulações, olho e pele. Este quadro é comum em até 40% dos casos (Lichtman e Balfour Sartor, 1994). Entre as complicações auto-imunes destacam-se episódios tromboembólicos, anemias e osteoporose (Gasche, 2000; Szulc e Meunier, 2001). Além disso, pacientes com DII têm aumento, de modo cumulativo, no risco de desenvolver câncer, sendo que a duração e extensão da enfermidade, complicações extra-intestinais e aparição da enfermidade em tenra idade são fatores que aumentam esta predisposição. O risco de câncer é maior em pacientes com RCUI do que em pacientes com DC (Pohl *et al.*, 2000).

1.2. Epidemiologia das DII

Em geral, as taxas mais altas de incidência e prevalência, tanto para DC, quanto para RCUI, estão descritas no norte da Europa, Reino Unido e América do Norte, que são regiões geográficas associadas historicamente às DII. 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 em um hospital universitário do sudeste do Brasil. A conclusão é de que houve 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 ocorrência de pancolite associaram-se a maior gravidade da RCUI, enquanto que a idade inferior a 50 anos e o tabagismo associaram-se a taxas mais altas de complicações da DC.

Frequência e 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 em mulheres, ainda que nas áreas de baixa incidência seja mais freqüente em homens. Este predomínio, especialmente em mulheres no final da adolescência e início da idade adulta, sugere que os fatores hormonais podem desempenhar importante papel na doença. Por outro lado, se existe algum tipo de influência do gênero na RCUI, parece afetar mais o homem (Loftus *et al.*, 2000).

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

Levando em conta que se devem interpretar com muita cautela os dados epidemiológicos, parece claro que as DII são mais freqüentes em indivíduos da raça branca e são incomuns em indivíduos da raça negra, nos hispano-americanos e asiáticos. Entretanto, é previsível que a incidência se aproxime da raça branca, com a progressiva aquisição dos hábitos ocidentais por esses grupos. Muitos estudos mostram um risco maior de desenvolver DII na etnia judia; sendo que neles a RCUI é três vezes mais freqüente e a DC é seis vezes mais freqüente que na população não judia da mesma área (Roth *et al.*, 1989).

1.3. Etiologia das DII

Embora a etiologia das DII ainda não está claramente elucidada, sugere-se que seja devido a uma complexa relação entre fatores genéticos, ambientais, microbianos e imunes (Podolsky, 2002).

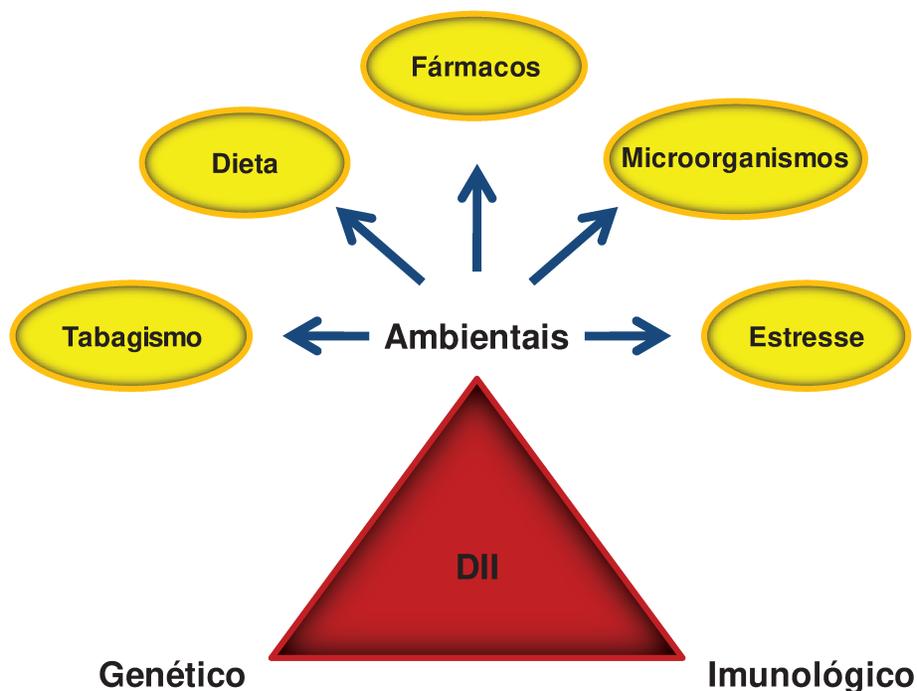


Figura 1. Fatores relacionados à etiologia das DII. Adaptado de Danese *et al.*, 2004.

1.3.1. Fatores Genéticos Relacionados as DII

Várias evidências sugerem que a predisposição genética é um fator importante na etiologia das DII. Uma história familiar positiva é encontrada em 5-20% dos pacientes com DII (Barrett *et al.*, 2008); além disso, parentes de primeiro grau de indivíduos com DII possuem de 25 a 50 vezes mais probabilidade de desenvolver DC e 10 a 20 vezes mais probabilidade de desenvolver RCUI quando comparados à população em geral (Zheng *et al.*, 2003).

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

Na imunidade inata, a associação da DC com polimorfismos em NOD2 sugere que alterações no reconhecimento e processamento intracelular de componentes bacterianos podem ter um papel importante na imunopatogênese desta doença. Polimorfismos no gene NOD2 foram os primeiros fatores de risco definitivos identificados para DC (Ogura *et al.*, 2001). NOD2 é um receptor de reconhecimento para moléculas que contenham uma estrutura específica denominada muramil dipeptídeo (MDP) (Inohara *et al.*, 2003). MDP está presente em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e ativação do NOD2 por ele resulta na ativação das vias de sinalização do fator nuclear kappa B (NFκ-B) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Kobayashi, 2005).

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

1.3.2. Fatores Ambientais Relacionados as DII

É evidente a influência dos fatores ambientais no desenvolvimento das DII devido ao 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 é mais evidente nos países em desenvolvimento que adotaram hábitos ocidentais. De acordo com a chamada “hipótese da higiene”, tem ocorrido mudança do estilo de vida “sujo” com alta exposição a microorganismos para um estilo de vida “limpo” com baixa exposição aos mesmos (Wills-Karp *et al.*, 2001). Mudanças ambientais, como melhoria na qualidade de vida e na alimentação, envolvendo alimentos e água mais seguros, melhora na higiene e na saúde, além do amplo uso de antibióticos, têm levado a uma diminuição progressiva das doenças infecciosas. Paralelamente a isso, tais mudanças

têm levado também ao aumento de doenças alérgicas e auto-imunes, incluindo a DC e a RCUI, como resultado da redução no desenvolvimento do sistema imunitário nos primeiros anos de vida (Bach, 2002).

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

O melhor exemplo de influência do ambiente nas DII é o hábito de fumar. 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); assim, constitui-se em importante fator de risco para a DC, aumentando a freqüência de recidivas e a necessidade de cirurgia. A interrupção do consumo de cigarros melhora os sintomas da doença (Rubin e Hanauer, 2000). Em contraste, pacientes com RCUI a descontinuação do tabagismo aumenta o risco de desenvolvimento da doença, apoiando um papel protetor do tabagismo na RCUI. Entretanto, um possível papel do tabagismo passivo, particularmente em crianças, como fator de risco ou de proteção para DC ou RCUI continua a ser questão controversa (Danese *et al.*, 2004).

Como as DII acometem o trato gastrointestinal existe uma possível relação entre componentes da dieta e a fisiopatologia da doença; mecanismos imunológicos são usados para alimentar a relação entre antígenos alimentares e o desenvolvimento de inflamação intestinal. Embora lógica, a hipótese está longe de ser provada e estudos que investigam as relações sugeridas são pouco convincentes, principalmente porque só fornecem evidências indiretas de uma possível causa e efeito entre fatores dietéticos específicos e as DII (Danese *et al.*, 2004). Estudos que visam encontrar uma relação causal entre a dieta e as DII enfrentam grandes dificuldades, como a definição da composição real de cada dieta. Entre os fatores dietéticos analisados, trabalhos mostraram o açúcar refinado como fator de risco para a DC, mas não para a RCUI (Sonnemberg, 1988), a gordura para RCUI, enquanto as frutas, vegetais e fibras parecem diminuir o risco das DII (Reif *et al.*, 1997).

Dentre os fatores ambientais, fármacos como contraceptivos orais e drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINE) são as duas classes de medicamentos mais estudadas como possíveis causas das DII. O uso concomitante de anticoncepcionais orais pode agravar o risco de eventos tromboembólicos nas DII ativas, mas dados definitivos ligados a estes fatores precisam ser explorados (Alstead, 1999). Por outro lado, se

contraceptivos podem afetar a evolução das DII através de seus mecanismos tromboembólicos, não se pode descartar outros efeitos imunomoduladores, como alguns relacionados com a supressão do NF- κ B (Evans *et al.*, 2001). A situação é menos ambígua em pacientes que utilizam DAINes, porque seu uso está claramente associado a um risco maior de DII. Pacientes com remissão clínica podem recair após administração de DAINes (Hanauer & Sandborn, 2002); não obstante, foi sugerido que os inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2) são seguros em pacientes com DII (Mahadevan *et al.*, 2002).

Estresse psicológico tem sido descrito como "um processo em que as exigências ambientais excedem a capacidade adaptativa de um organismo, resultando em alterações psicológicas e biológicas que podem aumentar o risco de uma doença" (Cohen *et al.*, 1997). Acredita-se que esse tipo de estresse desempenhe papel importante nos distúrbios gastrintestinais, especialmente nas DII. Modelos experimentais de colite e estudos de interação neuroimunológica sugerem que o estresse pode agravar o curso das DII (Collins, 2001). A duração do estresse pode também ser importante, já que o risco de exacerbação das condições clínicas como diarreia crônica, fezes sanguinolentas, dor abdominal, perda de peso, desnutrição e fraqueza, parece estar associada com um estado de estresse prolongado (Levenstein *et al.*, 2000). Esta relação apresenta semelhança com os "cotton-top tamarins", primatas que vivem enjaulados na América do Sul e desenvolvem colite espontânea quando mantidos presos em clima frio por longos períodos (Maunder *et al.*, 2000). Os mecanismos que explicam a exacerbação da doença pelo estresse são desconhecidos; contudo, provavelmente estão implicados numa complexa interação de fatores nervosos, endócrinos e imunes (Hart & Kamm, 2002).

1.4. Fisiopatologia das DII

O intestino, ao constituir uma barreira para o contato com o meio externo, é particularmente propenso à inflamação, em circunstâncias normais, e manifesta uma "inflamação fisiológica" representada por grande infiltração de leucócitos que se encontram normalmente na mucosa em resposta a antígenos microbianos da dieta (Fiocchi, 2003). Este processo inflamatório fisiológico ocorre de forma satisfatória quando é auto-limitado e

desaparece quando o agente indutor for eliminado graças a uma resposta imune apropriada; porém, quando esta resposta imune se prolonga, origina-se um estado inflamatório crônico. Tanto a DC quanto a RCUI são claros exemplos desta situação; acredita-se que estas enfermidades sejam o resultado de uma resposta inapropriada e sustentada do sistema imune da mucosa em resposta à microbiota intestinal normal em indivíduos geneticamente susceptíveis. A resposta é, provavelmente, facilitada por alterações na barreira epitelial do intestino e mediada, principalmente, por células T da mucosa, com perda de tolerância frente à microbiota intestinal (Bouma e Strober, 2003; Podolsky, 2002).

A imunoregulação no intestino é um processo complexo mediado por uma variedade de células imunes que estão, constantemente, fazendo frente à enorme quantidade de antígenos presentes no lúmen. Em condições fisiológicas existe uma resposta imune nula ou muito baixa frente a estes antígenos, processo denominado indução de tolerância oral, cuja alteração pode conduzir ao desenvolvimento de DII. O tipo de antígeno localmente presente e a reação imune frente a eles determinam o resultado da resposta adaptativa. Além das células imunes clássicas, outros tipos celulares participam da resposta inflamatória crônica das DII, como as células epiteliais, endoteliais e nervosas. Existe uma comunicação entre elas e, como resultado desta interação e de diferentes processos de sinalização intracelular, secreção de numerosos produtos, tais como anticorpos, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, eicosanóides, espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN), enzimas proteolíticas e neuropeptídeos, assim como a expressão em superfície de moléculas de adesão que facilitam a amplificação da interação celular e, conseqüentemente, a inflamação (Fiocchi, 1998). Todos os agentes envolvidos contribuem para o recrutamento de novas células imunes em direção ao foco inflamatório, tornando crônica a resposta inflamatória.

1.5. Terapêutica no Tratamento das DII

Diversos medicamentos são utilizados de forma limitada no tratamento das DII. Entre as substâncias mais estudadas, destacam-se derivados dos salicilatos (Seibold, 2003), corticosteróides (Katz, 2004), imunossuppressores (Sandborn e Feagan, 2004) e mais

recentemente, as terapias anti-TNF- α (Van Assche *et al.*, 2005). No entanto, essas drogas apresentam efeitos colaterais, têm o custo elevado, além de, isoladamente, não serem eficazes sobre todos os parâmetros da doença até agora estudados (Jafri & Pasricha, 2003).

O tratamento deve começar pelo diagnóstico preciso. Este depende do conjunto da história clínica, dos achados de exame físico, endoscópico, radiológico e histológico, assim como dos exames laboratoriais. O resultado desta investigação permite distinguir a DC da CU. 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 tratamento 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, pois é de alto custo e a torna inviável para a maioria dos enfermos (Griffiths *et al.*, 1995). Um grande número de drogas antiinflamatórias gerais ou seletivas tem sido empregado e, apesar de conseguirem remissão das crises, não cura a doença (Biondo-Simões *et al.*, 2003). O tratamento cirúrgico é reservado para as complicações da DC ou para quando sintomas graves persistem mesmo após tratamento intensivo com drogas antiinflamatórias ou imunossupressoras (Biondo-Simões *et al.*, 2003).

1.5.1. Terapia Convencional

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

Corticosteróides têm sido empregados inicialmente na remissão da doença. Eles parecem controlar a doença de uma maneira complexa, que pode incluir a modulação da fosfolipase A₂, IL-1, TNF- α (Bauditz *et al.*, 2002), molécula de aderência aos leucócitos

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

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

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

Outro imunossupressor usado na clínica médica é a ciclosporina, que pode ser efetiva no tratamento da RCUI severa em pacientes hospitalizados que necessitam de proctocolectomia; age, provavelmente, através do bloqueio da ativação dos linfócitos, inibindo a transcrição de IL-2 e do seu receptor nos linfócitos T auxiliares, além de inibir também a produção de fatores que ativam as células B e estimulam a produção de IFN- γ pelas células T auxiliares (McCormack *et al.*, 2002).

1.5.2. Terapias Não Convencional

Novas abordagens terapêuticas tem emergido nos últimos anos como resultado do avanço na compreensão da patogênese das DII. Estas novas terapias, dirigidas aos mecanismos da doença, têm a finalidade de tornar mais eficazes e mais seguros os tratamentos para as DII (Nakamura *et al.*, 2008). Existem diversos agentes anti-TNF desenvolvidos, mas apenas três têm sido eficazes em DC: infliximabe, adalimumabe e certolizumabe (Gomollón & López, 2008). Suas estruturas moleculares são diferentes: Infliximabe e adalimumabe são anticorpos monoclonais que diferem porque o primeiro é

quimérico (75% camundongo e 25% humana) e o segundo somente humano; enquanto, Certolizumabe é um fragmento Fab específico, anti-TNF, combinado com duas moléculas de polietilenoglicol. Todos eles compartilham um mecanismo de ação geral que consiste em ligar-se ao TNF, solúvel e encontrado na membrana plasmática, inibindo sua ação pró-inflamatória direta e mediada pela indução de outras citocinas (principalmente IL-6) (Gomollón & López, 2008). Além deste efeito em comum, estes agentes exercem outras funções potencialmente anti-inflamatórias. Nesse sentido, infliximabe e adalimumabe são capazes de induzir apoptose em diferentes tipos celulares. O uso do Infliximabe em pacientes com DC já foi aprovado por órgãos competentes (Nakamura *et al.*, 2008) e para a RCUI (Rutgeerts *et al.*, 2005). Para reduzir possíveis eventos alérgicos em humanos, o Infliximab foi submetido à tecnologia recombinante, tornando-se menos imunogênico (Drewe e Powell, 2002).

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

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

1.5.3. Antioxidantes

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

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

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

Na colite experimental, há processos inflamatórios típicos geradores de radicais livres; por outro lado, a administração de enzimas antioxidantes reduz a severidade da inflamação cólica (Segui *et al.*, 2004).

2. Microbiota Intestinal

Devido às secreções de ácido gástrico, bile e secreções pancreáticas há uma baixa densidade de microbiota no intestino delgado; por outro lado, há uma densa colonização das mesmas no intestino grosso, sendo que a maior parte do conteúdo fecal do intestino grosso (40 a 55 %) é formada por bactérias e seus produtos (Damaskos e Kolios 2008). Porém, tem sido observado que, aproximadamente 50% dessas bactérias, rastreadas por métodos moleculares, não crescem em meio de cultura usual de laboratórios de microbiologia (Tannock 2007)

O trato gastrointestinal de um feto é estéril e o processo de colonização começa imediatamente após o nascimento sendo concluído dentro de poucos dias (Guarner e Malagelada 2003a); essa colonização acontece pelo contato entre o recém nascido e o meio em que ele vive. A população bacteriana intestinal varia de acordo com tipo de parto (normal *versus* cesariana) (Hallstrom *et al.*, 2004), higiene, uso de medicamento, tipo de alimento (leite materno *versus* outras), entre outros aspectos (Danese *et al.*, 2004; Penders *et al.*, 2005).

2.1. Funções da Microbiota Intestinal no Organismo Hospedeiro

O uso de animais *germ free* tem contribuído com informações importantes sobre relação da microbiota intestinal com a fisiologia do hospedeiro. Evidências obtidas destes estudos mostram que a microbiota intestinal tem importante função nutritiva, trófica, protetora e imunomoduladora no organismo hospedeiro (Guarner e Malagelada 2003a)

As bactérias da microbiota intestinal sintetizam várias vitaminas do grupo B e K; esta última absorvida no ceco e no cólon proximal, favorecendo a recuperação e a absorção de íons como cálcio, ferro e magnésio (Guarner e Malagelada, 2003b). A microbiota intestinal do cólon também tem a função de digerir carboidratos e proteínas que escaparam do processo digestivo do intestino delgado. A diversidade gênica na comunidade bacteriana fornece uma variedade de enzimas e vias bioquímicas distintas dos recursos constitutivos do próprio hospedeiro; com isso ocorre a recuperação da energia metabólica e promoção do

crescimento e da proliferação das próprias bactérias (Guarner e Malagelada 2003b). Os carboidratos são fermentados por bactérias sacarolíticas, inicialmente no cólon proximal produzindo significativas quantidades de AGCC, além de H₂ e CO₂. A produção de AGCC é alta no ceco e cólon proximal (70 a 140 mM) devido a maior oferta de substrato, e essa produção cai ao longo do intestino chegando a 20 mM (Topping e Clifton, 2001 e Guarner e Malagelada 2003b). Os principais AGCC gerados são ácido acético, propiônico e butírico (85 a 95% do total) em uma proporção molar de 60:25:20 quase constante, respectivamente (Titgemeyer *et al.*, 1991). Estes ácidos são gerados no metabolismo do piruvato, produzido pela oxidação da glicose através da via glicolítica. Existem duas vias para a metabolização do piruvato. Em uma delas forma propionato através do succinato; na outra o piruvato é convertido em acetil-CoA que posteriormente é hidrolizado para formar acetato ou é reduzido para formar butirato. A fermentação cólica da fibra produz energia e seu valor oscila entre 1 e 2,5 cal/g, dependendo do seu grau de fermentabilidade (Peris *et al.*, 2002).

Tendo a fermentação como principal função metabólica da microbiota intestinal, os AGCC provenientes dessa fermentação contribuem com 80% do consumo energético dos colonócitos e com 5 -10% do total do consumo energético do indivíduo hospedeiro. Diversos estudos têm demonstrado que os colonócitos utilizam os AGCC na seguinte ordem: butirato, acetato e propionato (Topping e Clifton 2001).

Todos os dados acima referidos, relacionam-se às funções nutritivas da microbiota intestinal no organismo do hospedeiro.

Estudos *in vivo* demonstraram que esses três AGCC estimulam a proliferação e diferenciação das células epiteliais tanto no intestino delgado quanto no grosso, ou seja, os AGCC têm função trófica para o intestino. O butirato inibe a proliferação e estimula a diferenciação das células epiteliais de linhagens neoplásicas induzidas (Siavoshian *et al.* 2000); além disso, promove reversão de células neoplásicas para não-neoplásicas (Gibson *et al.*, 1992).

Bactérias residentes da microbiota intestinal são cruciais na resistência à colonização de micróbios exógenos e, portanto, são altamente relevantes na prevenção de invasão do tecido por patógenos, apresentando, assim, uma função protetora. Essa hipótese é reforçada com base em estudos com animais *germ-free* que demonstrou que a ausência da microbiota intestinal deixa o organismo muito susceptível a infecção (Taguchi *et al.*, 2001).

Vários mecanismos têm sido implicados no efeito barreira. Em estudos *in vitro*, as bactérias competem por sítios de ligação na borda escova das células epiteliais do intestino. A adesão de bactérias não patogênicas pode prevenir a ligação e entrada de patógenos enteroinvasivos dentro das células epiteliais. Além disso, as bactérias competem por disponibilidade de nutrientes nos nichos ecológicos e conservam seu habitat coletivo por administração e consumo de todo recurso. Finalmente, as bactérias intestinais podem impedir, ainda, o crescimento de seus competidores pela produção de substâncias antimicrobianas chamadas bacteriocinas; a habilidade de sintetizar bacteriocinas está largamente distribuída entre as colônias bacterianas do trato gastrointestinal e o organismo do hospedeiro pode controlar a produção de tais substâncias já que a maioria delas trata-se de compostos protéicos (Guarner e Malagelada, 2003a).

O sistema imune amadurece ao redor do tubo digestivo, que é a grande superfície de contato com as bactérias. Nesta região, há milhões de interações complexas que modulam o amadurecimento do sistema de defesa (Link-Amster *et al.*, 1994). A resposta imune à microbiota intestinal depende de componentes inatos e adaptativos. As respostas inatas são mediadas não apenas pelas células imunológicas, tais como neutrófilos e macrófagos que podem fagocitar e matar patógenos, mas também pelas células epiteliais do intestino que coordenam as respostas do hospedeiro para sintetizar uma ampla gama de mediadores antiinflamatórios e transmitem sinais para as células da camada inferior da mucosa. O sistema imune inato tem que discriminar entre microorganismos potencialmente patogênicos das bactérias comensais com o uso de um restrito número de receptores pré-formados (Aderem e Ulevitch, 2000). A colonização microbiana do trato gastrointestinal também afeta a composição do tecido linfóide associado ao intestino, envolvendo mecanismo de memória do sistema imune (Helgeland *et al.*, 1996). A interação precoce entre o tecido linfóide, associado ao intestino, e a microbiota intestinal parece ser crucial no desenvolvimento do complexo da mucosa e dos sistemas imunoregulatórios; por isso, animais *germ free* apresentam baixa densidade de células linfóides na mucosa intestinal e baixa concentração de imunoglobulinas circulantes no sangue (Tannock, 2001).

2.2. Microbiota Intestinal e DII

Durante muito tempo procurou-se estabelecer uma relação entre um agente infeccioso específico e DII, mas sem resultados satisfatórios. Atualmente, sabe-se que as bactérias intestinais influenciam tanto no início quanto na perpetuação de DII; porém, nem toda bactéria tem a mesma capacidade pró-inflamatória, sendo que algumas podem até mesmo ser benéficas e demonstrar efeito antiinflamatório, também chamado de efeito probiótico (Rath, 2003).

A teoria mais aceita, até o momento, é de que o desenvolvimento das DII envolve uma resposta imunitária exacerbada pela microbiota comensal em indivíduos geneticamente susceptíveis (Bamias *et al.*, 2005), já que as bactérias comensais e seus produtos fornecem um constante estímulo antigênico que gera uma resposta agressiva em hospedeiros geneticamente susceptíveis com intolerância reduzida à microbiota autóloga. Essa hipótese é sustentada pelo fato de que a área de inflamação é maior em locais com maior densidade de bactérias intestinais (Wiest e Rath, 2003). Outras evidências que favorecem essa hipótese relacionam-se ao fato de que 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 *Bacteróides* sp, *Escherichia coli* e *Enterobacterium* (Swidsinski *et al.*, 2002; Seksik *et al.*, 2003).

A resposta das células T em animais com colite experimental é caracterizada por um perfil de T_{h1} (T helper 1) direcionado contra as bactérias luminais, como demonstrado nos camundongos IL-10^{-/-} que apresentaram alta concentração de IL-12 e INF- γ na presença da microbiota comensal, que é atenuado em animais *germ free* específicos e é completamente ausente em animais *germ free* total (Sellon *et al.*; 1998).

O mecanismo patogênico pelo qual as bactérias intestinais exercem a sua influência pró-inflamatória não está completamente esclarecido; existe controvérsia se as bactérias e seus metabólitos induzem inflamação intestinal crônica e manifestações extra-intestinal pela produção de antígenos (peptideoglicanas-polissacarídeos, lipopolissacarídeos ou DNA bacteriano) ou se as bactérias simplesmente invadem de uma forma secundária, as úlceras nas áreas inflamadas e perpetuam o estabelecimento da doença (Sutton *et al.*; 2000).

2.3. Manipulação da Microbiota Intestinal

Algumas espécies de bactérias têm sido associadas a uma melhora na saúde do hospedeiro, como é o caso das espécies *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (Wong, 2006); portanto torna-se interessante a manipulação da microbiota intestinal. Pode-se manipular a microbiota intestinal através da utilização de prebióticos, probióticos e também através de antibióticos.

Prebiótico pode ser definido como “um ingrediente não digerível que age beneficiando o hospedeiro mediante a estimulação seletiva do crescimento e/ou da atividade de um número limitado de bactérias no cólon” (Schrezenmeir e de Vrese, 2001). Assim, o efeito prebiótico de um carboidrato se dá em função da sua capacidade de estimular a proliferação de bactérias benéficas ou desejáveis (*Bifidobacterium* e *Lactobacillus*) em detrimento das não desejáveis (*Bacterioides*, *Clostridium*, *E. coli*, etc.) (Swennen *et al.*, 2006). Nesse sentido, os critérios para definir prebióticos serão: resistência a digestão no intestino delgado, hidrólise e fermentação pela microbiota do cólon e estimulação seletiva do crescimento de bactérias no cólon. Os prebióticos podem ter diferentes atividades, como: antiinflamatórias, anticarcinogênicas, antiosteoporótica, antimicrobianas, hipolipidêmicas ou moduladoras de glicemia (Schrezenmeir e de Vrese, 2001).

Considerando a importância do equilíbrio da microbiota intestinal para o controle da resposta imunológica local e sistêmica, utilizar bactérias em pacientes acometidos por DII torna-se perfeitamente justificado, pois certos probióticos são capazes de modular o sistema imune, beneficiando o hospedeiro com aumento da resistência frente a microorganismos patogênicos (Borruel, 2003). O termo probiótico se refere a um “suplemento alimentício com microorganismos vivos que afeta beneficemente o hospedeiro mediante melhora no equilíbrio da microbiota intestinal” (Macfarlane e Cummings, 2002). De fato, a terapia com probióticos tem sido efetiva para a atenuação de colite experimental (Madsen *et al.*, 2001 e Perán *et al.*, 2005), assim como na manutenção da remissão da pouchitis, DC e RCUI (Gionchetti *et al.* 2005 e Hart *et al.*, 2003).

O papel dos antibióticos parece ser mais evidente na DC do que na RCUI. O metronidazol tem se mostrado efetivo como terapia primária em tratamentos de pacientes

com DC (Sutherland *et al.*, 1991), assim como para evitar recorrências do processo inflamatório após receção intestinal (Rutgers *et al.*, 1995). O ciprofloxacino também tem mostrado eficácia na DC ativa (Arnold *et al.* 2002), porém tem pequena atividade em pacientes com RCUI (Turunen *et al.*, 1999).

3. Espécies Estudadas

Apesar da amplitude de possibilidades terapêuticas, não existe ainda um tratamento ideal para as DII com perfil adequado de eficácia e segurança. Por essa razão, é de grande interesse estudar agentes com pouco efeito colateral. Nesse sentido, o emprego de diferentes frutas e vegetais, contendo fibras dietéticas e compostos químicos em sua composição, podem mostrar efeito benéfico nas DII já que são isentos de toxicidade, e fazem parte da dieta.

A escolha dos vegetais estudados levou em consideração seus compostos bioativos, bem como fibras dietéticas e substâncias antioxidantes; além da viabilidade da matéria prima produzida em larga escala, sendo até mesmo encontrada em quintais de muitas casas, tornando-a barata e de fácil aquisição, o que certamente contariam com alta taxa de adesão.

Os vegetais selecionados foram: mamão e couve. A seguir estão relacionadas informações detalhadas acerca dos mesmos.

Mamão

O mamoeiro (*Carica papaya*, Caricaceae) é um arbusto ereto, não ramificado, de 2-3 m de altura e nativo da América Central e Caribe; seus frutos (figura 2) são do tipo baga piriforme com polpa carnosa, apresentando múltiplas variedades em função dos cultivares desenvolvidos por melhoramento genético (Vieira, 1992 e Lorezi *et al.*, 2006). É um fruto climatérico, de grande aceitação no mercado brasileiro e no exterior. Contribuindo com cerca de 38% da produção mundial, o Brasil é líder no ranking dos países produtores de mamão com uma produção de aproximadamente 1.700.000 toneladas por ano, um negócio que movimentou 20 milhões de dólares em 2001. As regiões Nordeste e Sudeste lideram a

produção da fruta, destacando-se a Bahia como primeiro produtor, seguido pelo Espírito Santo (Embrapa, 2009). Esse fruto também é amplamente cultivado em outras regiões tropicais do planeta para produção de frutos consumidos em todo mundo (Lorenzi e Matos, 2009).



Figura 2. Foto ilustrativa da variedade de mamão usada nesse estudo.

Tanto frutos e sementes, como também látex e raízes do mamoeiro, são largamente empregados pela medicina popular. O fruto é considerado digestivo, diurético e laxativo; o látex, empregado, na forma de solução de algumas gotas por litro de água fervida, é usado no tratamento de asma e diabetes, enquanto que na forma pura, é usado como vermífugo poderoso e para eliminar sardas, calos e verrugas (Mors *et al.*, 2000 e Panizza, 1998). Sementes secas e moídas, usadas na forma de chá, são consideradas também como vermífugo (Panizza, 1998) e fruto verde é abortivo (Vieira, 1992).

A polpa do mamão é fonte excelente de carotenóide e ácido ascórbico e suas sementes são ricas em gorduras e proteínas. Os carotenóides presentes na polpa do mamão são beta-caroteno, beta-zeacaroteno, zea-caroteno, criptoflavina, beta-criptoxantina, 5-6-epoxi-beta-criptoxantina (Rodriguez-Amaya, 2001 e Aloba, 2003). Em 100 g de mamão

seco (liofilizado) contém 9,59 g de fibras dietéticas solúveis e 8,92 g de fibras dietéticas insolúveis (Glorio *et al.*, 2008), enquanto que em 100 g de mamão fresco contém 1,3 g de fibras dietéticas solúveis e 1,3 g de fibras dietéticas insolúveis (Ramulu e Rao, 2003). A fruta verde possui papaína que ajuda na digestão (Raj Kapoor *et al.*, 2002).

Couve-comum

A espécie botânica *Brassica oleracea* L. (Brassicaceae), conhecida popularmente como couve-comum, tem seu centro de origem ao longo da costa do Mediterrâneo, de onde provavelmente se disseminou por toda Europa. Esta espécie é subdividida em variedades botânicas; dentre elas, destacam-se *Brassica oleracea* var. *capitata* L (repolho), *B. oleracea* var. *botrytis* L. (couve -flor), *B. oleracea* var. *itálica* Plenck (brócolis), *B. oleracea* var. *acephala* DC (couve -comum), *B. oleracea* var. *gemminifera* Zencker (couve-de-bruxelas) e *B. oleracea* var. *gongilodis* L. (couve-rábano) (Giordano, 1983 e Souza, 1983). Todas as variedades possuem o mesmo número de cromossomos ($2n= 2x= 18$), sendo possível o cruzamento entre elas. Esta espécie é uma das mais polimórficas entre todas as hortaliças (Giordano, 1983).

A couve-comum (figura 3) é botanicamente identificada e classificada como *Brassica oleracea* var. *acephala*, sendo caracterizada como planta arbustiva com porte entre 40 e 120 cm de altura, no entanto, algumas vezes podem ser encontradas plantas com mais de 3 m de altura. Seu caule é ereto, robusto, cilíndrico, liso, carnoso e não intumescido, com contínua emissão de novas folhas em seu ápice. As folhas da couve são pecioladas, espessas, um pouco carnosas, distribuindo-se em forma de roseta ao redor do caule. Nas axilas das folhas surgem brotações que podem ser utilizadas para propagação vegetativa através de mudas (Souza, 1983). Considera-se que esta variedade é a mais próxima, em termos genéticos, da couve-silvestre que deu origem a todas as variedades cultivadas. Este vegetal é tipicamente cultivado no outono-inverno, sendo bem adaptado ao frio intenso e resistente à geada; também apresenta boa tolerância ao calor e permanece produtivo durante vários meses. A época para plantio se estende ao longo do ano, em numerosas regiões (Filgueira, 2003).



Figura 3. Foto ilustrativa da variedade de couve usada nesse estudo.

Dentre os vegetais consumidos diariamente, as hortaliças folhosas não se caracterizam pelo aporte energético, mas sim como um grupo de enorme interesse para a saúde humana devido à riqueza em vitaminas, elementos minerais e fibras; tais componentes tornam seu consumo imprescindível em uma alimentação saudável e equilibrada. Os vegetais de folha verde escuro são ricos em carotenóides; a couve está entre aqueles que contêm os mais altos índices de luteína e β -caroteno, esse último auxilia o organismo a se proteger das doenças degenerativas do tipo degeneração macular (Sommerburg, *et al.*; 1998 e Kopsell *et al.*, 2003). A couve também é uma boa fonte de vitamina do complexo B (principalmente B6) e vitamina C (Kopsell *et al.*, 2003), além de minerais como Ca^{++} e Mg^{++} , de glicosinolatos e de sulfóxido de S-metil cisteína, sendo que estes dois últimos, além dos benefícios à saúde, também são responsáveis pelo sabor característico do vegetal (Kopsell e Kopsell, 2003). Em 100 g de couve cozida contêm 0,77 g de fibras dietéticas solúveis e 1,23 g de fibras dietéticas insolúveis (Cintra *et al.*, 1997).

Portanto, com base na composição química da couve e do mamão, sugere-se que estes vegetais possam constituir um alimento funcional para tratar DII.

OBJETIVOS

Geral

Desenvolver uma combinação de alimentos capaz de modular a microbiota intestinal e proteger a mucosa intestinal contra inflamações.

Específicos

- a) Testar, *in vitro*, diferentes combinações de mamão e couve para avaliar a produção dos ácidos graxos de cadeia curta;
- b) Avaliar a ação da combinação de mamão e couve que mais produziu butirato sobre:
 - a proteção contra a inflamação intestinal em animais com colite ulcerativa induzida por TNBS;
 - a modulação da microbiota intestinal em animais normais.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Obtenção e Preparação dos Vegetais Estudados

Todos os vegetais são de procedência orgânica, isto é, sem utilização de produtos químicos. O mamão foi descascado, suas sementes foram retiradas e a sua polpa foi desidratada em estufa, na ausência de luz, à temperatura de 40°C, com posterior trituração em moinho de facas. As folhas de couve foram lavadas e também foram secadas em estufa, no escuro, à temperatura de 40°C, com posterior trituração em moinho de facas. Ambos vegetais, após secos e triturados, foram armazenados em frasco de cor âmbar a 4°C.

2. Animais de Experimentação

Os animais utilizados nos experimentos desenvolvidos no Brasil foram ratos Wistar (150 - 250 g), provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB), aclimatados às condições do laboratório por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, com temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclos controlados de claro/escuro de 12h. Os animais foram alimentados com ração Nuvital (Nuvilab[®]) e água ad libitum. A manipulação dos animais está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP como número de protocolo 823-2.

Já os animais utilizados em experimentos desenvolvidos na Espanha foram ratos Wistar (180 - 200 g) provenientes do Serviço de Animais de Laboratório da Universidade de Granada. Estes animais foram mantidos no biotério do laboratório por sete dias antes de do início dos experimentos, a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e com ciclo de claro/escuro de 12 horas. Uma dieta correspondente à Nutivital para roedores (Panlab A04[®]) e água, ambas ad libitum, serviram de alimento aos ratos.

3. Teste *In Vitro*

Na etapa experimental *in vitro*, foram realizadas diferentes combinações de couve e mamão. As combinações testadas foram:

- (1) salina
- (2) 0,5 g couve;
- (3) 0,4 g couve + 0,1 g mamão;
- (4) 0,3 g couve + 0,2 g mamão;
- (5) 0,25 g couve + 0,25 g mamão;
- (6) 0,2 g couve + 0,3 g mamão;
- (7) 0,1 g couve + 0,4 g mamão;
- (8) 0,5 g mamão.

As diferentes proporções de vegetais foram hidratadas com tampão fosfato de sódio (PBS) (pH 7,4) e acrescido de Oxyrase[®] por 12 a 16 horas a 4°C. O Oxyrase[®] é uma enzima que retira o oxigênio do ambiente onde se encontra e é usado para permitir o crescimento das bactérias intestinais anaeróbicas. Após este tempo, 10 ml de suspensão fecal de rato (suspendido em PBS pH 7,4, acrescido de Oxyrase[®] na proporção de 1:6) foram adicionados a esses vegetais e incubadas por 24 horas, a 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). Momentos antes da quantificação dos AGCC, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C, sendo que somente essas condições foram suficientes para a separação entre o material suspenso e o sobrenadante.

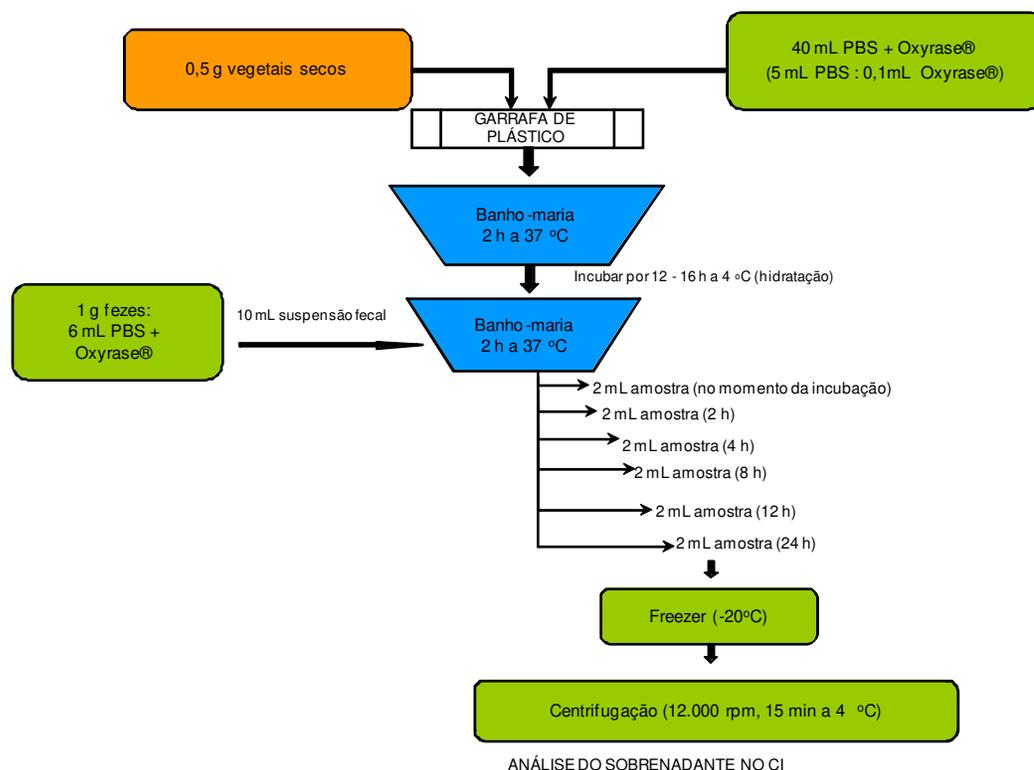


Figura 4. Fluxograma do teste *in vitro*.

3.1. Quantificação de AGCC por Cromatografia de Íons

Os AGCC foram analisados por Cromatografia de Íons no Laboratório do Prof. Dr. Lauro Kubota no Instituto de Química - UNICAMP, com a finalidade de avaliar quais preparações produziram maior quantidade de butirato.

A metodologia utilizada foi descrita por Dias *et al.* (2009), para isso os AGCC foram quantificados no cromatógrafo de íons modular (Metrohm[®], Suíça) composto por uma unidade de isocrática modelo 818 IC e interface 830 IC. O volume de injeção da amostra foi de 10 μ L, em uma coluna analítica Metrosep Organics Acids (Metrohm[®]), com 100 mm de comprimento e diâmetro de 7.8 mm. Detecção obtida por um detector condutimétrico – 819 IC com volume interno de 1.0 μ L. A condutividade do eluente foi suprimida através do uso de LiCl 50 mM (Merck, Darmstadt, Germany). A aquisição e tratamento de dados foram obtidos através do software IC Net, versão 2.3 (Metrohm[®]).

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada, ultrapura tipo I, filtrada por membrana 0,22 µm obtida com um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). O eluente H₂SO₄ 0,5 mM (Merck, Darmstadt, Germany) foi purgado em ultrassom durante 30 minutos para remoção dos gases dissolvidos (principalmente CO₂). As soluções padrão dos analitos, acetato de sódio, propionato de sódio e butirato de sódio (Acros Organics, Nova Jersey, USA) foram preparadas através da diluição das soluções padrão multielementar a 10 mM, sendo a curva de calibração preparada a partir dessa solução multielementar.

Para a identificação dos ácidos graxos foi utilizado a comparação dos tempos de retenção dos picos dos cromatogramas da amostras e dos padrões de ácidos orgânicos.

4. Ensaio *In Vivo*

4.1. Avaliação da Atividade Prebiótica das Dietas

Ratos Wistar foram divididas em 4 grupos de 6 animais cada:

- Grupo Controle (não tratado): os animais foram alimentados somente com ração e água ad libitum.

- Grupo Couve: os animais foram alimentados com ração para roedores e água ad libitum e receberam, diariamente durante 2 semanas, solução de 0,5 g de couve por quilo de animal, diluído em um volume de 10 ml de salina por kg de animal.

- Grupo Mamão: os animais foram alimentados com ração para roedores e água ad libitum e receberam diariamente, durante 2 semanas, solução de 0,5 g de mamão por quilo de animal, diluído em um volume de 10 ml de salina por kg de animal.

- Grupo Mistura (couve + mamão): os animais foram alimentados com ração e água ad libitum e receberam, diariamente durante 2 semanas, solução contendo 0,5 g da mistura/kg de animal dos vegetais que apresentar maior produção de butirato no teste *in vitro*, diluído em um volume de 10 ml de salina por kg de animal.

O peso dos animais e o consumo de ração foram mensurados a cada três dias. Periodicamente, foram coletadas fezes expelidas no momento do tratamento com a

finalidade de verificar a porcentagem de água nas fezes. Estas fezes foram secas em estufa a 60°C por 48 horas. Após o período de 14 dias, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e o conteúdo do cólon foi extraído para quantificar a produção de AGCC e analisar a microbiota fecal.

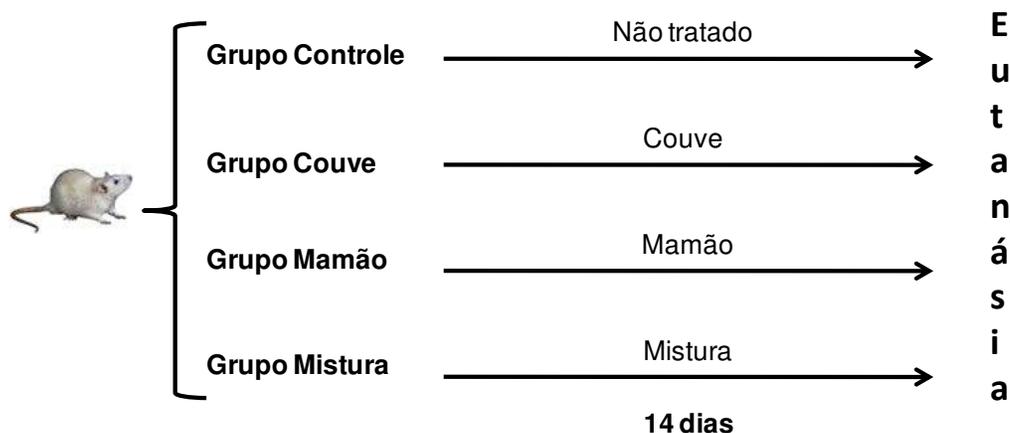


Figura 5. Esquema do experimento da avaliação da atividade prebiótica *in vivo*.

4.2. Indução de Colite Ulcerativa por TNBS e Contagem de Lesão do Cólon

A colite ulcerativa foi induzida utilizando o método descrito por Morris *et al.* (1989), com algumas modificações introduzidas posteriormente por Gálvez *et al.* (2000).

Ratos Wistar foram divididas em 5 grupos de 6 animais cada, os quais foram tratados por 14 dias como referido no experimento anterior; a única diferença até aqui é que dois grupos foram tratados com solução salina.

No dia da indução, os animais foram submetidos a um período de 24 horas de jejum, logo foram levemente anestesiados com halotano e se procedeu a administração intrarectal de 0,25 ml de uma solução de 10 mg de TNBS dissolvido em etanol (50% v/v). A administração foi realizada pela introdução de um cateter de teflon (2 mm de diâmetro) 8 cm desde o ânus, mantendo os animais em posição supina até a recuperação da anestesia. A solução de TNBS foi preparada a partir de um liofilizado da solução comercial aquosa (5% p/v). Foram controlados, diariamente, o peso e o consumo de ração, além da presença de diarreia pela visualização de restos perianais (Bell *et al.*, 1995).

Assim, os grupos foram mais uma vez divididos:

- Grupo Controle: os animais receberam solução salina por gavagem em um volume de 10 ml de salina por kg de peso de animal. No dia da indução da colite, 0,25 ml de salina foram inseridos por via anal.

- Grupo TNBS: os animais receberam solução salina, por gavagem, em um volume de 10 ml de salina por kg de peso de animal. No dia da indução da colite, 0,25 ml de solução contendo 10 mg de TNBS foram inseridos por via anal.

- Grupo Couve: os animais receberam, por gavagem, 0,5 g de couve por kg de peso de animal, diluído em um volume de 10 ml de salina. No dia da indução da colite, 0,25 ml de solução contendo 10 mg de TNBS foram inseridos por via anal.

- Grupo Mamão: os animais receberam, por gavagem, 0,5g de mamão por kg de peso de animal, diluído em um volume de 10 ml de salina. No dia da indução da colite, 0,25 ml de solução contendo 10 mg de TNBS foram inseridos por via anal.

- Grupo Mistura (couve + mamão): os animais receberam, por gavagem, 0,5 g da mistura/kg de animal dos vegetais que apresentar maior produção de butirato no teste *in vitro*, diluído em um volume de 10 ml de salina. No dia da indução da colite, 0,25 ml de solução contendo 10 mg de TNBS foram inseridos por via anal.

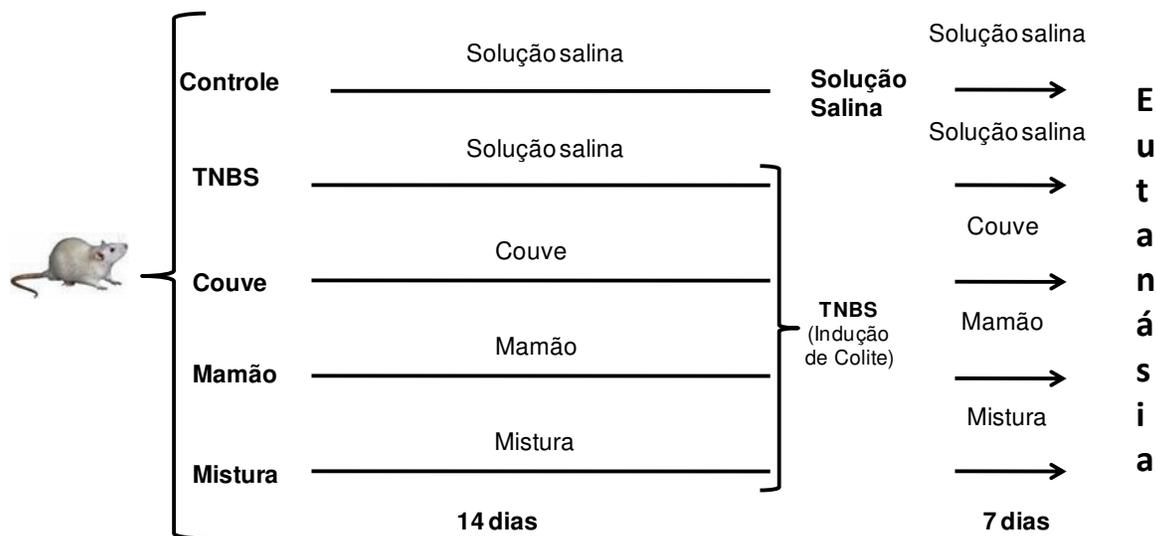


Figura 6. Esquema do experimento de indução da inflamação intestinal por TNBS.

Todos os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ após sete dias da administração do agente inflamatório intestinal. O cólon foi retirado em sua totalidade, observando a presença ou não de aderências entre o intestino grosso e os órgãos adjacentes. Em seguida, o intestino foi limpo, restos de gordura e adesões mesentéricas foram retirados sobre uma placa de Petri com gelo. O cólon foi aberto longitudinalmente e seu conteúdo foi extraído, pesado e processado para posteriores determinações microbiológicas. Em seguida, o tecido foi lavado em solução salina isotônica e pesado. As lesões macroscópicas do tecido foram quantificadas segundo o critério descrito por Bell *et al.* (1995), que considera a presença ou ausência de distintas características do processo inflamatório, como mostra a tabela 2.

Tabela 2. Escala de valores do índice de lesões macroscópicas em modelos de colite experimental por TNBS em ratos Wistar (Bell *et al.*, 1995).

0 pontos	Cólon normal
1 pontos	Hiperemia localizada sem úlceras
2 pontos	Ulceração sem hiperemia nem engrossamento da parede intestinal
3 pontos	Ulceração com ponto de inflamação
4 pontos	Dois ou mais locais com ulceração e inflamação
5 pontos	Zonas grandes de dano, inflamação e ulceração com extensão maior que 1 cm
6 – 10 pontos	Zonas grandes de dano tecidual com extensão maior que 2 cm, somando um ponto (até 10) a cada cm adicional de extensão

Os estudos histológicos foram realizados a partir de amostras do cólon (0,5 cm de comprimento) retiradas da zona proximal imediatamente adjacente à lesão. E, por último, o cólon foi dividido em fragmentos longitudinais, os quais foram imediatamente congelados (-80°C) para posteriores determinações bioquímicas.

4.2.1. Histologia

O tecido foi fixado em solução tamponada de formaldeído a 4% (em tampão fosfato, pH 7,2) durante 3 dias e, em seguida, desidratado com álcool em concentrações crescentes, até álcool absoluto; após a desidratação o tecido foi embebido em parafina. Amostras de tecido não inflamado foram coletadas do grupo controle. Foram obtidas cortes em diferentes níveis, de 5 µm de espessura, com a ajuda de um micrótomo; os cortes foram posteriormente corados com hematoxilina-eosina para quantificação histológica mediante microscopia óptica. Os danos histológicos foram quantificados em uma escala de 0 - 59, por um patologista, em esquema duplo cego e seguindo os critérios estabelecidos por Stucchi *et al.* (2000) com algumas modificações que podem ser observadas na tabela 3.

Tabela 3: Escala de quantificação da lesão histológica em modelo de colite experimental induzida por TNBS.

Epitélio da Mucosa e Lâmina Própria

Ulceração: nenhuma (0); leve (0 – 25 %) (1); moderada (25 – 50 %) (2); severa (50 – 75 %) (3); extensa faixa de espessura (mais de 75 %) (4).

Infiltrado de células polimorfonucleares

Fibrose e infiltrado de células mononucleares

Edema e dilatação dos vasos linfáticos

Criptas

Atividade mitótica em: terço inferior (0); terço médio leve (1); terço médio moderado (2); terço superior (3)

Dilatação

Depleção de células caliciformes

Submucosa

Infiltrado de células polimorfonucleares

Infiltrado de células mononucleares

Edema

Vascularização

Camada Muscular

Infiltrado de células polimorfonucleares

Infiltrado de células nucleares

Edema

Infiltração na serosa

Escala de pontuação: 0, nenhuma; 1, ligeira; 2, leve; 3, moderado; 4, severo. Pontuação máxima: 59 pontos.

4.2.2. Determinação da Atividade da Mieloperoxidase Colônica

A determinação da mieloperoxidase seguiu o método descrito por Krawisz *et al.* (1984). Os fragmentos do cólon foram dispostos sobre uma placa de Petri gelada, e em seguida, foram picados com tesoura por 15 segundos. Então, a amostra foi homogeneizada em tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) a 0,5 % (p/v) em tampão fosfato salina (50 mM, pH 6,0) com uma diluição final de 1:20 (p/v) em um homogeneizador até obtenção de aspecto uniforme. O HTBA atua como um detergente, o qual facilita a liberação da enzima MPO de dentro dos grânulos dos neutrófilos, onde se encontra armazenada. O homogenato foi submetido à ultrassom por 10 segundos e foi submetido a um sêxtuplo processo de congelamento e descongelamento que facilitou a ruptura das estruturas celulares e, em consequência, a liberação da enzima. A amostra foi centrifugada a 7000 g durante 10 minutos a 4°C. O próximo passo foi a determinação da atividade da MPO seguindo a cinética da reação frente a água oxigenada. Em uma placa de Elisa (Greiner), foram adicionados 50 µl do sobrenadante a 150 µl de reativo de coloração composto por cloridrato de o-dianisidina (0,167 mg/ml) e peróxido de hidrogênio à 0,066 % em tampão fosfato (50 mM, pH 6,0). A absorbância foi determinada a 450 nm. A atividade da enzima foi calculada por interpolação em curva padrão, realizada com MPO procedente de neutrófilos humanos. Uma unidade de MPO se define como a quantidade necessária para degradar 1 mmol/minuto de peróxido de hidrogênio 25°C. Os resultados foram expressos como U/g de tecido fresco.

4.2.3. Determinação do Conteúdo Colônico de Glutathiona Total

A determinação do conteúdo de glutathiona total do cólon de ratos foi feita de acordo com o método da redução cíclica do DTNB-GSSG (Akerboom e Sies, 1981). Para esta determinação foram utilizados os fragmentos do cólon congelado em solução de tricloroacético (TCA) 5 % (p/v). Os fragmentos foram dispostos sobre uma placa de Petri gelada e picados com uma tesoura por 15 segundos e em seguida foram homogeneizados em solução de TCA em uma proporção de 1:20 (p/v). O homogenato foi centrifugado a

2000 xg, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 10000 xg por 5 minutos a 4°C. Para a quantificação da glutathiona, foram misturados em uma placa de Elisa:

- 20 µl do sobrenadante,
- 5 µl de tampão fosfato salina com ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (PBS-EDTA) (solução aquosa de fosfato sódico 143 mM EDTA 6,3 mM, pH 7,5),
- 140 µl de solução de β -NADPH (0,298mM) em PBS-EDTA e 20 µl de DTNB (6mM) em PBS-EDTA.

Esta solução foi incubada a 30° C durante 5 minutos. Em seguida foram adicionados 15 µl de solução de GSSGrd (266 UI/ml) em PBS-EDTA. A placa foi agitada e o aumento da absorbância foi registrado a 412 nm. A concentração de glutathiona foi calculada por interpolação com a curva realizada com GSH. Os resultados foram expressos em nmol de glutathiona total por grama de tecido fresco.

4.2.4. Determinação dos Níveis Colônicos de TNF α e IL-1 β

Para determinação destes parâmetros bioquímicos seguiu-se a metodologia proposta por McCafferty *et al.* (1992). Os fragmentos do cólon foram picados com uma tesoura, sobre uma placa de Petri com gelo, por 15 segundos, e em seguida, foram encubados em tampão fosfato sódico (10 mM, pH 7,4) na proporção 1:5 (p/v) a 37°C, durante 20 minutos, com agitação constante. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 9000 g, por 30 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi congelado a -80°C. Para determinação da concentração de IL-1 β e TNF α foi utilizado kits comerciais imunoenzimáticos (Bio-Rad laboratórios, Espanha). Os resultados foram expressos em ng/g ou pg/g de tecido fresco.

4.2.5. Determinação da Expressão de iNOS e COX-2

A determinação da expressão de iNOS e COX-2 em tecido do cólon foi realizada usando técnica de Western blotting. Os fragmentos colônicos foram descongelados, picados

e homogeneizados em uma proporção de 1:5 (p/v) durante 1 minuto em PBS com dodecil sulfato sódico (SDS) a 0,1 %, desoxicolato sódico a 1 % e Triton X-100 a 1 %, contendo inibidores de protease (aprotinina, 1,10-fenantrolina, iodocetamida, fluoreto de fenilmetilsulfonilo). Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10000 xg por 10 minutos. O conteúdo de proteína foi então determinado pelo Método do Ácido Bicinconínico (BCA) (metodologia descrita abaixo) para determinações das concentrações de proteínas em todos os pocinhos do gel de eletroforese.

Para desnaturar as proteínas, os sobrenadantes (100 µg) foram fervidos, durante 5 minutos, em tampão da amostra Laemli 5x (Tris-HCL 0,2 M, pH 6,8, duodecil sulfato sódico (SDS) 5%, 2-mercaptoetanol 8,8% (v/v), glicerol 3,7%, azul de bromofenol 60 µg/ml); a solução foi submetida a eletroforese em um gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) à 6%. Como indicadores de peso molecular foi utilizada mistura de proteínas previamente marcadas. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual posteriormente foi bloqueada durante pelo menos uma hora, à temperatura ambiente com leite desnatado (5%) em tampão Tris salina contendo Tween[®]-20 a 0,1% (v/v) (TBS-T). Depois do bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T, durante 5 minutos, e expostas às correspondentes diluições de anticorpos incorporados em soro albumina bovino à 5% (p/v) em TBS-T. As diluições de anticorpo primário 1:2000 referente ao iNOS e 1:1000 referente à COX-2 em tampão TBS-T foram incubadas durante toda uma noite, a 4° C em agitação. O controle da carga protéica foi padronizado reincubando as membranas com anticorpo primário anti-β-actina, diluído 1:3000. O anticorpo secundário empregado foi o Anti-IgG de coelho (1:3000) durante 1 hora. As bandas foram detectadas por quimioluminescência e reveladas sobre película fotográfica (Kodak, Madrid, Espanha). A intensidade das bandas do gel foi quantificada através do programa *Scion Image*.

4.2.6. Determinação do Conteúdo de Proteínas: Método do Ácido Bicinconínico (BCA)

A determinação do conteúdo de proteínas seguiu a técnica descrita por Smith *et al.* (1985) onde foi empregado um colorante que é obtido através da mistura dos reativos A e B na proporção 50:1 (v/v). O reativo A consiste em uma dissolução aquosa de ácido bicinconínico (25,8 mM) em forma de sal sódico (ácido 4,4'-dicarboxi-2,2' biquinolínico), $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,16 M), tartarato sódico-potássio (5,7mM), NaOH (0,1 M) e NaHCO_3 (0,11 M) (pH 11,25). O reativo B é uma solução aquosa a 40% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Ambos reativos são estáveis, à temperatura ambiente, de forma indefinida. Para realizar a determinação, foram acrescentados 2 μl da amostra em 200 μl do reativo de coloração e, em seguida, a solução resultante foi incubada a 30°C durante 30 minutos. A leitura foi feita a 560 nm. O cálculo do conteúdo de proteína foi realizado por interpolação em uma curva padrão de soro albumina bovina.

4.2.7. Estudos Microbiológicos

Para quantificar as colônias de bactérias, as amostras do conteúdo luminal do cólon foram pesadas, homogeneizadas e ressuspendidas em uma concentração de 50 - 100 mg/ml em água de peptona estéril. Em seguida, foram feitas diluições seriadas 1/10 (de 10^{-1} à 10^{-5}), as quais foram cultivadas em meios específicos.

Para fazer a cultura de lactobacilos, as amostras foram inoculadas em uma placa de Petri com Agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe, Merck, Darmstadt, Alemanha). Este meio contém polisorbato, acetato, magnésio e manganês, que atuam como fatores de crescimento para muitos lactobacilos. Já, para as bifidobactérias, foi empregado o mesmo meio, porém, suplementado com 0,5 mg/l de dicloxacilina, 1 g/l de LiCl, e 0,5 g/l de L-cisteína. Foram usadas placas de Petri de 10 cm de diâmetro (Nunc, Roskilde, Dinamarca) nas quais foram colocados, aproximadamente, 15 ml de meio de cultivo previamente esterilizados em autoclave. Foram inoculadas 200 μl de homogenato das fezes nas placas que foram, em

seguida, estendidos por toda a superfície com pequenas esferas de vidro, por 20 segundos, para assegurar uma distribuição homogênea.

Já, para o cultivo de bactérias aeróbias e enterobactérias foram utilizados placas comerciais petrifilm© (3M, Madri, Espanha). Foi inoculado 1 ml do homogenato com uma pipeta e, em seguida, a placa foi pressionada para garantir distribuição homogênea do conteúdo por toda a área.

Todas as placas foram incubadas em câmaras de anaerobiose durante 24 - 48 horas a 37°C. Os resultados foram expressos em \log_{10} unidades formadoras de colônia/g material.

4.2.8. Quantificação de AGCC do Conteúdo Intestinal por Cromatografia Gasosa

O conteúdo fecal do cólon foi homogeneizado imediatamente após sua obtenção com solução de NaHCO_3 (159 mM, pH 7,8), em atmosfera de nitrogênio, em uma proporção de 1:5 (p/v). As amostras foram incubadas durante 24 horas a 37°C, sob agitação constante. Transcorrido este tempo, as amostras foram congeladas à - 80°C até ser processada.

Depois que o homogeneizado foi descongelado, os AGCC foram extraídos com acetato de etila; para isso, a uma alíquota de 1 ml de homogenato fecal foi adicionados 50 μL de padrão interno, ácido 2-metilvalérico (100mM) e uma gota de ácido sulfúrico (10 μL). A amostra foi agitada e logo centrifugada 10000 xg durante 5 minutos a 4°C para separar a fase inferior aquosa da fase superior de acetato de etila onde se encontram os AGCC. Foi coletada a parte superior a mesma seguindo de desidratação com sulfato de sódio anidro e em seguida. A mistura foi centrifugada pela última vez a 10000 xg durante 5 minutos a 4°C. Coletou-se o extrato orgânico livre de água, o qual foi colocado em um vial cromatográfico tampado e mantido a -80°C até sua análise. Na análise foi empregado um cromatógrafo de gases (Varian CP-3800) equipado com uma ID CPWAX 52 CB de 60 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, e um detector de FID (Varian, Lake Forest, CA). Gás hélio foi utilizado como transportador e misturador de amostra o gás hélio, com fluxo de 1,5 ml/min. A temperatura de injeção foi 250°C. As concentrações de

butirato, acetato e propionato foram calculadas automaticamente através da área sob os picos usando o programa Chromatography Workstation (versão 5.5), conectado on-line ao detector FID.

5. Análise Estatística

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

RESULTADOS

1. Análise *In Vitro* de AGCC Produzidos pela Incubação de Fezes de Ratos com Vegetais Secos e Quantificados por Cromatografia de Íons

A figura 7 mostra o cromatograma dos padrões usados para a identificação dos picos de AGCC das amostras provenientes da fermentação dos vegetais, por comparação dos diferentes tempos de retenção.

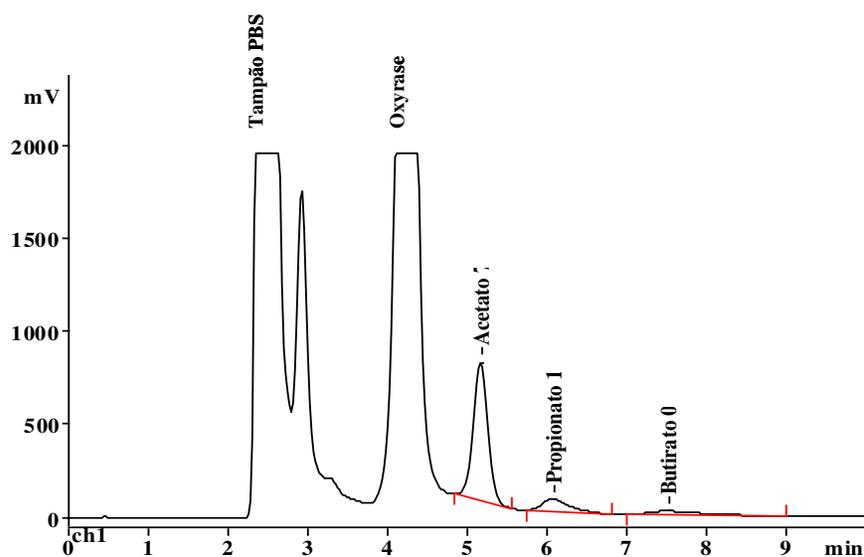


Figura 7. Cromatograma dos padrões dos AGCC (acetato, propionato e butirato) usados na quantificação dos mesmos em amostras provenientes da fermentação de couve e mamão em diferentes proporções, pelas bactérias cólicas de ratos Wistar (n=6).

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

Já na figura 8 está apresentado o cromatograma da amostra que mais produziu butirato.

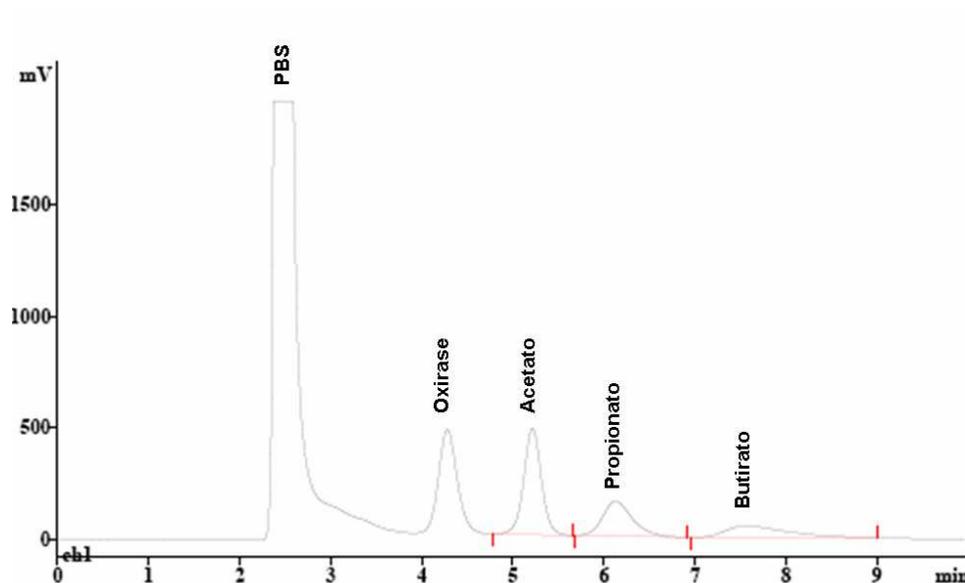


Figura 8. Cromatograma da fermentação de couve ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$) pelas bactérias cólicas de ratos Wistar no tempo de 24 horas ($n=6$).

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

A tabela 4 indica as concentrações de AGCC (mg/g) obtidas a partir da fermentação das fezes incubadas com os vegetais secos e triturados.

Tabela 4. Quantificação de AGCC (mg.g ⁻¹) em suspensão fecal de ratos acrescida de diferentes proporções de couve e mamão, nos tempos 0, 8, 12 e 24 horas de incubação (n=6).				
Tempo (h)	0	8	12	24
0,5 g Couve				
Acetato	5,11	32,77	48,23	53,88
Propionato	1,16	3,38	3,26	7,86
Butirato	3,25	3,72	3,50	3,73
0,4 g Couve + 0,1 g Mamão				
Acetato	5,99	25,23	28,66	70,85
Propionato	1,64	2,75	1,83	3,13
Butirato	3,57	3,33	2,44	2,98
0,3 g Couve + 0,2 g Mamão				
Acetato	6,37	24,56	37,89	35,82
Propionato	1,43	2,63	2,95	2,12
Butirato	3,74	3,41	3,85	3,05
0,25 g Couve + 0,25 g Mamão				
Acetato	6,38	19,89	30,66	40,20
Propionato	1,31	1,89	2,23	2,33
Butirato	3,88	2,67	3,04	3,25
0,2 g Couve + 0,3 g Mamão				
Acetato	5,85	22,47	34,04	28,52
Propionato	1,17	2,98	3,08	3,04
Butirato	3,41	3,35	3,67	2,72
0,1 g Couve + 0,4 g Mamão				
Acetato	6,61	17,00	26,42	29,66
Propionato	1,80	2,61	2,78	2,50
Butirato	3,92	2,64	3,18	2,94
0,5 g Mamão				
Acetato	5,51	29,72	21,43	46,55
Propionato	1,26	5,68	3,71	6,28
Butirato	3,48	3,99	2,77	4,19

As amostras foram analisadas em simplicata, sendo que apenas algumas amostras, selecionadas ao acaso, foram quantificadas 5 vezes com a finalidade de se observar

possíveis variações entre elas. Os resultados mostraram variação mínima (dados não mostrados), característica importante da metodologia empregada (cromatografia de íons). Vale ressaltar que a metodologia empregada na quantificação de AGCC, desta fase do trabalho, foi desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa e está validada através do artigo, publicado no *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, em 2009.

Foi possível observar, na tabela 4, que o acetato foi sempre produzido em maiores concentrações que os AGCC propionato e butirato, qualquer que tenha sido a combinação dos vegetais estudados, o que está de acordo com os dados apresentados na introdução sobre esses ácidos graxos.

Como a escolha da combinação dos vegetais utilizados para estudos posteriores considera apenas a produção de butirato, os gráficos apresentados a seguir mostram somente a produção deste mesmo AGCC nos tempos de 12 e 24 horas de incubação, já que foi nesse período que sua produção alcançou valores máximos.

Observou-se que no tempo de 12 horas (figura 9), a amostra que mais produziu butirato foi aquela obtida na fermentação de 0,3 g de couve acrescida de 0,2 g de mamão pelas bactérias do cólon, seguida da amostra que continha somente couve.

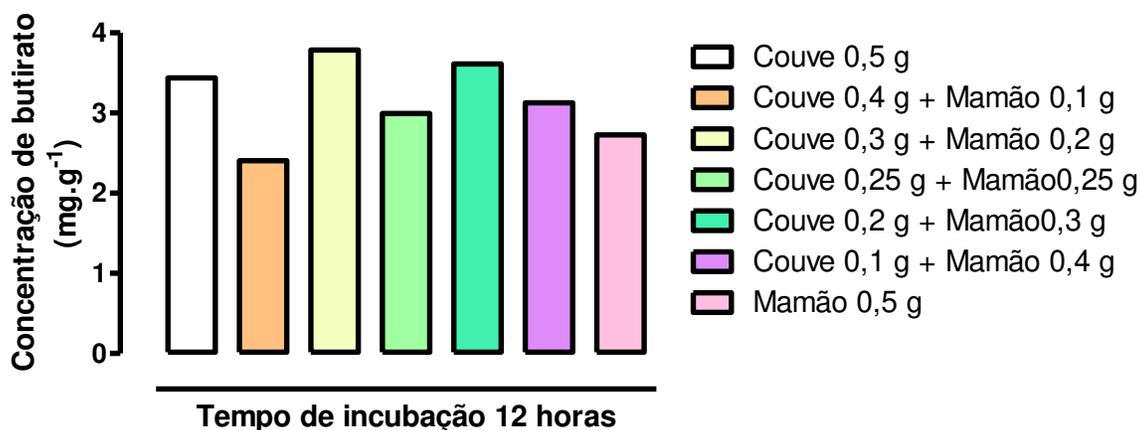


Figura 9. Quantificação de butirato (mg.g^{-1}) proveniente da fermentação de couve e mamão, em diferentes proporções, pelas bactérias cólicas de ratos Wistar, no tempo de 12 horas ($n=6$).

Já no tempo de 24 horas de incubação (figura 10), foi possível observar que as quantidades de butirato produzidas, a partir da fermentação de couve, mantiveram-se quase constante.

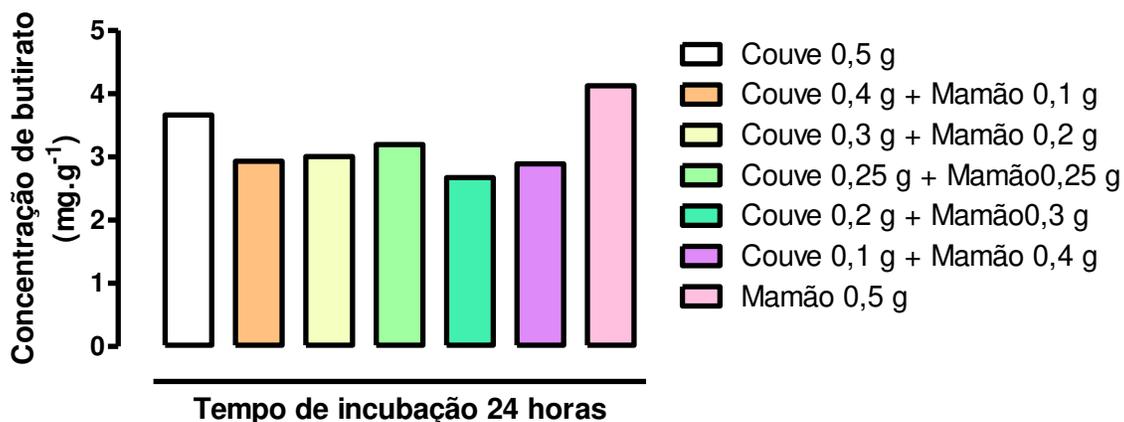


Figura 10. Quantificação de butirato (mg.g⁻¹) proveniente da fermentação de couve e mamão, em diferentes proporções, pelas bactérias cólicas de ratos Wistar, no tempo de 24 horas (n=6).

Assim, a produção de butirato que com 12 horas de incubação mostrou-se dependente da fermentação de ambos vegetais pelas bactérias cólicas, com 24 horas pareceu mais relacionada à fermentação do mamão.

2. Avaliação da Atividade Prebiótica do Tratamento de Ratos Saudáveis com os Vegetais Secos

A suplementação com os vegetais couve e mamão, separados ou em combinação, por duas semanas, não demonstrou efeito tóxico em relação ao aspecto geral dos animais, assim como não induziu diarreia. Estes resultados já eram esperados, pois ambos vegetais são comumente empregados na dieta dos brasileiros. Também não foram observadas, após sacrifício dos animais, alterações macroscópicas na cavidade peritoneal, o que confirma a ausência de sinais de toxicidade dos tratamentos empregados. O peso dos animais e o consumo de ração (dados não mostrados) também se mantiveram constantes.

Os dados das porcentagens de água nas fezes, característica do efeito laxativo, obtido com o emprego dos diferentes tratamentos estão apresentados na figura 11.

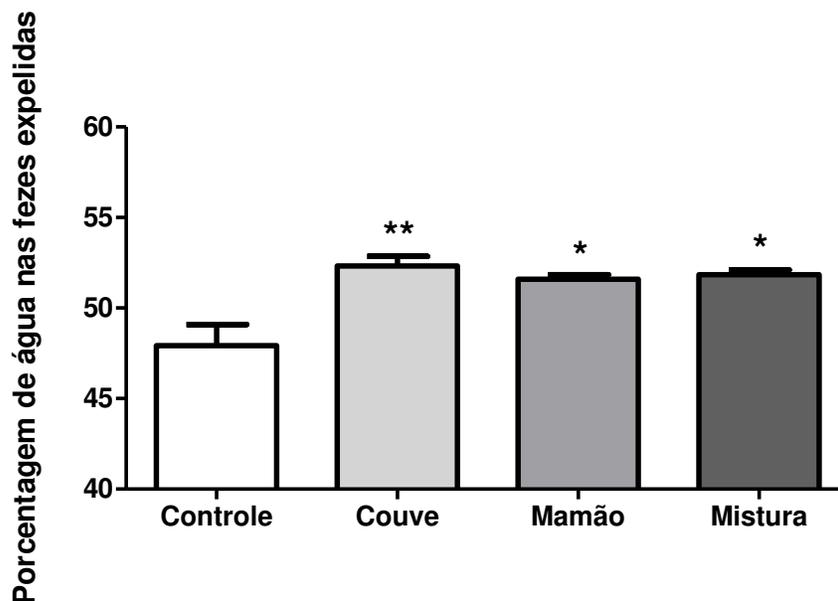


Figura 11. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na porcentagem de água encontrada nas fezes coletadas durante o tratamento (n=6). *P < 0,05 e **P < 0,01 versus grupo controle.

A figura mostrou que os grupos suplementados com mamão e com a mistura de mamão/ couve apresentaram aumento significativo na porcentagem de água nas fezes coletadas durante o período de administração dos vegetais, em relação ao grupo controle (*P < 0,05) sendo que esse aumento foi ainda maior para o grupo de animais tratados apenas com couve (*P < 0,01 versus grupo controle).

Em relação ao efeito da suplementação com vegetais sobre a microbiota intestinal de ratos saudáveis, não foram observadas alterações no número de colônias, tanto de bactérias aeróbicas quanto de lactobacilos, do conteúdo fecal do cólon de ratos tratados em relação ao número de colônias existentes no intestino dos animais pertencentes ao grupo controle (dados não mostrados). Porém, em relação às enterobactérias, animais tratados com couve apresentaram aumento no número de colônias das mesmas ($P < 0,05$), em relação aos animais do grupo controle; já os animais tratados com a mistura de couve e mamão apresentaram diminuição das mesmas em relação ao grupo controle ($P < 0,001$), como se pode observar na figura 12.

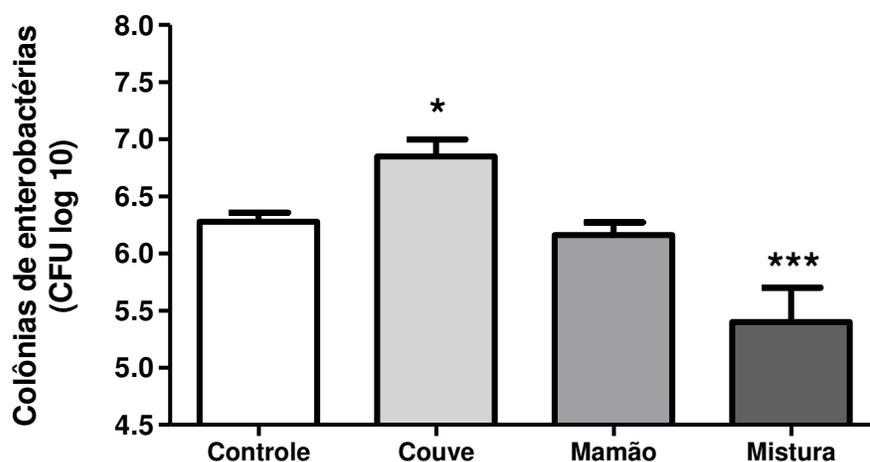
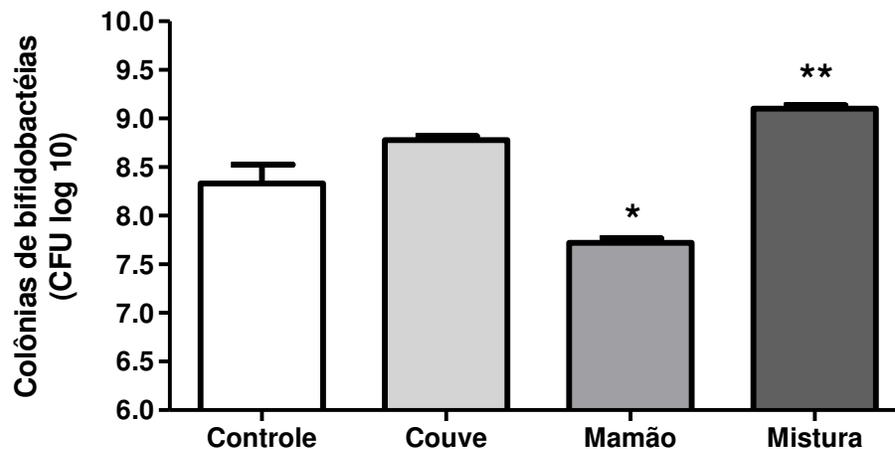


Figura 12. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na contagem de colônias de enterobactérias do conteúdo fecal do cólon de ratos saudáveis ($n=6$). Dados expressos em CFU log 10. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ versus grupo não tratado.

Além disso, observou-se também que o grupo de animais tratados com mamão não mostrou diferença significativa no número de colônias de enterobactérias, quando o mesmo foi analisado comparativamente com aquele obtido para animais do grupo controle.

A figura 13 mostra o efeito dos tratamentos com os vegetais secos e triturados sobre o número de colônias de bifidobactérias do cólon de ratos saudáveis.



13. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na contagem de colônias de bifidobactérias do conteúdo fecal do cólon de ratos saudáveis (n=6). Dados expressos em CFU log 10. *P < 0,05 e **P < 0,01 versus grupo não tratado.

A análise da figura mostrou que não houve mudança significativa no número de colônias de bifidobactérias no intestino dos animais do grupo tratado com couve, quando comparado ao dos animais do grupo controle; já os animais tratados com mamão apresentaram diminuição no número de colônias dessas bactérias (P < 0,05); em contrapartida, o intestino dos animais tratados com a mistura de ambos vegetais mostrou aumento no número de colônias das mesmas (P < 0,01), quando comparado ao dos animais do grupo controle.

Já em relação ao número de colônias de bactérias do ceco, assim como aquelas do cólon, a suplementação com os vegetais secos não alterou o número das colônias de bactérias aeróbicas (dados não mostrados). A figura 14 mostra os resultados obtidos com a contagem de colônias de enterobactérias no intestino de animais tratados ou não com os vegetais separadamente ou em mistura.

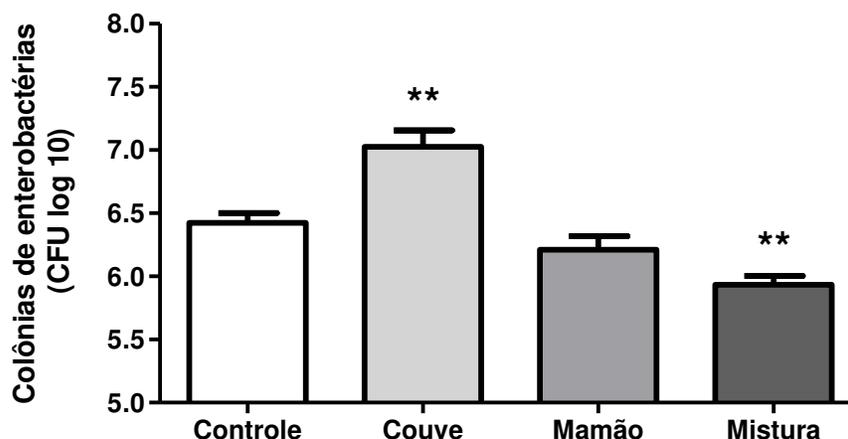


Figura 14. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na contagem de colônias de enterobactérias do conteúdo fecal do ceco de ratos saudáveis (n=6). Dados expressos em CFU log 10. **P < 0,01 versus grupo não tratado.

É possível observar, na figura 14, que houve aumento no número de colônias de enterobactérias no conteúdo fecal do ceco do grupo de animais tratados com couve ($P < 0,01$), enquanto que este número diminuiu no grupo de animais tratados com a mistura dos dois vegetais ($P < 0,01$), quando ambos foram analisados em relação aos animais do grupo controle.

Um resumo dos resultados obtidos quando colônias de lactobacilos foram avaliadas no ceco de animais tratados ou não com os vegetais é apresentado na figura 15.

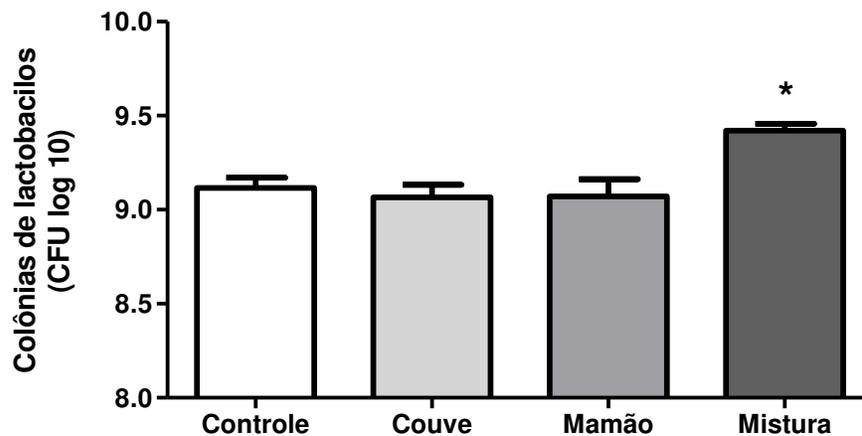


Figura 15. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de animal) na contagem de colônias de lactobacilos do conteúdo fecal do ceco de ratos saudáveis (n=6). Dados expressos em CFU log 10. *P < 0,05 versus grupo não tratado.

A suplementação com couve ou com mamão, separados, não modificou de forma significativa o número de colônias de lactobacilos, enquanto que o grupo de animais tratados com a mistura de ambos vegetais apresentou aumento significativo (P < 0,05) no número de colônias destas bactérias no conteúdo fecal do ceco, em relação ao número de colônias das mesmas dos animais do grupo controle não tratado.

Do mesmo modo, a figura 16 agrupa os resultados dos tratamentos sobre as colônias de bifidobactérias.

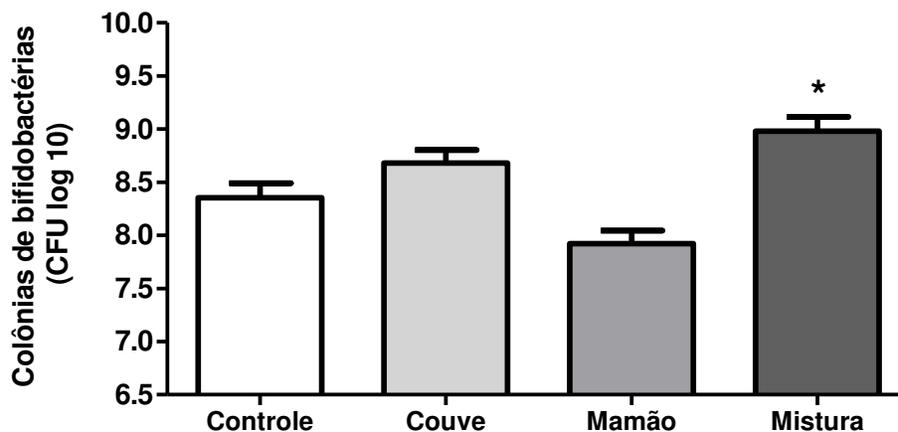


Figura 16. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na contagem de colônias de bifidobactéria do conteúdo fecal do ceco de ratos saudáveis (n=6). Dados expressos em CFU log 10. *P < 0,05 versus grupo não tratado.

Observou-se que o número de colônias de bifidobactérias do ceco de ratos saudáveis, utilizadas neste estudo, só foi modificado com o tratamento composto pela mistura de ambos vegetais, ou seja, somente a mistura foi capaz de aumentar de modo significativo este número, quando comparado ao conteúdo fecal do ceco dos animais do grupo controle não tratado (P < 0,05).

Nenhum dos grupos de animais saudáveis e suplementados com vegetais secos e moídos apresentou variação significativa em relação à quantidade de AGCC (acetato, propionato e butirato) no conteúdo fecal de ambos os segmentos intestinais estudados, cólon e ceco (resultados não mostrados).

3. Avaliação da Atividade Antiinflamatória dos Tratamentos com Vegetais Secos sobre Ratos com Colite Induzida por TNBS

A figura 17 mostra a evolução do peso corporal dos animais colícticos e não colícticos, com ou sem tratamento, no período do estudo. Os dados mostrados na figura representam a diferença do peso, em porcentagem, em relação ao primeiro dia de tratamento.

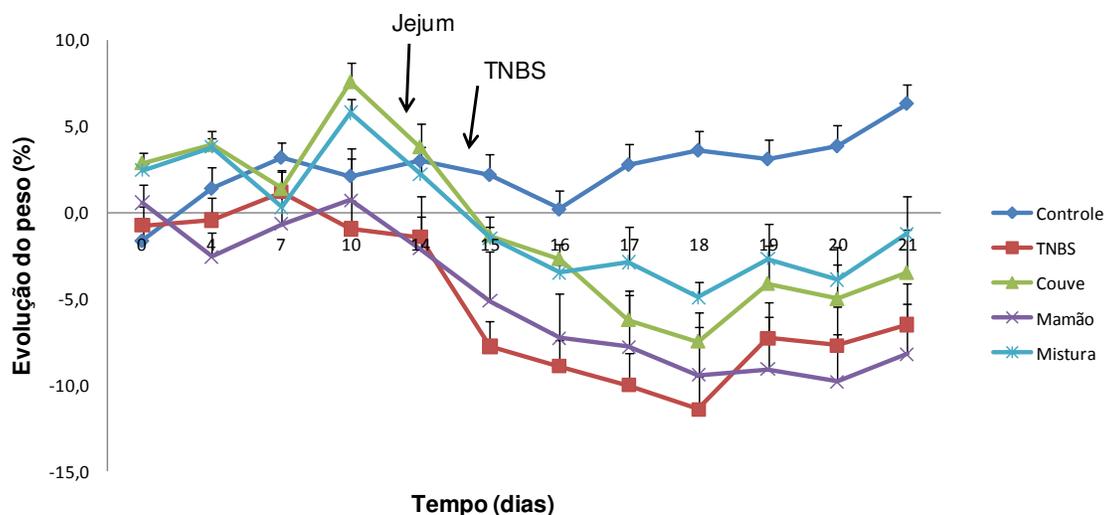


Figura 17. Análise ponderal (porcentagem em relação ao dia anterior ao início do tratamento) de ratos Wistar não colícticos e colícticos, tratados e não tratados com os vegetais (n=6).

Durante os 14 primeiros dias que antecederam a indução de colite experimental induzida por TNBS, nenhum dos grupos de ratos pré-tratados oralmente com os vegetais, administrados uma vez ao dia, na dose de 500 mg/kg de peso de animal, apresentou diferença em relação ao peso corporal. Depois da indução da colite, a evolução do processo inflamatório intestinal durante a semana seguinte se caracterizou pela diminuição de peso corporal dos animais, em relação ao grupo controle.

A figura 18 apresenta resultados mais detalhados em relação análise ponderal (apresentados em porcentagem, em relação ao primeiro dia de tratamento) do 4º dia após a indução de colite experimental induzida por TNBS, sendo que neste dia os animais enfermos apresentaram maior perda de peso.

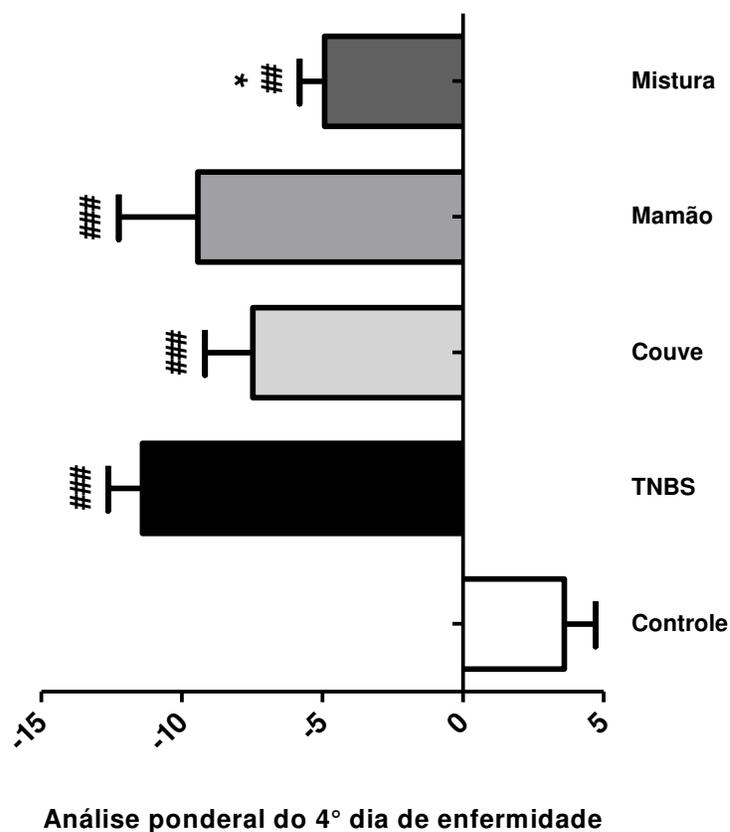
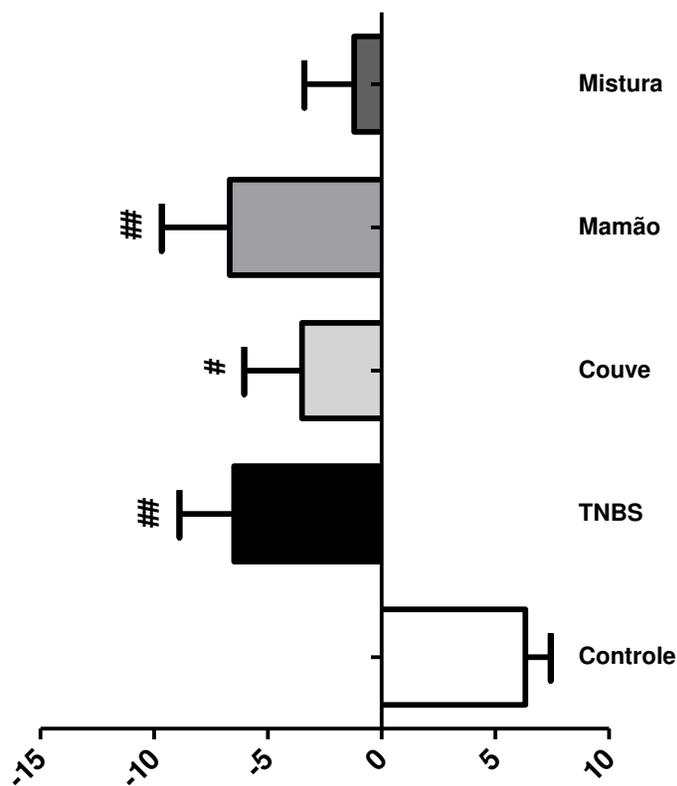


Figura 18. Análise ponderal (porcentagem em relação ao dia anterior ao início do tratamento) de ratos Wistar não colícticos e colícticos, tratados e não tratados com os vegetais no 4º dia após a indução de colite experimental por TNBS (n=6). ##P < 0,01 e ###P < 0,001 versus grupo controle; *P < 0,05 versus grupo controle TNBS.

Observa-se que a inflamação induzida pelo TNBS provocou perda de peso nos animais enfermos, como se pode observar em todos os grupos de animais que recebeu a instilação intrarectal do apteno. Porém, os animais pertencentes ao grupo que foram tratados

com mistura dos vegetais apresentaram menor queda de peso em relação aos animais do grupo controle TNBS ($P < 0,05$).

Os resultados da análise ponderal dos animais colícticos e não colícticos, com ou sem tratamento, referente ao último dia de tratamento (21° dia) estão apresentados na figura 19.



Análise ponderal do 21° dia de enfermidade

Figura 19. Análise ponderal de ratos Wistar (porcentagem em relação ao dia anterior ao início do tratamento) não colícticos e colícticos, tratados e não tratados com os vegetais no 21° dia após a indução de colite experimental por TNBS ($n=6$). # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ versus grupo controle.

No 7° dia após a indução da colite experimental por TNBS, os animais enfermos apresentaram menor diferença de peso em relação ao grupo de animais controle comparado com o 4° dia da enfermidade, e sendo que não houve diferença significativa em relação ao grupo de animais tratados com a mistura em relação ao grupo controle.

Como mostra a figura 20, nenhum dos grupos de animais tratados com os vegetais apresentou diferença de consumo de ração nos 14 dias que precederam a indução de colite experimental por TNBS.

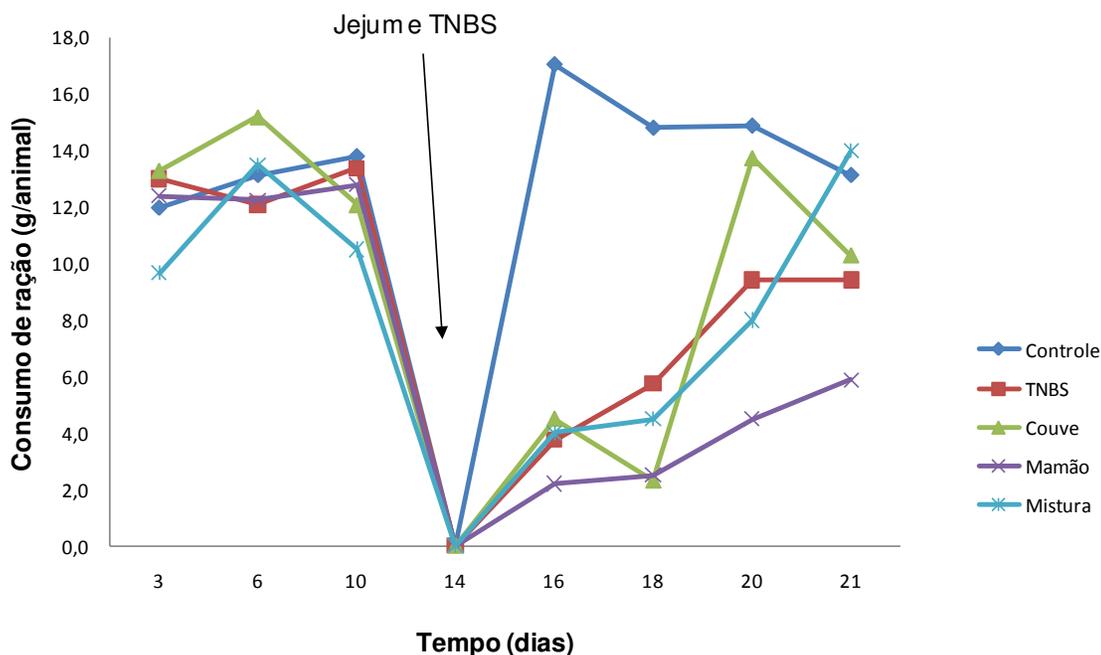


Figura 20. Consumo de ração (g) pelos ratos Wistar não colícticos e colícticos, tratados e não tratados com os vegetais, durante os 21 dias de estudo (n=6).

Observou-se que, como consequência da instalação do processo inflamatório, todos os grupos que receberam instilação intrarretal de TNBS apresentaram diminuição no consumo de ração de até 80% no dia seguinte ao da indução da enfermidade, seguido de aumento gradativo do mesmo ao longo dos dias. A anorexia sofrida pelos animais devido a diminuição do consumo de ração pode ter sido responsável pela perda de peso dos mesmos. Outro fator que também contribuiu para perda de peso dos animais enfermos foi a presença de diarreia, já evidenciada no primeiro dia após administração do TNBS; 100% dos animais colícticos apresentaram diarreia que se manteve até o terceiro dia após a indução da colite (dados não mostrados) e nenhum dos tratamentos modificou a porcentagem de animais com diarreia.

Todos os animais que sofreram o processo de indução de colite experimental também apresentaram prostração, piloereção e hipomotilidade.

Transcorridos 7 dias, os animais foram sacrificados e os danos macroscópicos do cólon, gerados pela administração de TNBS, foram avaliados. Os resultados podem ser melhores observados na figura 21.

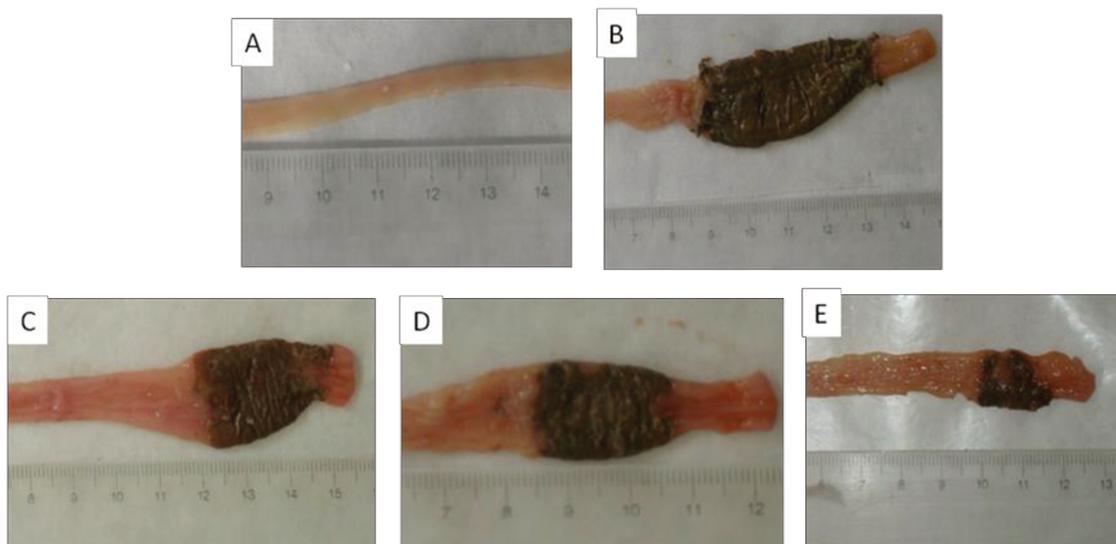


Figura 21. Fotos do cólon de ratos Wistar não-colítico ou colíticos, tratados e não tratados com vegetais mostrando lesões macroscópicas causada pela inflamação induzida pelo TNBS e a ação dos vegetais sobre o processo inflamatório. (A) Grupo Controle mostrando aspecto de cólon normal; (B) grupo controle com colite induzida por TNBS mostrando grande área com severa ulceração, inflamação, processo de necrose e engrossamento da parede intestinal; (C e D) grupo com colite induzida por TNBS e tratados com couve (C) e mamão (D) mostrando também grande área com severa ulceração, inflamação, processo de necrose e engrossamento da parede intestinal; (E) grupo com colite induzida por TNBS e tratados com a mistura de couve e mamão mostrando recuperação da inflamação com menor área de ulceração/inflamação/necrose e menor engrossamento da parede intestinal.

A análise macroscópica do cólon mostrou a presença de congestão da mucosa, erosão e ulcerações hemorrágicas, além de necrose, como consequência do processo inflamatório. A parede intestinal dos animais enfermos se apresentou mais grossa e mais curta conseqüentemente, a relação peso/comprimento deste órgão aumentou em todos os

grupos que receberam TNBS quando comparado a do grupo controle (dados não mostrados).

Na tabela 5 estão agrupados os resultados morfológicos obtidos na análise das lesões colíticas em animais tratados com os vegetais separadamente ou com a mistura, em relação aos animais colíticos.

Tabela 5. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) sobre a porcentagem de aderência, comprimento da lesão do cólon e escore macroscópico da lesão induzida por TNBS em ratos (n=6).

Grupo	Aderência (%)	Comprimento da lesão (cm)	Escore macroscópico da Lesão (0-10)
Controle	0	0,0±0,0	0,0 (0-0)
TNBS	62,5	4,9±0,5	7,5 (6,5-10)
Couve	62,5	4,6±0,6	7,5 (7-8)
Mamão	62,5	3,7±0,5	7,5 (5,5-9)
Mistura	12,5	3,4±0,3*	6,0 (5,5-7)*

Dados expressos em média ± erro padrão, com exceção aos dados de aderência que estão expressos em porcentagem.

*P < 0,05 versus grupo controle TNBS.

Como observado na tabela 5, os grupos tratados com couve e com mamão não apresentaram diminuição no comprimento da lesão causada pelo TNBS, enquanto o grupo tratado com a mistura dos dois vegetais apresentou menor comprimento da lesão em comparação aquela dos animais do grupo controle TNBS (P < 0,05). Os animais dos grupos controle TNBS e dos grupos tratados com os vegetais isolados apresentaram alto escore macroscópico de lesão, enquanto que aqueles do grupo tratado com a mistura de ambos vegetais apresentaram um escore de lesões diminuído em relação aqueles do grupo controle TNBS (P < 0,05, versus grupo controle TNBS). Além disso, essa melhora apresentada pelos ratos tratados com a mistura de couve e mamão foi acompanhada de uma diminuição

de cinco vezes na porcentagem de aderência do intestino aos órgãos adjacentes, em comparação à aderência apresentada pelos animais não tratados.

O efeito antiinflamatório intestinal exercido pela combinação dos vegetais couve e mamão foi confirmado pelos resultados do estudo histológico, como se pode observar na figura 22.

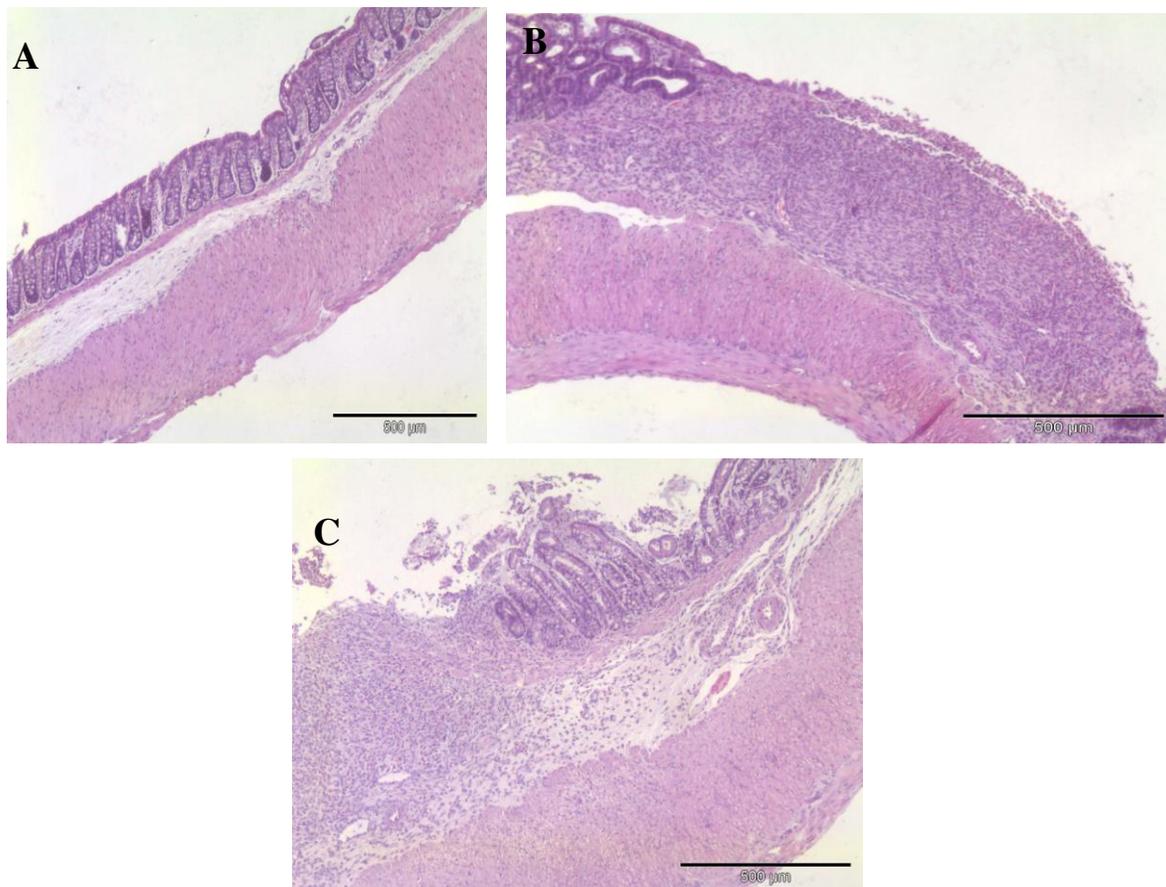


Figura 22. Seções histológicas da mucosa do cólon de ratos Wistar não-colíticos e colíticos, coradas com hematoxilina-eosina, na ausência ou presença do tratamento com a mistura de couve e mamão. (A) Grupo Controle mostrando histologia normal do cólon; (B) grupo controle com colite induzida por TNBS mostrando severa ulceração e inflamação envolvendo todas as camadas da parede intestinal; (C) grupo colítico tratado com a mistura de couve e mamão com recuperação do processo inflamatório.

A avaliação do escore histológico das amostras de tecido do cólon dos animais do grupo controle TNBS revelou extensa ulceração e inflamação envolvendo todas as camadas do intestino. Estes segmentos foram caracterizados por infiltração difusa de leucócitos,

composta principalmente por neutrófilos na camada da mucosa, e por linfócitos e histiócitos na submucosa. A maioria dos animais mostrou ulceração no epitélio da mucosa afetando mais que 75% da superfície. O processo inflamatório foi acompanhado de hiperplasia de cripta, além de dilatação e diminuição de células caliciformes. A análise histológica das amostras do cólon de ratos colíticos tratados com couve ou com mamão não mostraram recuperação significativa da lesão do tecido, com redução moderada na extensão da área ulcerada, uma vez que a mesma sempre foi superior a 50% (dados não mostrados). Entretanto, as amostras de cólon obtidas de ratos colíticos, tratados com a mistura de couve e mamão, mostraram recuperação mais acentuada na arquitetura intestinal quando comparadas àquelas obtidas de animais do grupo controle TNBS. Deste modo, a maioria das amostras mostrou restauração parcial da camada de células epiteliais, normalmente afetando menos que 50% da superfície, em contraste com a extensiva ulceração observada nos animais do grupo controle TNBS. A depleção de células caliciformes foi menos severa e assim, estas se mostraram novamente preenchidas com seu conteúdo de mucina; também foram observadas criptas não dilatadas. A melhora do quadro histológico do cólon foi acompanhada por redução da infiltrado inflamatório principalmente na submucosa, apesar dos neutrófilos serem o tipo celular predominante na região.

O escore microscópico das lesões colíticas está apresentado, a seguir, na tabela 6.

Tabela 6. Efeito dos tratamentos com vegetais secos sobre o escore microscópico da lesão do cólon de ratos com colite induzida por TNBS (n=6).

Grupos	Lesão microscópica
Controle	0 (0-0)
TNBS	25 (23-29)
Couve	20 (13-26)
Mamão	23,5 (15-26)
Mistura	18 (13-22) *

Dados expressos em mediana (range, 0-59). A escala do escore seguiu o critério de Stucchi (2000), porém com algumas modificações. *P < 0,05 versus grupo controle TNBS.

Pode-se observar que somente o grupo de animais tratados com a mistura de ambos vegetais apresentou significativa diminuição do escore microscópico em relação ao grupo controle TNBS, o que corrobora com os resultados de escore macroscópico.

3.1. Estudo Dos Parâmetros Bioquímicos

A figura 23 resume os resultados da quantificação dos níveis de glutathiona total do cólon de ratos colíticos e não colíticos, tratados e não tratados.

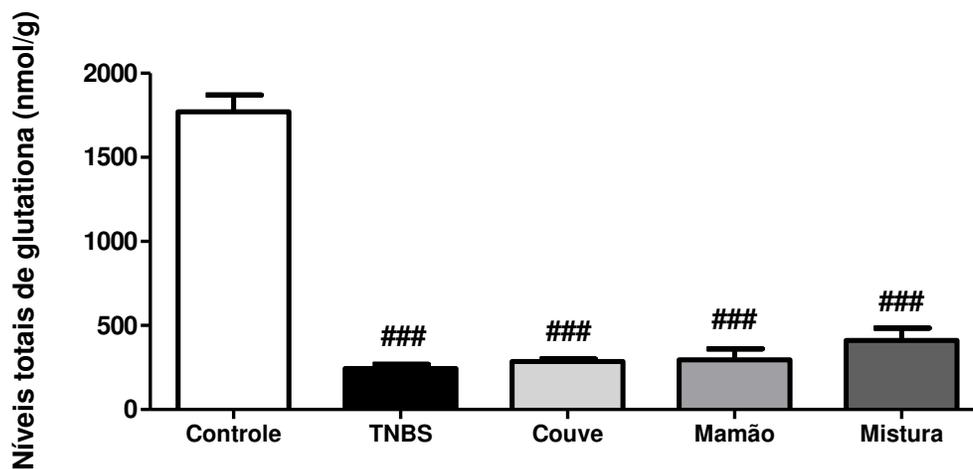


Figura 23. Efeito do tratamento com couve, mamão e com mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) sobre os níveis totais de glutathiona no cólon de ratos com colite induzida por TNBS (n=6). ###P < 0,001 versus grupo controle.

A colite experimental induzida por TNBS foi responsável pela depleção do índice de glutathiona total do tecido do cólon de ratos (P < 0,001 versus grupo controle); porém, nenhum dos tratamentos utilizados neste estudo foi capaz de restaurar os níveis normais de glutathiona total do tecido do cólon inflamado.

A figura 24 mostra os efeitos do TNBS na ausência e presença dos tratamentos sobre a atividade da enzima mieloperoxidase.

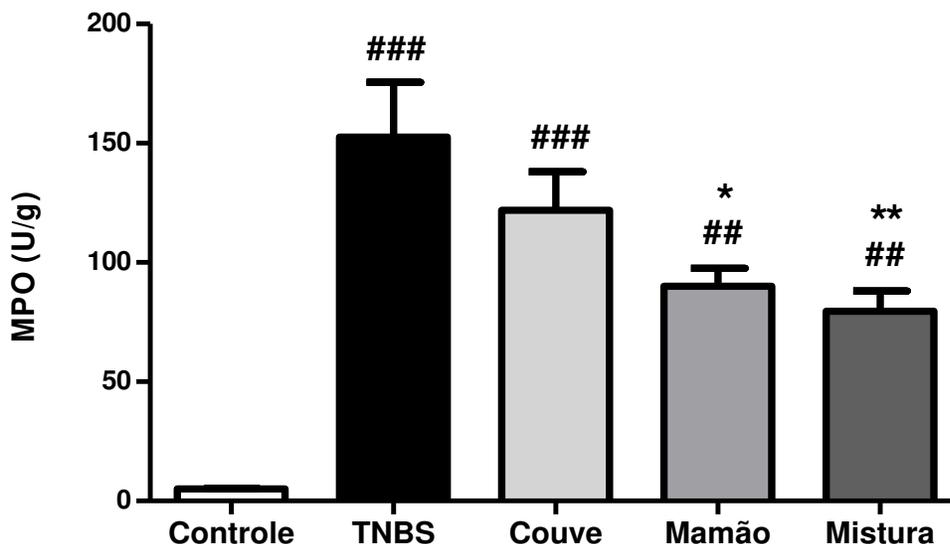


Figura 24. Efeito do tratamento com couve, mamão e com mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) sobre a atividade da MPO no cólon de ratos com colite induzida por TNBS (n=6). ##P < 0,01 e ###P < 0,001 versus grupo controle; *P < 0,05 e **P < 0,01 versus grupo controle TNBS.

A instilação intrarectal de TNBS foi responsável pelo aumento na atividade da enzima mieloperoxidase ($P < 0,001$ versus grupo controle) no cólon de ratos Wistar. A couve, quando administrada isoladamente, não afetou a atividade desta enzima; porém, os grupos de animais tratados com mamão e com a mistura de couve e mamão apresentaram diminuição na atividade dessa enzima em relação àquela encontrada para os animais do grupo controle TNBS ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente).

Os efeitos do TNBS e dos tratamentos sobre a síntese de TNF α foram analisados e encontram-se expressos na figura 25.

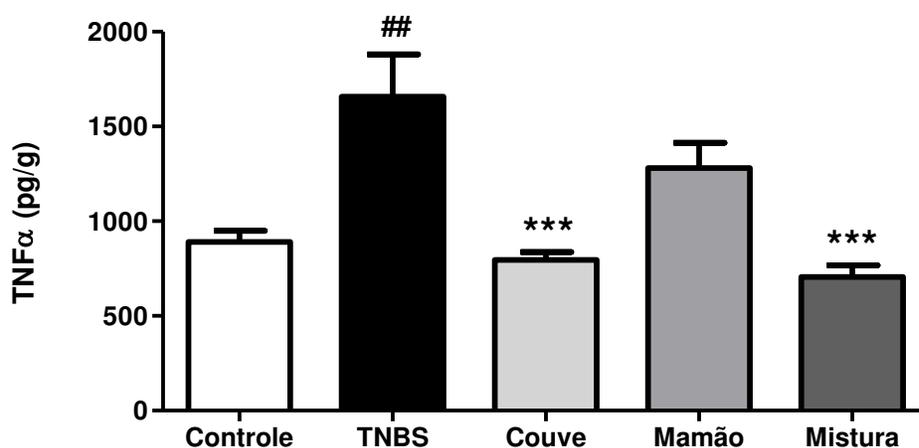


Figura 25. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) sobre síntese de TNF α no tecido do cólon de ratos com colite induzida por TNBS (n=6). ##P < 0,01 versus grupo controle; e ***P < 0,01 versus grupo controle TNBS.

A colite experimental induzida por TNBS foi responsável por um aumento dos níveis de TNF α (P < 0,01 versus grupo controle) no tecido do cólon de ratos. Os grupos de animais tratados com couve e também com a mistura de vegetais restauraram os níveis de TNF α para valores próximos aos normais (P < 0,001 versus grupo TNBS). Os animais do grupo tratado com mamão não apresentaram diferenças significativas nos níveis de TNF α em relação àqueles pertencentes ao grupo controle TNBS.

Outra citocina que se apresentou aumentada no tecido do cólon de ratos submetidos à indução experimental de colite por TNBS foi a IL-1 β ($P < 0,001$ versus grupo controle), como podemos observar na figura 26.

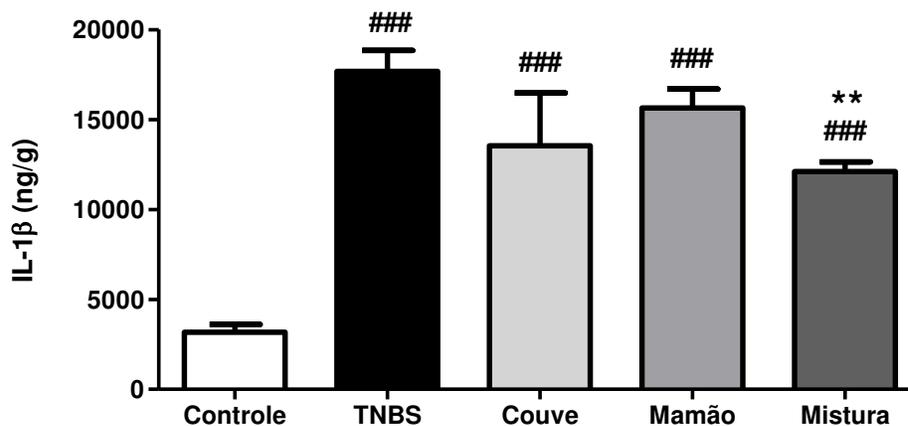


Figura 26. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) sobre síntese de IL-1 β no tecido do cólon de ratos com colite induzida por TNBS (n=6). ### $P < 0,01$ versus grupo controle; e ** $P < 0,001$ versus grupo controle TNBS.

A administração de couve ou mamão, isoladamente, não alterou os níveis desta interleucina no cólon de ratos colíticos. Somente o tratamento com a mistura de vegetais foi capaz de reduzir, de modo estatisticamente significativo, os níveis da citocina analisada quando os resultados foram comparados àqueles obtidos pra os animais do grupo controle TNBS ($P < 0,01$).

A figura 27 mostra os efeitos do TNBS, na ausência e presença dos tratamentos, sobre a expressão de iNOS e COX-2 no tecido do cólon de ratos.

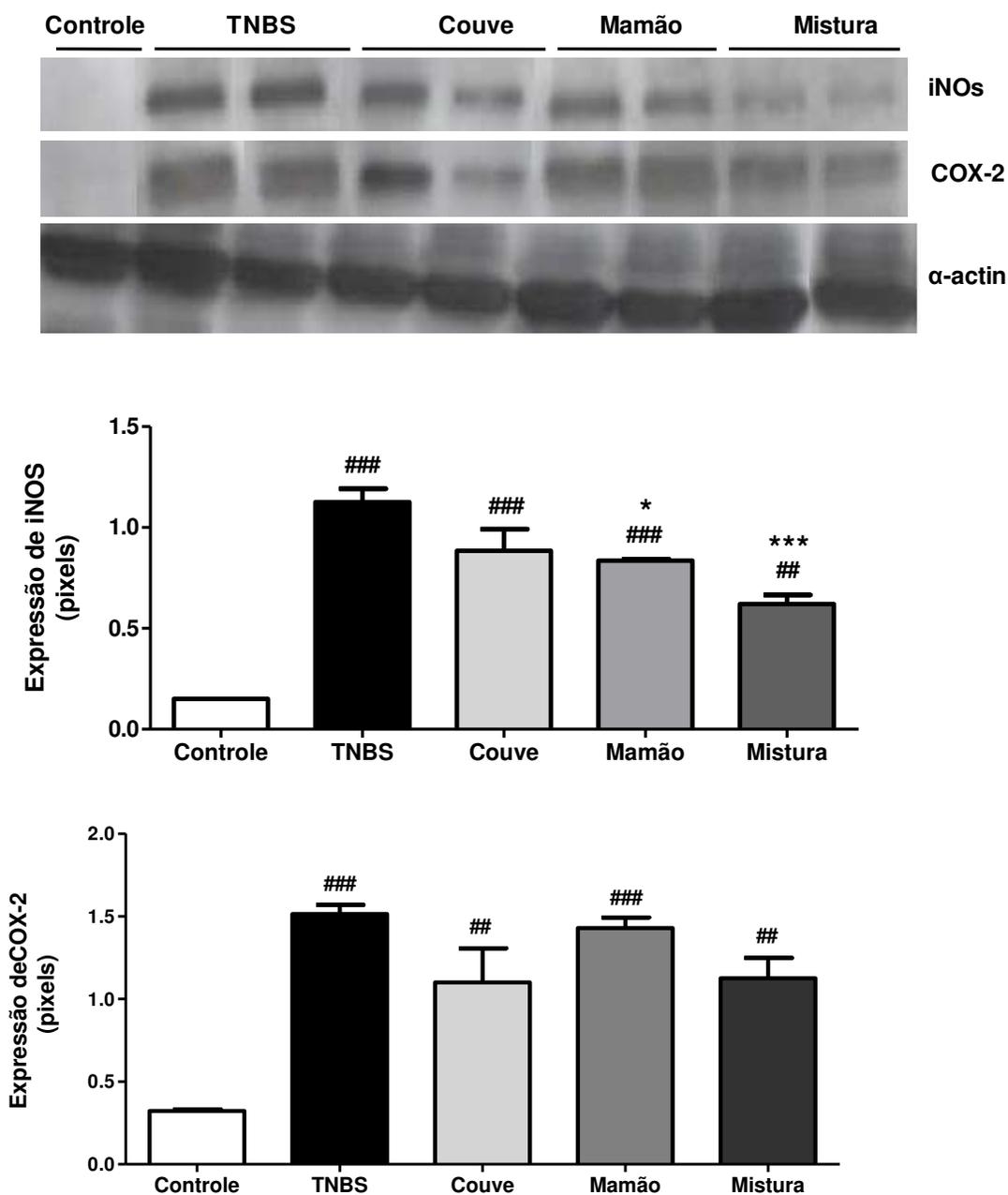


Figura 27. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) sobre a expressão de iNOS e COX-2 no tecido do cólon de ratos com colite induzida por TNBS, mediante Western blot (n=6). ##P < 0,01 e ###P < 0,001 versus grupo controle; e *P < 0,05 e ***P < 0,001 versus grupo controle TNBS.

A indução de colite por TNBS foi caracterizada por aumento na expressão tanto de iNOS quanto de COX-2 no cólon de ratos colíticos, quando comparado ao grupo controle, este aumento foi observado em todos os grupos que receberam instilação intrarectal de TNBS, como pode ser observado na figura 27. O tratamento de ratos enfermos com couve não alterou a expressão de iNOS quando comparada com os animais do grupo controle TNBS; porém o tratamento das ratos colíticos tanto com mamão quanto com mistura de couve e mamão, na proporção 3:2, respectivamente, foi responsável por diminuição significativa na expressão de iNOS ($P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente, versus controle TNBS) no cólon. Porém, nenhum tratamento foi capaz de diminuir a expressão de COX-2 no cólon de ratos com colite induzida por TNBS.

3.2. Manipulação da Microbiota Intestinal em Ratos com Colite Induzida por TNBS

A microbiota intestinal foi quantificada em ratos com colite experimental e os resultados referentes às colônias de bifidobactérias mostram que a inflamação intestinal proveniente da instilação intrarretal de TNBS não alterou o número de colônias de bifidobactérias (dados não mostrados).

No entanto, a inflamação intestinal foi acompanhada de diminuição no número de colônias de lactobacilos ($P < 0,05$ versus grupo controle), como mostra a figura 28.

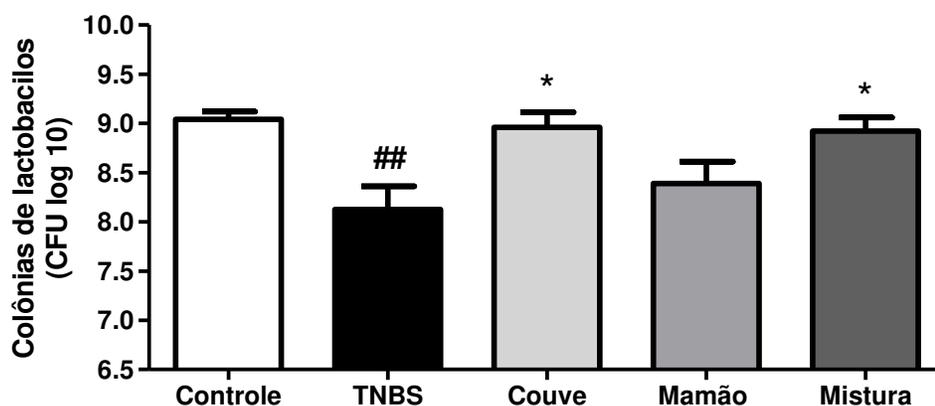


Figura 28. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na contagem de colônias de lactobacilos do conteúdo fecal do cólon de ratos com colite induzida por TNBS (n=6). Dados expressos em CFU log 10. ### $P < 0,01$ versus grupo controle; e * $P < 0,05$ versus grupo controle TNBS.

Os grupos de animais tratados com mamão não apresentaram alteração no número de colônias dessas bactérias em relação àquelas avaliadas em animais do grupo controle TNBS. Já os grupos de animais tratados com couve e com mistura de couve e mamão mostraram um número maior de colônias de lactobacilos com $P < 0,05$, sempre comparados ao dos animais do grupo controle TNBS.

O número de colônias de bactérias aeróbias presentes no conteúdo fecal do cólon de ratos não colíticos e colíticos, na ausência ou presença de tratamento com os vegetais, foi determinado e os resultados estão apresentados na figura 29.

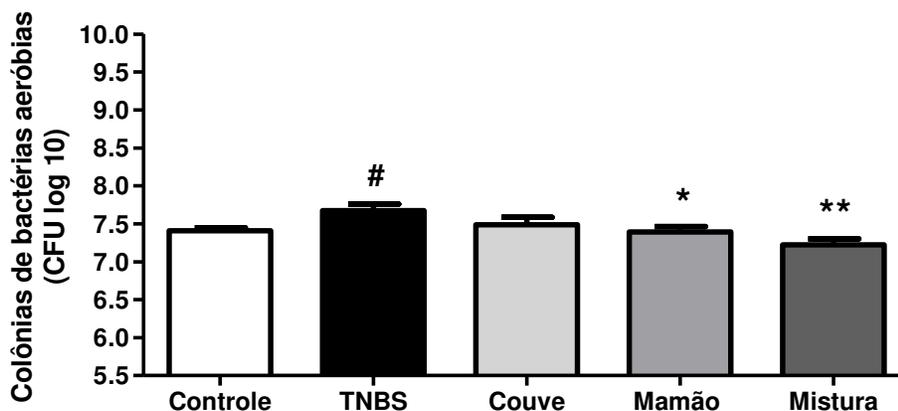


Figura 29. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na contagem de colônias de bactérias aeróbias do conteúdo fecal do cólon de ratos com colite induzida por TNBS (n=6). Dados expressos em CFU log 10. #P < 0,05 versus grupo controle; e *P < 0,05 e **P < 0,01 versus grupo controle TNBS.

O processo inflamatório frente ao TNBS aumentou de modo estatisticamente significativo o número de colônias de bactérias aeróbicas (P < 0,05) em comparação ao grupo controle; porém, o conteúdo fecal dos animais tratados com mamão e com a mistura de vegetais apresentou diminuição no número de colônias de bactérias aeróbias, em comparação com aqueles obtidos para os animais do grupo controle TNBS (P < 0,05 e P < 0,01, respectivamente).

Na figura 30 estão apresentados os resultados da quantificação das colônias de enterobactérias provenientes do conteúdo fecal do cólon de ratos colíticos e não colíticos, tratados ou não tratados com os vegetais.

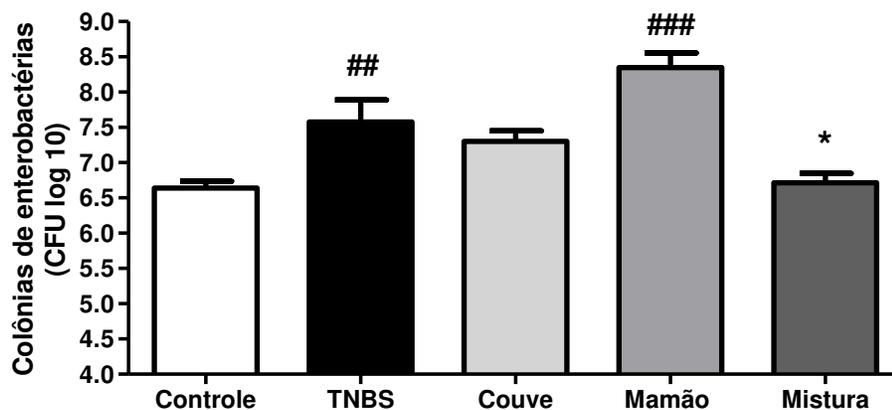


Figura 30. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na contagem de colônias de enterobactérias do conteúdo fecal do cólon de ratos com colite induzida por TNBS (n=6). Dados expressos em CFU log 10. ##P < 0,01 e ###P < 0,001 versus grupo controle; e *P < 0,05 versus grupo controle TNBS.

O processo inflamatório proveniente da indução da colite experimental por TNBS aumentou o número de colônias de enterobactérias, como podemos observar no grupo controle TNBS e também no grupo tratado com mamão, quando comparado àqueles do grupo controle (P < 0,05 e P < 0,001, respectivamente); entretanto, o grupo de animais tratados com a mistura apresentou diminuição do número das mesmas (P < 0,05) em relação ao grupo controle TNBS.

Na figura 31 está apresentado um resumo dos resultados obtidos quando a relação do número de colônias de bactérias benéficas (lactobacilos e bifidobactérias)/bactérias potencialmente patogênicas (aeróbicas e enterobactérias) avaliadas no conteúdo fecal do cólon de animais colícticos e não colícticos, na ausência ou presença de tratamento com os vegetais.

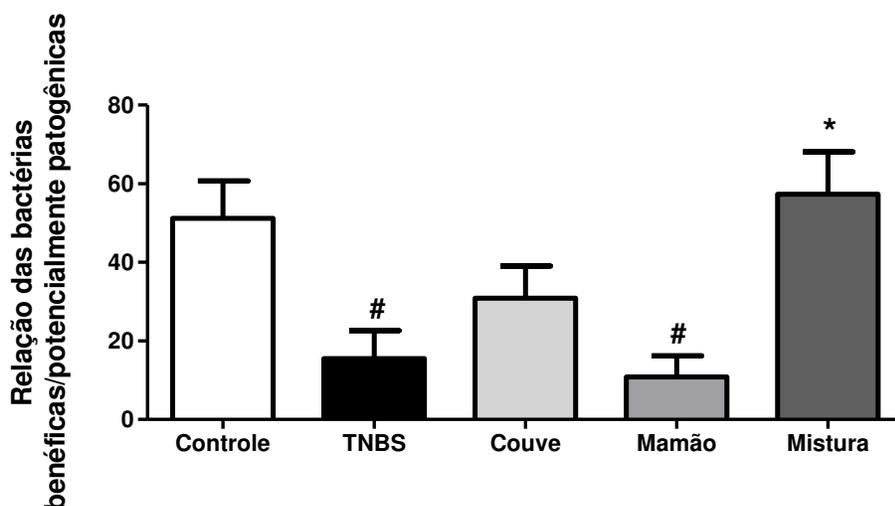


Figura 31. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) na relação do número de colônias de bactérias benéficas (lactobacilos e bifidobactérias)/bactérias potencialmente patogênicas (aeróbicas e enterobactérias) (n=6). #P < 0,05 versus grupo Controle; e *P < 0,05 versus grupo controle TNBS.

Observa-se que a inflamação induzida pelo TNBS diminuiu a relação do número de colônias de bactérias benéficas/bactérias potencialmente patogênicas do conteúdo fecal do cólon de ratos enfermos, como foi observado nos animais dos grupos controle TNBS e tratado com mamão (P < 0,05), em relação ao grupo controle. Os animais do grupo tratado com a mistura de couve e mamão apresentaram significativo aumento desta relação de bactérias quando comparados aos níveis dos animais do grupo controle TNBS (P < 0,05).

A tabela 7 mostra o efeito da instilação intrarectal de TNBS em ratos Wistar na produção dos AGCC acetato, propionato e butirato.

Tabela 7. Efeito do tratamento com couve, mamão e da mistura de ambos vegetais (500 mg/kg de peso de animal) sobre a produção de AGCC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) no conteúdo luminal do cólon e cego de ratos Wistar com colite ulcerativa induzida por TNBS (n=6).

Grupo	Acetato	Propionato	Butirato	Total
Controle	25,1±2,7	9,4±0,7	6,9±0,8	42,±4,5
Controle-TNBS	8,4±1,3 ^{###}	4,2±0,6 ^{###}	3,7±0,5 ^{###}	16,1±3,0 ^{###}
Couve	11,1±1,6 ^{###}	3,9±0,5 ^{###}	2,7±0,5 ^{###}	17,3±3,0 ^{###}
Mamão	6,8±0,8 ^{###}	3,2±0,5 ^{###}	1,8±0,2 ^{###}	11,3±1,5 ^{###}
Mistura	12,0±1,4 ^{###}	4,2±0,6 ^{###}	1,8±0,2 ^{###}	16,9±2,0 ^{###}

Todos os grupos diferem significativamente do grupo controle ($P < 0,01$, dados não mostrados).

^{###} $P < 0,01$ e ^{###} $P < 0,001$ versus grupo controle.

A instilação de TNBS foi seguida de depleção da produção dos três AGCC estudados (acetato, propionato e butirato), assim como de depleção da soma dos três ácidos graxos juntos, no conteúdo fecal do cólon dos ratos enfermos, quando comparadas aos ratos pertencentes ao grupo que não recebeu a instilação de TNBS. Não houve tratamento capaz de restaurar a produção de nenhum dos três AGCC.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, uma estreita correlação entre nutrição e saúde tem sido estabelecida e o conhecimento sobre o papel de certos alimentos (ou de alguns de seus componentes) na melhora da saúde e/ou na redução de riscos de doenças crônicas tem ido além do valor estritamente nutritivo dos mesmos. Essa idéia tem contribuído para o desenvolvimento de um novo conceito de alimentos conhecidos, em geral, como “alimentos funcionais”.

O termo alimentos funcionais não está claramente delimitado, mas Goldeberg (1994) propôs um conceito amplamente aceito: é qualquer alimento que tenha impacto positivo e diferenciado de seu valor nutritivo sobre a saúde do indivíduo. Trata-se de um alimento natural, ou desenvolvido a partir de ingredientes naturais, que se consome como parte da dieta e que desempenha função concreta em processos fisiológicos, tais como melhora dos mecanismos biológicos de defesa frente a agentes nocivos, prevenção de enfermidades ou retardo no envelhecimento.

A idéia original do trabalho com alimentos vegetais do Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Biologia da Unicamp é obter alimento funcional utilizando frutas e verduras, *in natura*, os quais façam parte da dieta usual da população brasileira. O objetivo do grupo é testar estes vegetais na prevenção e/ou tratamento das DII, em animais com colite experimental induzida, ou seja, o grupo nunca teve intenção de utilizar extratos ou substâncias ativas deles isoladas.

1. Produção de AGCC Proveniente da Fermentação dos Vegetais Secos

Os carboidratos, não digeridos pelas enzimas humanas, são comumente fermentados pela microbiota intestinal e produzem AGCC, principalmente, acetato, propionato e butirato. Os AGCC apresentam efeitos benéficos para a saúde, que vão desde efeitos do tipo metabólico ou aumento da absorção de minerais, até a prevenção de câncer de cólon (Scheppach, 1995), com especial interesse para os pacientes de DII, nos quais a incidência de câncer aumenta com relação ao restante da população (Krok e Lichtenstein, 2004). Nos

pacientes com DII, a incidência de câncer colorretal é de 2% em pacientes com 10 anos de evolução de DII, de 9% em pacientes com 20 anos de evolução da enfermidade e a incidência alcança 19% depois de 30 anos de desenvolvimento da inflamação intestinal.

O butirato é o substrato energético das células epiteliais do intestino e parece ter atividade protetora contra carcinogênese no cólon de ratos (Young *et al.*, 1996), provavelmente por sua habilidade de inibir a proliferação de células epiteliais tumorais; estas células se caracterizam por elevada taxa de proliferação associada a uma menor diferenciação em comparação com aquela dos colonócitos normais maduros (Cordon-Cardo e Prives 1999). Em diferentes linhagens celulares de origem tumoral de epitélio do cólon, o butirato tem se mostrado capaz de inibir a proliferação e induzir apoptose (Hinnebusch *et al.*, 2002); também tem sido proposta a propriedade de aumentar a proliferação do epitélio normal do cólon (Gibson *et al.*, 1992). Esta atividade paradoxal, inibidora ou estimulante da proliferação celular, em se tratando de células tumorais ou normais, tem sido definida como “efeito paradoxal do butirato” (Redondo, 2002).

Foi sugerido, ainda, em diferentes estudos, que o butirato tem efeito benéfico sobre a reparação/regeneração produzida após lesão no cólon (Breuer *et al.*, 1991) agindo como antiinflamatório intestinal (Kanauchi *et al.*, 2003), já que estudos *in vitro* têm demonstrado ser o butirato o principal substrato energético dos colonócitos (Ahmad *et al.*, 2000). Grande parte do butirato (aproximadamente 90%) e do propionato (entre 10 e 50%) é metabolizada pela mucosa cólica; alguns autores têm demonstrado que pacientes com colite ulcerativa têm quantidades diminuídas de AGCC nas fezes (Stein *et al.*, 1992; Araki *et al.*, 2002, Marchesi *et al.*, 2007), sugerindo que a restauração dos níveis luminiais de butirato pode facilitar a recuperação da mucosa inflamada (Kanauchi *et al.*, 1998). Enema de AGCC, especialmente butirato, tem sido usado como tratamento para inflamação do intestino, incluindo colite ulcerativa (Wong *et al.*, 2006); porém, o tratamento pode apresentar problemas devido à resistência por parte do paciente em usar este tipo de terapia, além das características organolépticas desagradáveis que caracterizam os AGCC (Patz *et al.*, 1996).

O butirato aumenta a atividade de enzimas antioxidantes, incluindo glutathione redutase, glutathione peroxidase e catalase (Louis *et al.*, 2004), o que proporciona a esse AGCC atividade protetora sobre o dano oxidativo do DNA induzido pelo H₂O₂ (Rosignoli *et al.*, 2001). Este efeito pode ser importante na supressão de mecanismos agressores da

mucosa que são mediados por EROs (Rosignoli *et al.*, 2001), como as DII, já que AGCC, de modo geral, protege as células epiteliais da mucosa contra danos oxidativo (Ren *et al.*, 2001).

Tendo como base essas informações, a quantificação de AGCC no tratamento empregado é de extrema importância, dado que quanto maior for sua produção pela fermentação dos carboidratos não digeridos que chegam ao cólon, maior será a eficiência na recuperação do tecido cólico danificado (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002).

Existem várias técnicas analíticas para identificação e quantificação destes ácidos, como eletroforese capilar (Arellano *et al.*, 1997; Zuriguel *et al.*, 1997), cromatografia líquida de alta eficiência (Stein *et al.*, 1992), cromatografia gasosa (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002), além da cromatografia de íons (CI) (Flickinger *et al.*, 2000). O método de CI, adaptado por nosso grupo (Dias *et al.*, 2009) foi utilizado nesse trabalho, pois o mesmo mostrou-se interessante para quantificar os AGCC, já que utiliza pequenas quantidades de reagente, gerando economia, e utiliza reagentes menos tóxicos que aqueles utilizados pela cromatografia líquida de alta eficiência.

O objetivo dos testes *in vitro*, aqueles que empregaram incubação de bactérias e oxyrase[®] com amostras vegetais, foi selecionar a proporção dos vegetais que produziram maiores quantidades de butirato para utilizá-la nos estudos *in vivo*, empregando animais submetidos à colite experimental induzida por TNBS. Os resultados obtidos indicaram que dentre as combinações empregadas dos vegetais couve e mamão, a amostra que continha a combinação de 0,3 g de couve e 0,2 g de mamão foi a que produziu maior quantidade de butirato e que, portanto, foi utilizada nos experimentos *in vivo*. Para a fibra alimentar apresentar algum efeito farmacológico, não basta que a mesma seja capaz de produzir AGCC. É necessário também que haja combinação de fibras solúveis e insolúveis, para que o alimento percorra todo o sistema digestivo até alcançar o intestino grosso; caso contrário, os AGCC produzidos alcançam apenas o cólon ascendente, como é o caso daqueles produzidos por alimentos que só apresentam fibras solúveis. A importância dessa combinação de fibras consiste no fato de que as colites ocorrem em todo o segmento do cólon e não apenas na sua porção ascendente. Partindo deste pressuposto, a amostra selecionada mostrou ter perfil para compor um alimento funcional já que apresenta tanto fibras dietéticas solúveis quanto insolúveis na sua composição.

2. Modulação da Microbiota Intestinal em Ratos Normais e Ratos com Colite Induzida por TNBS pelo Tratamento com Vegetais Secos

Os tratamentos com a mistura de couve e mamão, assim como com os vegetais isolados, apresentaram efeito benéfico na fisiologia intestinal de ratos saudáveis. Estes tratamentos aumentaram significativamente a porcentagem de água nas fezes expelidas e coletadas nos 14 dias ao longo do experimento. O significado desses achados é que estes vegetais podem facilitar o avanço do conteúdo luminal através do trato gastrointestinal evitando, assim, a possibilidade de prisão de ventre, uma ocorrência comum em países desenvolvidos.

A modulação da microbiota intestinal, com finalidade de melhorar a saúde do indivíduo, vem sendo efetuada empiricamente ao longo de tempo, existindo notícias do emprego de leite fermentado no tratamento de infecções gastrointestinais já no ano 76 a.C. Atualmente, ela é feita através de probióticos, prébióticos e antibióticos; e tem sido associada a inumeráveis efeitos benéficos à saúde humana, como melhora na intolerância a lactose, modulação do sistema imune, redução da hipercolesterolemia, além da proteção frente às enfermidades infecciosas, inflamatórias e alérgicas (Gill, 2003).

Conhecer melhor os microorganismos da microbiota intestinal possibilita o estabelecimento de diferentes ações pelas quais alimentos e microbiota residente podem exercer efeitos benéficos. As principais ações investigadas tem sido: competição com bactérias nocivas, melhora da função barreira, produção de nutrientes importantes para a integridade do epitélio intestinal e imunomodulação.

Existe consenso quanto ao fato de que diferentes espécies pertencentes aos gêneros de lactobacilos e bifidobactérias podem beneficiar o organismo do hospedeiro (Vaughan *et al.*, 2002); o mesmo não ocorre para as enterobactérias e bactérias aeróbias, conhecidas por serem potencialmente patogênicas (Kaplan e Hutkins, 2000). Assim, estudar as bactérias da microbiota intestinal e a proporção das benéficas em relação àquelas potencialmente patogênicas, no conteúdo intestinal de animais tratados com os vegetais, tornou-se fundamental nesse trabalho.

A administração da mistura de couve e mamão se mostrou capaz de modificar a microbiota do cólon em ratos saudáveis, com significante aumento no número de colônias

de bactérias consideradas benéficas para a saúde do hospedeiro, como lactobacilos (apenas no ceco) e bifidobactérias (em ambos os segmentos estudados). Um dado importante é que a mistura empregada também diminuiu uma das bactérias potencialmente patogênica, a enterobactéria, em ambos os segmentos.

Lactobacilos apresentam respostas benéficas ao hospedeiro como inibição no crescimento/proliferação de outros microorganismos indesejáveis, ou seja, função antibiótica com diminuição do pH intestinal. Esse último efeito previne crescimento bacteriano de organismos oportunistas, como *Candida*, *Pseudomonas* e estafilococos, durante o tratamento com antibióticos (Rastall, 2004). Já as bifidobactérias, presentes em grande número no intestino de adultos, são responsáveis pela síntese de vitamina B, inibição do crescimento de outros microorganismos patogênicos, diminuição do pH intestinal e do colesterol, proteção contra infecções intestinais, estimulação da função intestinal, além de melhorar a resposta imune do hospedeiro (Rastall, 2004). Com base nessa teoria e nos resultados apresentados acima, tornou-se possível sugerir que a mistura de couve e mamão tem função prebiótica.

A teoria mais aceita sobre o desenvolvimento das DII, como já foi anteriormente abordada, compreende resposta imunológica exacerbada da microbiota comensal em indivíduos geneticamente suscetíveis (Bamias *et al.*, 2005), hipótese esta observada em diferentes estudos. As inflamações, na maior parte dos estudos, relacionam-se às áreas com maior densidade de bactérias; o uso de antibióticos melhora a inflamação intestinal crônica; além disso, o desvio do fluxo fecal pode prevenir recorrência da DC.

Acredita-se que as bactérias intestinais influam tanto no início quanto na perpetuação das DII, provavelmente devido à existência de desequilíbrio entre as bactérias potencialmente patogênicas e aquelas protetoras (Shanahan 2000 e Podolsky, 2002). Neste sentido, a diminuição na contagem de lactobacilos e bifidobactérias em pacientes com DII, além de aumento de algumas bactérias prejudiciais como a *E. coli* invasivo/aderente (Campieri e Gionchetti, 1999), justificaria o uso das bactérias benéficas para competir com aquelas potencialmente patogênicas como alternativa ao tratamento atual. Em paciente com DII também tem sido observado que as bactérias aderentes, com capacidade de penetrar a mucosa, como *Bacterioides ssp*, *Escherichia coli* e *Enterobacterium* são as mais

abundantes em comparação às aquelas encontradas em indivíduos saudáveis (Swidsinski et al 2002 e Seksik *et al.*, 2003).

No presente estudo, os ratos Wistar com colite induzida por TNBS apresentaram diminuição no número de colônias de lactobacilos e aumento tanto de bactérias aeróbias quanto de enterobactérias; conseqüentemente, a relação bactérias benéficas/bactérias potencialmente patogênicas também se apresentou diminuída. Portanto, a indução de colite por TNBS segue o padrão apresentado pelas DII em humanos, quando ao que se refere à microbiota intestinal.

A hipótese de que a microbiota normal, de algum modo, funcione como modulador da “inflamação fisiológica” tem sido reforçada por algumas observações feitas por Duchmann *et al.* (1999), as quais se referem que as células mononucleares da mucosa de pacientes com DII, mas não do sangue periférico, proliferam quando expostas a bactérias intestinais autólogas. Ao contrário, células da mucosa não afetada, dos mesmos pacientes ou de pacientes em remissão, não proliferam frente à microbiota intestinal autóloga; isto indica que existe perda de resistência durante a inflamação (Duchmann *et al.*, 1995). Provavelmente, a descoberta mais convincente é que a maioria dos animais *germ free* não desenvolve colites (Taurog *et al.*; 1994). Estas observações reforçam o paradigma “sem bactéria não há colite”. A causa de resposta “anormal” frente a bactérias intestinais “normais”, na DII, ainda não está clara, mas se sabe que a DC está associada geneticamente com a mutação do gene NOD2 (*intracellular nucleotide oligomerization domain 2*), cujos produtos são proteínas reconhecedoras de bactérias; isso aponta para uma relação entre inflamação intestinal e reconhecimento bacteriano (Girardin *et al.*, 2003).

Portanto, a associação entre microbiota intestinal e desenvolvimento das DII tem gerado estudos que investigam o potencial terapêutico da alteração de bactérias luminiais. Kato *et al.* (2004) realizaram um trabalho com humanos em que foi usado placebo e leite fermentado com *Bifidobacterium* durante duas semanas em pacientes com RCUI ativa; no estudo em questão, tanto as lesões histológicas, quanto o índice da atividade endoscópica da enfermidade, foram reduzidos em comparação aos dos pacientes do grupo placebo.

Outros estudos têm proposto que numerosos lactobacilos podem alertar o sistema imune intestinal e, secundariamente, favorecer a não instalação de microorganismos infecciosos potencialmente lesivos, o que pode ocorrer devido à produção de

imunoglobulinas específicas do tipo A (Rinne *et al.*, 2005), ou da ativação das células natural killer (NK) (Ogawa *et al.*, 2006). Outros efeitos imunomoduladores destes microorganismos derivam de sua capacidade em incrementar a atividade fagocítica de leucócitos intestinais, além de promover maior proliferação de linfócitos B aumentando imunoglobulinas A e G e estimular a produção da TNF α . Outros probióticos, como *Lactobacillus sakei* e *E coli* não patogênica, tem capacidade de aumentar a produção de citocinas antiinflamatórias como IL-10 e fator de crescimento transformante- β (TGF- β), ao mesmo tempo em que reduz aquelas de caráter inflamatório, por exemplo, TNF- α , INF γ e IL-8 e expressão de iNOS (Morita *et al.* 2002).

Apesar do grande número de estudos, ainda não se conhece com exatidão como a interação dos probióticos com as células linfóides do intestino ocorre, já que estas células são responsáveis por ativar o sistema imune intestinal. Neste sentido, tem sido proposto que os lactobacilos podem modificar a produção de citocinas mediante participação de algum componente de sua parede celular, ainda não totalmente caracterizado (Solis-Pereyra 1997).

Animais colícticos, tratados com a mistura de couve e mamão apresentaram aumento no número de colônias de lactobacilos, assim como diminuição do número de colônias das bactérias potencialmente patogênicas, que são as aeróbias e as enterobactérias, quando comparado ao grupo controle TNBS; como consequência, a relação de bactérias benéficas/potencialmente patogênicas também se mostrou aumentada. Estudos têm demonstrado que o efeito prebiótico é benéfico na prevenção ou melhora dos diferentes sinais e sintomas envolvidos nas DII (Hafer *et al.*, 2007). Isto foi confirmado, pois o pré-tratamento de ratos colícticos com a mistura de couve e mamão, o qual apresentou efeito prebiótico, foi capaz de exercer efeito antiinflamatório intestinal no modelo de colite experimental induzida por TNBS, como será discutido a seguir.

3. Inibição da Inflamação Intestinal

O modelo de indução de inflamação intestinal por TNBS envolve reação inflamatória localizada no cólon distal (Morris *et al.*, 1989). Este modelo é amplamente utilizado para avaliação inicial de novos tratamentos potencialmente úteis na DII em

humanos; igualmente interessante é seu papel na elucidação de mecanismos envolvidos no processo inflamatório intestinal, já que o modelo apresenta muitas características em comum com as DII em humanos, especialmente similaridades histológicas e imunológicas com doença de Crohn (Mañe, 2007).

A colite experimental foi descrita inicialmente por Morris *et al.* (1989), que administravam solução de 30 mg de TNBS (diluído em etanol 50%); mais tarde, esta dose foi diminuída pelo grupo de Galvez *et al.* (2000) para 10 mg, com o objetivo de facilitar a modulação do processo inflamatório na vigência de um potencial tratamento. De fato, em comparação com resultados prévios do grupo de pesquisa envolvido no presente trabalho e com aqueles obtidos por outros autores, a administração de 10 mg de TNBS induziu lesão no cólon qualitativamente similar aquela induzida com 30 mg do mesmo, ainda que quantitativamente menor (Morris *et al.*, 1989; Camuesco *et al.*, 2005).

O TNBS é diluído em etanol 50%; o papel do etanol é de romper a barreira intestinal, facilitando o acesso do TNBS à mucosa, onde atuará como hapteno (Morris *et al.*, 1989), sendo responsável pela instauração do processo inflamatório (Elson *et al.*, 1995). Além de atuar como hapteno, o TNBS exerce dois outros efeitos: diminuição dos níveis de glutathiona total no cólon (Ardite *et al.*, 2000); citotoxicidade no epitélio do cólon devido a sua capacidade em gerar ERO após metabolização pelos colonócitos (Grisham *et al.*, 1994). Estes efeitos facilitam a desorganização da citoarquitetura do cólon e aumentam a permeabilidade intestinal, o que possibilita a entrada de produtos luminiais e a ativação do sistema imunológico intestinal, além de aumentar a produção de numerosos mediadores pró-inflamatórios (Yamada *et al.*, 1992). A importância da microbiota do cólon, determinante no desenvolvimento do processo inflamatório, é inquestionável; prova disto é o fato de que o TNBS/etanol, administrados em animais *germ free*, ou tratados com antibióticos, conduzem a resposta inflamatória quantitativamente inferior (Garcia-Lafuente *et al.*, 1998).

É bem conhecido que, como consequência da lesão do cólon induzida por TNBS, ocorre inicialmente ativação e infiltração de neutrófilos e monócitos na lâmina própria e, posteriormente, de linfócitos, que contribuem com ambas, severidade da lesão e cronicidade do processo inflamatório instalado (Palmen *et al.*, 1995). Assim, estudos realizados com este modelo experimental demonstraram que a ativação de células T, com

predomínio do tipo Th1, caracteriza-se pela produção de grandes quantidades de IFN γ e pequenas quantidades de IL-4 (Elson *et al.*, 1996). Este tipo de resposta seria promovida pela produção de IL-12, que atua como potente indutor do desenvolvimento de células do tipo TH1, de forma similar ao que ocorre na DC (Parronchi *et al.*, 1997). Mais recentemente foi demonstrado que a produção de IL-17 também está aumentada neste modelo (Zhang *et al.*, 2006); esta citocina pró-inflamatória é secretada pela subpopulação de linfócitos T, denominada Th17 (Langrish *et al.*, 2005) e, embora sem funções biológicas totalmente esclarecidas, postula-se que Th17 parece ter papel importante na patogenia da DII (Fujino *et al.*, 2003).

Assim, partindo-se de demonstrações prévias de que o efeito prebiótico é benéfico na prevenção ou melhora dos diferentes aspectos envolvidos nas DII (Hafer *et al.*, 2007), os resultados desse trabalho reforçam a hipótese do benefício produzido pelos pré-bióticos. O pré-tratamento de ratos colíticos com a mistura de couve e mamão, além de modular a microbiota intestinal, tanto em ratos saudáveis, quanto em ratos com colite experimental, também foi capaz de exercer efeitos antiinflamatórios intestinais no modelo de colite experimental induzida por TNBS. Isto ficou evidente através de observações macro e microscópicas que apontam para redução na extensão dos danos causados ao cólon e no percentual de aderência do intestino aos órgãos adjacentes, além dos achados bioquímicos como redução na atividade da MPO; este último dado sugeriu menor infiltração neutrofilica na área lesionada. A atividade dessa enzima tem sido amplamente utilizada para detectar e acompanhar a infiltração intestinal e redução nesta atividade pode ser interpretada como manifestação da ação antiinflamatória de um determinado composto (Veljaca *et al.*, 1995).

A inflamação na mucosa se caracteriza pela acumulação de líquido e células inflamatórias, que são recrutadas graças às substâncias liberadas no foco inflamatório; isso produz espessamento da parede intestinal e, conseqüentemente aumento do peso da mesma. Portanto, para avaliar o estado inflamatório dos animais, inicialmente, foram utilizados dados macroscópicos como comprimento da lesão no cólon e espessamento da parede do intestino, verificado através da relação peso/comprimento do mesmo. Observou-se que o grupo tratado com a mistura de couve e mamão apresentou melhora no quadro inflamatório, pois estes animais apresentaram menor índice de lesão macroscópico e também menor porcentagem de animais com aderência intestinal. Para corroborar tais resultados, o grupo

tratado com mistura também apresentou sinais de recuperação no tecido inflamado, já que os resultados de histologia mostraram restauração parcial da camada de células epiteliais, em contraste com a extensiva ulceração observada nos animais do grupo controle TNBS, além de depleção menos severa das células caliciformes. A melhora do quadro histológico do cólon foi acompanhada por redução da infiltração inflamatória, principalmente na submucosa.

Recrutamento e ativação de neutrófilos resulta em aumento dramático na produção de radicais livres que bloqueiam mecanismos de proteção antioxidante do tecido, levando ao estresse oxidativo que definitivamente perpetua a inflamação do cólon (Grisham *et al.*, 1994); tem sido estabelecido que a perda da proteção antioxidante está associada à depleção de glutathione. Assim, inibição da geração de radicais livres pode contribuir para a redução da infiltração de leucócitos no tecido inflamado, impedindo que o tecido do cólon desenvolva inflamação. No entanto, o efeito benéfico sobre o estresse oxidativo do cólon nos animais colíticos tratados com a mistura de couve e mamão não foi observado, uma vez que não houve aumento do conteúdo de glutathione no cólon dos ratos, o que teria sido desejável para acompanhar a redução da atividade da MPO.

Torna-se cada vez mais clara que há uma estreita associação entre inflamação crônica do cólon e superprodução de NO^* , expressa através da atividade da iNOS, tanto em seres humanos quanto em animais de experimentação (Hogaboam *et al.*, 1995). Tem sido sugerido que a superprodução de NO^* , causada pela iNOS, tem caráter deletério sobre a função intestinal (Hogaboam *et al.*, 1995), contribuindo significativamente para a imunopatologia gastrointestinal durante os eventos de inflamação crônica, dentre os quais encontram-se as DII. Devido ao importante papel atribuído ao NO^* foi verificado, neste estudo, que a inflamação do cólon obtida com o TNBS está associada à uma maior expressão da iNOS em comparação aos animais controle; os resultados aqui obtidos concordam com observações anteriores em modelo experimental de colite (Hogaboam *et al.*, 1995) e em DII humana (Kimura *et al.*, 1997); estes autores descreveram que o aumento na produção de NO na mucosa inflamada foram provenientes da ação da iNOS no tecido do cólon de pacientes portadores de DII. O efeito antiinflamatório intestinal exercido pela mistura de ambos os vegetais foi, de fato, associado a uma inibição significativa na expressão de iNOS no cólon de animais submetidos a colite por TNBS.

Além da iNOS, a expressão da COX-2 também é induzida por citocinas, endotoxinas, fatores de crescimento e promotores de tumor, no epitélio intestinal durante a inflamação intestinal ativa (Singer *et al.*, 1998). Neste estudo, um aumento de COX-2 no tecido do cólon de animais que receberam a instilação intrarectal de TNBS, quando o mesmo foi comparado ao dos animais controle, foi confirmado; no entanto, os tratamentos utilizados neste estudo não foram capazes de modificar a expressão da COX-2, sugerindo que a melhora na inflamação dos animais com colite e tratados com a mistura não se deve à diminuição de prostanóides.

Em relação às citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , ambas se apresentaram aumentadas no tecido do cólon dos animais com colite experimental induzida por TNBS nesse trabalho, quando comparados àquelas de animais controle.

A IL-1 β tem um papel chave nas DII uma vez que altas concentrações desta citocina são encontradas na parede intestinal de pacientes com RCUI e DC (Mahida *et al.*, 1989), assim como no modelo experimental de colite empregada neste trabalho. A IL-1 é produzida, principalmente, por células mononucleares locais (Youngman *et al.*, 1993) e sua principal função, assim como a do TNF- α , é atuar como mediadora da resposta inflamatória do hospedeiro na imunidade inata; seus efeitos biológicos dependem da quantidade de citocina liberada. Quando esta citocina está em baixas concentrações, sua principal função é mediar a inflamação local. A IL-1 atua ainda sobre as células endoteliais, favorecendo a coagulação e aumentando a expressão de moléculas de adesão que medeiam a adesão leucocitária; atua também diretamente sobre os leucócitos inflamatórios estimulando a produção de quimiocinas por outras células que também são ativadas. IL-1, em quantidades elevadas, entra na circulação e exerce efeitos endócrinos (Fiocchi, 1992).

TNF- α , além de desempenhar função básica nos estágios iniciais do processo inflamatório, atua amplificando esta resposta ao estimular a produção de outros mediadores e participando, de forma importante, no processo crônico tal que vários estudos têm sido feitos no sentido de buscar compostos capazes de bloquear as ações desta citocina, o que resulta na comercialização de um anticorpo monoclonal quimérico frente ao TNF- α , com o nome comercial de Infliximab (Chey, 2001; Rutgeerts *et al.*, 1999; Targan *et al.*, 1997). Outros compostos análogos, como talidomida, também apresentou efeitos nas DII em humanos (Ehrenpreis *et al.*, 1999; Vasiliauskas *et al.*, 1999). Junto com o IL-1, o TNF- α

compartilha a capacidade de induzir febre, síntese hepática de proteínas plasmáticas de fase aguda da inflamação e inicia o desgaste metabólico.

Apenas a mistura de couve e mamão foi capaz de reduzir significativamente a produção tanto do TNF- α quanto da IL-1 β no cólon de animais submetidos à colite por TNBS. Quanto este efeito foi comparado aos dois tratamentos com os vegetais não misturados, não houve diferença entre os tratamentos na produção de IL-1 β ; além disso, apenas o tratamento com couve foi capaz de inibir significativamente os níveis de TNF- α no cólon, sugerindo efeito sinérgico dos vegetais quando combinados. Essa combinação pode ser relevante uma vez que tanto a IL-1 β , quanto o TNF- α , desempenham papel fundamental na inflamação intestinal.

CONCLUSÃO

De modo geral, os resultados obtidos indicaram que a mistura de couve e mamão possui habilidade para modular a microbiota do cólon e do ceco, tanto em ratos saudáveis, quanto em ratos submetidos à colite experimental por TNBS e o efeito prebiótico da mistura dos vegetais foi acompanhado de recuperação do tecido inflamado. A melhora no quadro da doença foi associado à diminuição de alguns mediadores pró-inflamatórios envolvidos na inflamação intestinal, como o TNF- α , IL-1 β , iNOS e atividade da MPO, possibilitando sugerir que esse efeito benéfico seja devido ao sinergismo dos componentes ativos da couve e do mamão, em associação.

PERSPECTIVAS

- Analisar a produção de receptores do tipo toll (TLR) no tecido inflamado do cólon;
- Analisar os níveis de enzimas antiinflamatórias como a IL-10;
- Analisar a ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B);
- Analisar os tipos de fibras e a porcentagem das mesmas encontradas na mistura dos vegetais;
- Analisar o conteúdo de carotenóides, assim como flavonóides presente na mistura;
- Testar a mistura de couve e mamão em humanos com DII.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406(6797): 782--787.
- 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.
- Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981;77: 373-82.
- Alobo AP. Proximite composition and selected functional properties of deffated papaya (*Carica papaya* L.) kernel flour: *Plant food Human Nutr* 2003; 58: 1-7.
- Alstead EM. The pill: safe sex and Crohn's disease? *Gut* 1999; 45(2): 165-166.
- Araki Y, Andoh A, Fujiyama Y, Itoh A, Bamba T. In vitro alterations in fecal short chain fatty acids and organic anions induced by the destruction of intestinal microflora under hypotonic and aerobic conditions. *Int J Mol Med* 2002; 9: 627-631.
- Arellano M, Kaddouri S, Roques C, Couderc F, Puig PH. Capillary electrophoresis and indirect UV detection as a fast and simple analytical tool for bacterial taxonomy. *J Chromatogr A* 1997; 781: 497-501.
- Arnold W, Bredberg G, Gstottner W, Helms J, Hildmann H, Kiratzidis T, Muller J, Ramsden RT, Roland P, Walterspiel JN. Meningitis following cochlear implantation: pathomechanisms, clinical symptoms, conservative and surgical treatments. *J Oto-Rhino-Laryngol Rel Spec* 2002; 64: 382-329.
- 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.
- Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhardt AH, Targan SR, Xavier RJ. Niddk IBD Genetics Consortium, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, De Vos M, Vermeire S, Louis E, Belgian-French IBD Consortium, Wellcome Trust Case

- Control Consortium, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghori J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 2008; 40: 955–962.
- 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.
- Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol* 1995; 268(4 Pt 1):G622-G630.
- 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.
- Borruel N. Bacterial interactions with the intestinal immune system: immunomodulation. *Gastroenterol Hepat* 2003; 26(1): 13-22.
- Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(7):521-533.
- Breuer RI, Soergel KH, Lashner BA, Christ ML, Hanauer SB, Vanagunas A, Harig JM, Keshavarzian A, Robinson M, Sellin JH, Weinberg D, Vidican DE, Flemal KL, Rademaker AW. Short chain fatty acid rectal irrigation for left-sided ulcerative colitis: a randomised, placebo controlled trial. *Gut* 1997; 40(4): 485–491.
- Briskin M, Winsor-Hines D, Shyjan A, Cochran N, Bloom S, Wilson J, Mcevoy LM, Butcher EC, Kassam N, Mackay CR, Newman W, Ringler DJ. Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am J Pathol* 1997; 151: 97–110.
- Campieri M, Gionchetti P. Probiotics in inflammatory bowel disease: new insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative? *Gastroenterol* 1999; 116(5):1246-1249.
- Camuesco D, Peran L, Comalada M, Nieto A, Di Stasi L C, Rodriguez-Cabezas M E, Concha A, Zarzuelo A, Galvez J. Preventative effects of lactulose in the

- trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 265–271.
- Chey WY. Infliximab for patients with refractory ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7 Suppl 1:S30-S33.
- Cintra IP. Intervenções Dietéticas. In: Tânia Leme Rocha Martinez. *Condutas Clínicas nas Dislipidemias*. Belo Horizonte: Health, 1997, v. 7, p.139-157.
- Cho JH, Abraham C. Inflammatory bowel disease genetics: Nod2. *Annu Rev Med* 2007; 58:401-416.
- Cohen S, Kessler RC, Gordon LU. *Measuring stress. A guide for health and social scientists*. New York: Oxford, 1997.
- Collins SM. Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 2001; 280: G315-318.
- Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 1996; 12:274-2777.
- Cope GF, Heatley RV, Kelleher JK. Smoking and colonic mucus in ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; 293(6545): 481.
- Cordon-Cardo C, Prives C. At the crosroads at inflammation and tumorigenesis. *J Exp Med* 1999; 190(10): 1367–1370.
- 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.
- Damaskos D, Kolios G. Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microflora 'on the scope'. *Br J Clin Phar* 2008; 65(4):453-67.
- Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 2004; 3(5):394-400.
- Dias JC, Suzuki E, Albuquerque CL, Ferreira A L, Brito ARMS, Kubota LT. Determination of short-chain fatty acids in dietary fiber extracts using ion-exclusion chromatography with suppressed conductivity detection. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 49 1128–1132.
- Drewe E, Powell RJ. Clinically useful monoclonal antibodies in treatment. *J Clin Pathology* 2002; 55: 81-85.

- Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995; 102(3):448-455.
- Duchmann R, May E, Heike M, Knolle P, Neurath M, Meyer zum Buschenfelde KH. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut* 1999; 44(6):812-818.
- Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006; 314: 1461–1463.
- Ehrenpreis ED, Kane SV, Cohen LB, Cohen RD, Hanauer SB. Thalidomide therapy for patients with refractory Crohn's disease: an open-label trial. *Gastroenterology* 1999; 117(6):1271-1277.
- Elson CO, Beagley KW, Sharmanov AT, Fujihashi K, Kiyono H, Tennyson GS, Cong Y, Black CA, Ridwan BW, McGhee JR.. Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance. *J Immunol* 1996; 157: 2174–85.
- Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol* 1995; 109: 1344–1367.
- Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Disponível em: www.embrapa.br. Acesso em 05/11/2009.
- 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: 823-30.
- Feagan BG, Greenberg GR, Wild G, Fedorak RN, Pare P, McDonald JW, Dube R, Cohen A, Steinhart AH, Landau S, Aguzzi RA, Fox IH, Vandervoort MK. Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. *N. Engl. J. Med.*, 352: 2499-507, 2005.
- Filgueira, F. R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV; 2000. p. 402.
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterol* 1998; 115(1):182-205.

- Fiocchi C. The normal intestinal mucosa: a state of "controlled inflammation". En: Targan SR, Shanahan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 101-120.
- Flickinger EA, Wolf BW, Garleb KA, Chow J, Leyer GJ, Johns PW, Fahey GC. Glucose-based oligosaccharides exhibit different in vitro fermentation patterns and affect in vivo apparent nutrient digestibility and microbial populations in dogs. *J Nutr* 2000; 130:1267-73.
- 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; 16: 693-697.
- Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increase expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003; 52:65-70
- Galvez J, Garrido M, Merlos M, Torres MI, Zarzuelo A. Intestinal anti-inflammatory activity of UR- 12746, a novel 5-ASA conjugate, on acute and chronic experimental colitis in the rat. *Br J Pharmacol* 2000; 130(8):1949-1959.
- Garcia-Lafuente A, Antolín M, Guarner F, Crespo E, Salas A, Forcada P, Malagelada JR. Derangement of mucosal barrier function by bacteria colonizing the rat colonic mucosa. *Eur J Clin Invest* 1998; 28(12): 1019-1026.
- Gasche C. Complications of inflammatory bowel disease *Hepatology* 2000; 47(31):49-56.
- Gassull MA, Cabré E. Clinical guidelines for the diagnosis of IBD. En: *Management of inflammatory bowel disease*. Barcelona: Prous Science, 1994. p.7-12.
- Geller SA. Pathology of inflammatory bowel disease: a critical appraisal in diagnosis and management. En: Targan SR, Shanahan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench To Bedside*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1994. p. 336-351.
- Gibson PR, Moeller I, Kagelari O, Folino M, Young GP. Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells in vitro. *J Gastroenterol Hepatol* 1992; 7(2):165-172.
- Gill H S. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res* 2003; 17(5):755-773.
- Gionchetti P, Lammers KM, Rizzello F & Campieri M. Probiotics and barrier function in colitis. *Gut* 2005; 54, 898–900.
- Giordano LB. Melhoramento de Brássicas. Informe Agropecuário. Belo horizonte: EPAMIG; 1983. 9, p.16-20.

- Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol* 2003; 24(12):652-658.
- Glorio P, Repo-Carrasco R, Velezmoro C, Anticona S, Huaranga R, Martínez P, Melgarejo S, Astuhuaman L, Huamán NE, Icochea JC, Peña JC. Fibra Dietaria. Variedades Peruanas de Frutas, Tubérculos, Cereales y Leguminosas. *Rev Soc Quím Perú* 2008; 74(1):46-56.
- Goldeberg I. Functional foods: Designer foods, pharmafoods, nutraceuticals. Chapman and Hall: New York, 1994. p.544.
- Gomollón F, López SG. Treatment with anti-TNFalpha agents in Crohn's disease: what drug we have to use and when? *Acta Gastroenterol Latinoam* 2008; 38(2):133-45.
- Griffiths AM, Ohlsson A, Sherman PM, Sutherland LR. Metaanalysis of enteral nutrition as a primary treatment of active Crohn's disease. *Gastroenterol* 1995; 108: 1056-1067.
- Grisham MB. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1994; 344(8926):859- 861.
- Guarner F, Malagelada JR. Microecology as a target for therapeutic intervention in inflammatory bowel disease. *IDrugs* 2003a; 6(9):868-873.
- Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003b; 361:512-519.
- Guslandi M, Tittobello A. Pilot trial of nicotine patches as an alternative to corticosteroids in ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1996; 31(4): 627-629.
- Hallstrom M, Eerola E, Vuento R, Janas M, Tammela O. Effects of mode of delivery and necrotising enterocolitis on the intestinal microflora in preterm infants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 463-70.
- Hart A, Kamm MA. Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 2017-28.
- Hart PS, Wright JT, Savage M, Kang G, Bensen JT, Gorry MC. Exclusion of candidate genes in two families with autosomal dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 326-331.
- Helgeland L, Vaage JT, Rolstad B, Midtvedt T, Brandtzae OP. Microbial colonization influences composition and T-cell receptor Vp repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology* 1996; 89: 494-501.

- Hinnebusch BF, Meng S, Wu JT, Archer AY, Hodin RA. The Effects of Short-Chain Fatty Acids on Human Colon Cancer Cell Phenotype Are Associated with Histone Hyperacetylation. *J Nutr* 2002; 132:1012-1017.
- Hogaboam CM, Jacobson K, Collins SM, Blennerhassett MG. The selective beneficial effects of nitric oxide inhibition in experimental colitis. *Am J Physiol* 1995; 268(4):G673-84.
- Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003; 278: 5509–5512.
- Iyer S, Lahana R, Buelow R. Rational design and development of RDP58. *Curr Pharm Des* 2002; 8: 2217–2229.
- Jafri S, Pasricha PJ. Agentes utilizados para diarréia, prisão de ventre e doença inflamatória intestinal, agentes utilizados para doença biliar e pancreática: Hardman JG, Limbird LE (Ed) Goodman e Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: Mac Graw-Hill; 2003. p.788.
- Kanauch O, Serizawa I, Araki Y, Suzuki A, Andoh A, Fujiyama Y, Mitsuyama K, Takaki K, Toyonaga A, Sata M, Bamba T. Germinated barley foodstuff, a prebiotic product, ameliorates inflammation of colitis through modulation of the enteric environment. *J Gastroenterol* 2003; 38(2): 134-141.
- 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.
- Kaplan H, RW Hutkins. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2682–2684.
- Kato K, Mizuno S, Umesaki Y, Ishii Y, Sugitani M, Imaoka A, Otsuka M, Hasunuma O, Kurihara R, Iwasaki A, Arakawa Y. Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 15;20(10):1133-41.
- Katz JA. Treatment of inflammatory bowel disease with corticosteroids. *Gastroenterol Clin North Am* 2004; 33(2): 171-189.
- Kim YH, Kim MH, Kim BJ, Kim JJ, Chang DK, Son HJ, Rhee PL, Rhee JC. Inhibition of cell proliferation and invasion in a human colon cancer cell line by 5 aminosalicylic acid. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 328-37.

- Kimura H, Miura S, Shigematsu T, Ohkubo N, Tsuzuki Y, Kurose I, Higuchi H, Akiba Y, Hokari R, Hirokawa M, Serizawa H, Ishii H. Increased Nitric Oxide Production and Inducible Nitric Oxide Synthase Activity in Colonic Mucosa of Patients with Active Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Dig Dis Sci* 1997; 42 (5): 1047-1054.
- Kobayashi KS, Chamailard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307: 731–734.
- Kopsell, DE; Kopsell, DA. Kale carotenoids remain stable while flavor compounds respond to changes in sulfur fertility. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 5319-5325.
- Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterol* 1984; 87(6):1344-1350
- Krok KL, Lichtenstein GR. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 20(1):43-8.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein YM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T-cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp med* 2005; 201(2): 233-240.
- Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Andreoli A, Luzi C, Arcà M, Berto E, Milite G, Marcheggiano A. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1213-1220.
- Levine DS. Clinical features and complications of Crohn's disease: Targan SR, Shanahan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench To Bedside*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1994. p. 296-319.
- Lewis JD, Lichtenstein GR, Stein RB, Deren JJ, Judge TA, Fogt F et al. An open-label trial of the PPAR-gamma ligand rosiglitazone for active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 3323-3328.
- Lichtman SN, Balfour Sartor R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: clinical aspects and natural history: Targan SR, Shanahan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench To Bedside*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1994. p.317-335.
- Link-Amster H, Rochat F, Soudan KY, Mignot O, Aeschlimann JM. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS* 1994; 10: 55–64.

- 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.
- Loftus EVJR. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterol* 2004; 26(6):1504-1517.
- Lorenzi H, Bacher L, Lacerda M, Sartori S. Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas: (de consumo in natura). Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. p.672.
- Lorenzi H, Matos FJA. Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2009. p. 512.
- Louis P, Duncan SH, McCrae SI, Millar J, Jackson MS, Flint HJ. Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *J Bacteriol* 2004; 186:2099–2106
- Louis P, Duncan SH, McCrae SI, Millar J, Jackson MS, Flint HJ. Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *J Bacteriol* 2004; 186:2099-2106.
- MacDermott RP. Chemokines in the inflammatory bowel diseases. *J Clin Immunol* 1999;19(5):266-72.
- MacFarlane G T, Cummings JH. Probiotics, infection and immunity. *Cur Opin Infec Dis* 2002; 1: 501–506.
- Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. Lactobacillus Species Prevents Colitis in Interleukin 10 Gene-Deficient Mice. *Gastroenterol* 1999;116:1107–1114.
- Mahida YR, Wu K, Jewell DP. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* 1989; 30(6):835-838.
- Mañe J. Modelos experimentales in vivo de enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal. Conceptos, modelos actuales y aplicabilidad. *Nutr Hosp* 2007; 22(2): 178-89.
- Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P, Shanahan F, Wilson ID, Wang Y. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res* 2007; 6: 546-551.
- Maunder RG, Lancee WJ, Greenberg GR, Hunter JJ, Fernandes BJ. Insecure attachment in a subgroup with ulcerative colitis defined by ANCA status. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 2127-32.

- McCafferty DM, Rioux KJ, Wallace JL. Granulocyte infiltration in experimental colitis in the rat is interleukin-1 dependent and leukotriene independent. *Eicosanoids* 1992; 5(3-4):121-125.
- 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.
- Morita H, He F, Fuse T, Ouwehand AC, Hasimoto H, Hosoda M, Mizumachi K, Kurisaki J. Cytokine production by the murine macrophage cell line J774. 1 after exposure to lactobacilli. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66: 1963–1966.
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterol* 1989; 96: 795-803.
- Mors WB, Rizzini CT, Pereira NA. *Medicinal Plants of Brazil*. Michigan: Algonac, 2000. p. 502.
- Nakamura T, Nagahori M, Kanai T, Watanabe M. Current pharmacologic therapies and emerging alternatives in the treatment of ulcerative colitis. *Digestion* 2008; 77: 36-41.
- Obrador A, Riera J. Definitions. En: Gassull MA, Obrador A, Chantar C. *Management of Inflammatory Bowel Disease*. Barcelona: Prous Science, 1994. p. 1-6.
- Ogawa T, Asai Y, Tamai R, Makimura Y, Sakamoto H, Hashikawa S, Yasuda K. Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clin Exp Immunol* 2006; 143: 103–109.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-606.
- Panizza, S. *Plantas que curam (Cheiro de Mato)*. São Paulo: IBRASA; 1998. p. 280.
- Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F and Romagnani S. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 1997; 150:823-832.
- Patz J, Jacobsohn WZ, Gottschalk-Sabag S, Zeides S, Braverman DZ. Treatment of refractory distal ulcerative colitis with short chain fatty enemas. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:731–734.

- Penders J, Vink C, Driessen C, London N, Thijs C, Stobberingh EE. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS*
- Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Diaz-Ropero MP, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J. Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. *World J Gastroenterol* 2005;11: 5185–5192.
- Peris GP, Lesmes B, Cuerda Compes CM, Álvarez C. Metabolismo colónico de la fibra. *Nutr Hosp* 2002; 17: 11-16.
- Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347(6): 417-429.
- Pohl C, Hombach A, Kruis W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. *Hepatogastroenterol* 2000; 47(31):57-70.
- Pullan RD, Rhodes J, Ganesh S, Mani V, Morris JS, Williams GT, Newcombe RG, Russell MA, Feyerabend C, Thomas GA. Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Engl J Med* 1994; 330(12): 811-815.
- Rajkapoor B, Jayaka B, Kavimani S, Murugesh N. Effect of dried fruits of *Carica papaya* Linn on hepatotoxicity. *Biol pharmacol Bull* 2002; 25(12):1645-1646.
- Ramulu P, Rao PU. Total, insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 2003; 16:677–685.
- Rastall R A. Bacteria in the gut: Friends and foes and How to Alter the Balance. *Nutr* 2004; 6: 2022S- 2026S.
- Rath HC, The role of endogenous bacterial flora: bystander or the necessary prerequisite? *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2003; 15:615-620.
- Redondo L. Propiedades de las fibras dietéticas. En: *La fibra terapéutica*. Barcelona: Ed Glosa; 2002. p. 29-51.
- Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40: 754–760.
- Reimund JM, Allison AC, Muller CD, Dumont S, Kenney JS, Baumann R. Antioxidants inhibit the in vitro production of inflammatory cytokines in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 145-150.
- Ren H, Musch MW, Kojima K, Boone D, Ma A, Chang EB. Short-chain fatty acids induce intestinal epithelial heat shock protein 25 expression in rats and IEC 18 cells. *Gastroenterol* 2001; 121: 631-9.

- Rinne M, Kalliomäki M, Arvilommi H, Salminen S, Isolauri E. Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr* 2005; 147: 186-191.
- Rodriguez-Amaya, D. B. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington DC: ILSI Press, 2001.
- 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.
- Rosignoli P, Fabiani R, de Bartolomeo A, Spinozzi F, Agea E, Pelli M.A, Morozzi G. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis* 2001; 22:1675-1680.
- Roth MP, Petersen GM, McElree C, Feldman E, Rotter JI. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol* 1989; 97(4): 900-904.
- Rubin DT, Hanauer SB. Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12(8): 855-862.
- Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, De Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2462–2476.
- Rutgeerts P, D'Haens G, Targan S, Vasiliasuskas E, Hanauer SB, Present DH, Mayer L, Van Hogezaand RA, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Van Deventer SJ. Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterol* 1999; 117(4):761-769.
- Rutgers HC, Batt RM, Elwood CM, Lamport A. Small intestinal bacterial overgrowth in dogs with chronic intestinal disease. *J Am Vet Med Assoc* 1995; 206: 187–193.
- 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. *Gastroenterol* 2004; 127(3): 723-729.
- Scheppach W, Bartram H P, Richter E. Role of short chain fatty acid in the preventions of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1995; 31: 1077-1080.
- Schrezenmeir J, De Vrese M. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. *Am J ClinNutr* 2001; 73:261S-364S.

- Segui J, Gironella M, Sans M, Granell S, Gil F, Gimeno M, Coronel P, Pique JM, Panes J. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 537-544.
- Seibold F. Does conservative therapy of chronic inflammatory bowel diseases still play a role. *Swiss Surgery* 2003; 9(3): 127-130.
- Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutre M, Pochart ., Marteau P, Jian R Dore J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* (2003); 52: 237-242.
- Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dielleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB. Resident enteric flora are necessary for the development of spontaneous colitis and immune systems activation in IL-10 deficient mice. *Infect Immun* 1998; 66: 5224-5231.
- Shanahan F. Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6(2):107-115.
- Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M, Bonnet C, Cherbut C, Galmiche JP, Blottiere HM. Butyrate and tricostatin A effects on proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: Induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut*. 2000; 46:507-514.
- Singer II, Kawka DW, Schloemann S, Tessner T, Riehl T, Stenson WF. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol* 1998; 115(2):297-306.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150(1):76-85.
- Solis-Pereyra B, Aattouri N, Lemonnier D. Role of food in the stimulation of cytokine production. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 521S-525S.
- Sommerburg O, Keunen JEE, Bird AC, van Kuijk F JG. M. Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: The macular pigment in human eyes. *Br J Ophthalmol* 1998, 82: 907-910.
- Sonnenberg A. Geographic and temporal variations of sugar and margarine consumption in relation to Crohn's disease. *Digestion* 1988; 41: 161-171.
- Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(5): 372-377.

- Souza MHLP, Troncon LEA, Rodrigues CM, Viana CFG, Onofre PHC, Monteiro RA. Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudeste do Brasil. *Arq Gastroenterol* 2002; 39(2): 98-105.
- Souza RJ. Origem e botânica de algumas brássicas. Informe Agropecuário. Belo Horizonte: EPAMIG; 1983. p. 10-12..
- 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.
- Stein J, Kulemeier J, Lembcke B, Caspary WF. Simple and rapid method for determination of short-chain fatty acids in biological materials by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr* 1992; 576: 53-61.
- Stenson WF, McDermott RP. Inflammatory Bowel Disease. En: Yamada T, ed. Textbook of Gastroenterology. Philadelphia: Lippincott Company; 1991. p.1588-1645.
- Stucchi AF, Shofer S, Leeman S, Materne O, Beer E, McClung J, Shebani K, Moore F, O'Brien M, Becker JM. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfateinduced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(6):G1298-G1306.
- Sutherland L, Singleton J, Sessions J. Double blind. placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut* 1991; 32: 1071-5.
- Sutherland LR. Clinical course and complications of ulcerative colitis and ulcerative proctitis. En: Targan SR, Shanahan F, eds. Inflammatory Bowel Disease: From Bench To Bedside. Baltimore, Maryland: Willians and Wilkins; 1994. p. 279-295.
- Sutton CL, Kim J, Yamane A, Dalwadi H, Wei B, Landers C, Targan SR Braun J. Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. *Gastroenterol* 2000; 119: 23-31.
- Swennen K, Courtin CM, Delcourt JA. Nondigestible oligosaccharides with prebioitic properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2006; 46: 459-471.
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol* 2002; 122(1):44-54.
- Szulc P, Meunier PJ. Is vitamin K deficiency a risk factor for osteoporosis in Crohn's disease? *Lancet* 2001; 357(9273):1995-1996.

- Taguchi h, Takahashi M, Yamaguchi H, Osaki T, Komatsu A, Fujioka Y, Kamiya S. Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, strain 6. *J Med Microbiol* 2002; 51: 336-343
- 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.
- Tannock GW. What immunologists should know about bacterial communities of the human bowel. *Semin Immunol* 2007; 19: 94–105.
- Tannock GW. Molecular assessment of intestinal microflora. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 410S–414S.
- Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 1997; 337(15):1029-1035.
- Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL, Balish E, Hammer RE. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* 1994; 180(6):2359-2364.
- Thomas GA, Rhodes J, Green JT. Inflammatory bowel disease and smoking--a review. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(2):144-149.
- Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 2000; 16:716-8.
- Topping DL, Clifton PM. "Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides", *Physiol Rev* 2001; 81(3):1031-1064.
- Travis S, Yap LM, Hawkey C, Warren B, Lazarov M, Fong T, Tesi RJ. RDP58 is a novel and potentially effective oral therapy for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 713–719.
- Turunen H, Tossavainen K, Jakonen S, Salomyaki U, Vertio H. Initial results from the European Network of Health Promoting Schools program on development of health education in Finland. *Journal of School Health* 1999; 69: 387–391.
- Van Assche G, Vermeire S, Rutgeerts P. Medical treatment of inflammatory bowel diseases. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21(4): 443-447.
- Vasiliauskas EA, Kam LY, Abreu-Martin MT, Hassard PV, Papadakis KA, Yang H, Zeldis JB, Targan SR. An open-label pilot study of low-dose thalidomide in chronically active, steroid-dependent Crohn's disease. *Gastroenterol* 1999; 117(6):1278-1287.

- Vaughan EE, de Vries MC, Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans ADL, de Vos, WM. The intestinal LABs. *Antonie van Leeuwenhoek* 2002; 82: 341–352.
- 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.
- Veljaca M, Lesch C A, Pllana R, Sanchez B, Chan K, Guglieua A. BPC-1 5 Reduces Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colonic Damage in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272:417-422.
- Viera, LS. *Fitoterapia da Amazônia – Manual de Plantas Mediciniais*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1992. p.350.
- Wiest R, Rath HC. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17: 397–425.
- 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.
- Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 235-243.
- Yamada T, Marshall S, Specian RD, Grisham MB. A comparative study of two models of experimental colitis in rats. *Gastroenterol* 1992: 102, 1524-1534.
- Young G P, McIntyre A, Albert V, Folino M, Muir JG, Gibson PR. Wheat bran suppresses potato-starch potentiated colorectal tumorigenesis at the aberrant crypt stage in a rat model. *Gastroenterol* 1996; 110: 508–514.
- Youngman KR, Simon PL, West GA, Cominelli F, Rachmilewitz D, Klein JS, Fiocchi C. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. *Gastroenterol* 1993; 104(3):749-758.
- Zhang L, Li N, des Robert C, Fang M, Liboni K, McMahon R. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in a gastrostomy-fed infant rat model. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 545–552.
- 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.
- Zuriguél V, Caussé E, Bounéry JD, Nouadje G, Siméon N, Nertz M, Salvayre R, Couderc F. Short chain fatty acids by capillary electrophoresis and indirect UV detection or laser- induced fluorescence. *J Chromatogr A* 1997; 781: 233-238.