

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências
Campus de Botucatu – SP.

AVALIAÇÃO DA DIETA ENRIQUECIDA COM *PERSEA AMERICANA* MILL. NA INFLAMAÇÃO INTESTINAL INDUZIDA POR TNBS EM RATOS.

Ellen Cristina Souza de Oliveira

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

Orientadora: Dra. Aline Witaicenis Fantinati



Botucatu – SP

2016

**AVALIAÇÃO DA DIETA ENRIQUECIDA COM *PERSEA AMERICANA* MILL. NA
INFLAMAÇÃO INTESTINAL INDUZIDA POR TNBS EM RATOS.**

Ellen Cristina Souza de Oliveira

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

Orientadora: Dra. Aline Witaicenis Fantinati

Botucatu – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Oliveira, Ellen Cristina Souza de.

Avaliação da dieta enriquecida com *Persea americana* Mill. na inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.
/ Ellen Cristina Souza de Oliveira. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

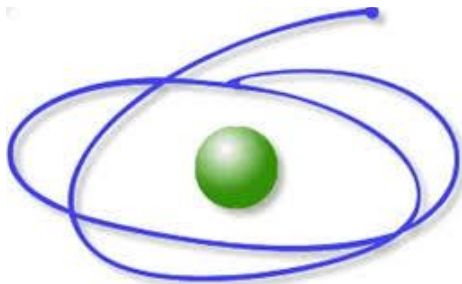
Orientador: Aline Witaicenis Fantinati

Capes: 21001006

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Alimentos funcionais. 3. Abacate.

Palavras-chave: Alimentos funcionais; Doença Inflamatória Intestinal; *Persea americana*; TNBS; abacate.

Auxílio Financeiro



C A P E S

*“Ter fé é acreditar naquilo que você não vê; a recompensa por essa fé
é ver aquilo em que você acredita.”
(Santo Agostinho)*

Dedicatória

A Deus, pois sem Ele guiando meus passos nada teria sido possível.

*“Tu me mostras o caminho que leva à vida.”
(Salmo, 16:11)*

À minha mãe Maria de Fátima, que sempre foi uma guerreira, meu alicerce e exemplo de mulher e de mãe, agradeço por todo o apoio, dedicação e amor que fizeram de mim o que sou.

*“MÃE... São três letras apenas, as desse nome bendito:
Três letrinhas, nada mais... E nelas cabe o infinito...”
(Mário Quintana)*

Ao meu namorado Fernando, que a cada dia me ensina a ser uma pessoa melhor, obrigada por toda a paciência, companheirismo, carinho e por sempre me fazer sorrir.

*“Eis, que te envio um anjo diante de ti para que te guarde pelo caminho,
e te leve ao lugar que te tenho preparado”
(Êxodo 23:20)*

À minha irmã Erika e minhas sobrinhas Emilly e Sofia (nossa caçulinha), agradeço por estarem ao meu lado fazendo meus dias mais felizes.

Ao meu padrinho Ednaldo, obrigada por estar sempre presente em minha vida me orientando, apesar da distância.

“Dê a quem você ama: asas para voar, raízes para voltar, e motivos para ficar.”
(Dalai Lama)

Aos meus amigos, em especial minhas amigas Marília e Maria Angélica, companheiras de longa estrada, obrigada por me ouvirem, me apoiarem e por fazerem parte da minha vida.

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”
(O Pequeno Príncipe)

Agradecimentos

A todos do laboratório FitoFarmaTec pela colaboração em tudo e por todos os momentos que passamos juntos, aprendi muito e me diverti muito com todos vocês.

Ao Luiz por todo companheirismo, ensinamentos científicos e de vida, por toda a ajuda e conselhos e também pelas piadas dignas do “Troféu Luiz Domingues”.

À Lesvi por toda colaboração e principalmente pela amizade, muito obrigada por ter se tornado minha companheira de trabalho e de vida.

Ao Celso (Sáks) por todos os ensinamentos na área de comportamento e por todo o auxílio.

Ao Alexandre (Kita) pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, aprendi muito com o nosso convívio.

À Fabiana (Min) e ao Alexandre (PV) por toda disponibilidade em me ajudar.

Aos estagiários Vinícius e Cristiane por toda a ajuda na parte experimental do trabalho.

Aos funcionários da experimental-UNIPLEX, especialmente ao Delala, Renato e Mário por toda disposição e auxílio no preparo da ração.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da UNESP de Botucatu e aos funcionários Paulão, Luiz, Pompom, Janete e Cris.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da UNESP, especialmente ao Davi por toda disponibilidade em esclarecer as dúvidas sobre documentações, prazos e etc.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À empresa Jaguacy Brasil pelo fornecimento dos abacates.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram em algum momento para realização deste trabalho e participaram desta etapa da minha vida, a vocês minha eterna gratidão!

*“Ninguém ignora tudo, ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”
(Paulo Freire)*

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Di Stasi

Obrigada por toda colaboração, por todos os ensinamentos e direcionamentos, principalmente agradeço pela oportunidade oferecida.

À minha orientadora Dra. Aline Witaicenis Fantinati

Agradeço imensamente por todos os ensinamentos, por toda paciência, orientação, companheirismo, pelos conselhos, tanto profissionais quanto de vida, pela disposição em ajudar sempre, por ter aceitado enfrentar os desafios ao meu lado, por ter acreditado e pela torcida. Muito obrigada!

“Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da nossa palavra...”

(Rubens Alves)

Prólogo

Formação:

Graduação em Ciências Biológicas modalidade Licenciatura (2008-2012) e Bacharelado (2013-2014) pelo Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

Atividades realizadas durante o mestrado (2014-2016):

I) Disciplinas cursadas:

Disciplina	Créditos	Conceito
Projetos e Redação Científica	6	A
Plantas Medicinais: Abordagens de Estudo Interdisciplinar	6	B
Prática de Ensino de Farmacologia	4	A
Delineamento experimental para estudos em Botânica e Biologia Evolutiva	4	A
Tópicos Avançados em Farmacologia e Biotecnologia	3	A
Difundindo e popularizando a Ciência na Unesp: Interação entre Pós-graduação e Ensino Básico	6	A
Prática de Ensino de Farmacologia	4	A
Tópicos Avançados em Farmacologia e Biotecnologia	3	A
Total	36	

II) Participação em congressos e eventos:

IV Simpósio de Farmacologia (SIMFAR) – IBB/UNESP – Botucatu/SP (2014).

XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil – UFG – Góias/GO (2014).

I Simpósio de Ética no Uso de Animais – FMVZ/UNESP – Botucatu/SP (2014).

V Simpósio de Farmacologia (SIMFAR) – IBB/UNESP – Botucatu/SP (2015).

XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), USP – São Paulo/SP (2015).

XII Jornada Paulista de Plantas Medicinais – IBB/UNESP – Botucatu/SP (2015).

III) Trabalhos apresentados em congressos:

“Avaliação da atividade de 4-metilesculetina no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos.” na forma oral. Autores: **Oliveira E.C.S.**, Oliveira, S.L., Di Stasi, L.C., Witaicenis Fantinati A. XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Góias/GO (2014).

“Avaliação da atividade de 4-metilesculetina no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos.” na forma de pôster. Autores: **Oliveira E.C.S.**, Oliveira, S.L., Di Stasi, L.C., Witaicenis Fantinati A. XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Góias/GO (2014).

“Evaluation of the intestinal anti-inflammatory activity of *Persea americana* Mill. in experimental model induced by TNBS in rats.” na forma de poster. Autores: **Oliveira, E.C.S.**, Almeida-Junior L.D., Dalmau, L.M., Di Stasi L.C., Witaicenis, A. XXX Reunião Anual da FeSBE, São Paulo/SP (2015).

“Dieta enriquecida com *Persea americana* e sua associação com 5-ASA no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.” na forma de pôster. Autores: **Oliveira, E.C.S.**, Witaicenis, A., Almeida-Junior, L.D., Dalmau, L.M., Di Stasi, L.C. XII Jornada Paulista de Plantas Medicinais, Botucatu/SP (2015).

“Avaliação da atividade anti-inflamatória da chaya no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos” na forma de pôster. Autores: Dalmau, L.M., Witaicenis, A., **Oliveira, E.C.S.**, Almeida Jr., L.D., Di Stasi, L.C. XII Jornada Paulista de Plantas Medicinais, Botucatu/SP (2015).

IV) Trabalhos premiados:

Menção Honrosa pela apresentação do trabalho “Avaliação da atividade de 4-metilesculetina no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos.” na forma de pôster. Autores: **Oliveira E.C.S.**, Oliveira, S.L., Di Stasi, L.C., Witaicenis Fantinati A. XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Góias /GO (2014).

Menção Honrosa pela apresentação do trabalho “Evaluation of the intestinal anti-inflammatory activity of *Persea americana* Mill. in experimental model induced by TNBS in rats.” na forma de poster. Autores: **Oliveira, E.C.S.**, Almeida-Junior L.D., Dalmau, L.M., Di Stasi L.C., Witaicenis, A. XXX Reunião Anual da FeSBE, São Paulo/SP (2015).

Premiação de 4º lugar pela apresentação do trabalho “Dieta enriquecida com *Persea americana* e sua associação com 5-ASA no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.” na forma de pôster. Autores: **Oliveira, E.C.S.**, Witaicenis, A.,

Almeida-Junior, L.D., Dalmau, L.M., Di Stasi, L.C. No XII Jornada Paulista de Plantas Medicinais, Botucatu/SP (2015).

V. Formação complementar:

Minicurso “Técnicas Aplicadas ao Estudo de Plantas Medicinais”, com carga horária de 3h – Goiás/GO (2014).

Curso “Como redigir um artigo científico”, com carga horária de 2h40min – São Paulo/SP (2015).

Curso “Obesidade, microbiota e inflamação”, com carga horária de 2h30min – São Paulo/SP (2015).

Minicurso “Plantas alimentícias não convencionais”, com carga horária de 4h – Botucatu/SP (2015).

VI. Outras atividades:

Professora voluntária do Projeto de Extensão Universitária Cursinho Pré-Vestibular – Instituto de Biociências: Sinapse e Eukapia, ministrando aulas da disciplina de Biologia para o Curso Semi-Extensivo (2º semestre de 2014).

Monitora do curso “Investigando a Vida das Plantas” do Programa de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciências na UNESP: Interação entre Pós-Graduação e Ensino Básico” com carga horária de 48 horas (2015).

Membro da comissão organizadora do XIV Workshop da Pós-Graduação – IBB/UNESP – Botucatu/SP (2015).

VII. Colaboração em outros projetos de pesquisa:

Avaliação das propriedades anti-inflamatórias da chaya (*Cnidoscolus aconitifolus*) no tratamento da doença inflamatória intestinal;

Desenvolvimento de nano e micropartículas de quitosana com 4-metilesculetina e avaliação no tratamento da doença inflamatória intestinal.

Avaliação das propriedades anti-inflamatórias da *Bertholletia excelsa* (castanha do Pará) no modelo de inflamação intestinal induzido por TNBS;

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal do extrato hidroalcoólico de *Solanum paniculatum* L. (Solonaceae).

Resumo

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) engloba duas principais doenças: a Doença de Crohn e a Retocolite Ulcerativa. Esta doença é multifatorial com etiologia complexa e não totalmente elucidada. Considerando-se que não existe cura e que os fármacos utilizados podem apresentar sérios efeitos colaterais, além de muitos pacientes não responderem aos tratamentos disponíveis; estudos voltados para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento são importantes. Estudos têm evidenciado que a associação entre fármacos e alimentos funcionais, pode resultar em uma relação de muito sucesso no tratamento de pacientes com doenças crônicas, sobretudo nas doenças que afetam o trato gastrointestinal. Assim, o uso de alimentos funcionais, especialmente, os ricos em fibras, compostos antioxidantes e lipídeos bioativos podem ser potenciais na prevenção ou tratamento da DII. Com base nisto, a espécie *Persea americana* Mill., conhecida popularmente como abacate ou avocado, foi selecionada para o presente estudo, pois além de possuir estes compostos, apresenta descrita atividade antioxidante, anti-cancerígena, anti-bacteriana, anti-inflamatória e cicatrizantes. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade da dieta enriquecida com a polpa de *Persea americana* Mill. var. Hass no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos. Para tanto, a polpa da espécie foi incorporada na dieta de ratos *Wistar* machos, nas concentrações de 5%, 10% ou 20%, por 21 dias antes e 7 dias após a indução do processo inflamatório intestinal por TNBS, e os animais foram mortos no 29º dia. Adicionalmente, foi avaliada a atividade da associação da dieta enriquecida na concentração de 20% com o ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) na dose de 50mg/Kg, fármaco padrão utilizado na clínica. Para caracterização da atividade anti-inflamatória intestinal foram analisados parâmetros macroscópicos (relação peso/comprimento colônico, extensão da lesão, escore e diarreia), análise de microscopia óptica e determinações bioquímicas (MPO, GSH, IL-1 β , INF- γ e TNF- α). Complementarmente, foram realizados estudos comportamentais e bioquímicos para avaliar se o consumo prolongado da espécie poderia causar algum efeito inespecífico. Os resultados demonstraram que a dieta enriquecida com a polpa de abacate na concentração de 10% foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 β e evitar a depleção da GSH, assim como a concentração de 20%, que, além disso, inibiu a atividade da enzima MPO, os níveis de TNF- α e INF- γ , e diminuiu a relação peso/comprimento colônico e a extensão da lesão. A administração da associação evitou a depleção de GSH e diminuiu os níveis de TNF- α . O consumo prolongado da espécie não promoveu nenhum efeito inespecífico considerável. O presente estudo demonstrou que a dieta enriquecida com polpa de *Persea americana* na concentração de 20% apresenta atividade anti-inflamatória intestinal no modelo do TNBS em ratos e esses efeitos estão associados as propriedades antioxidante e anti-inflamatória da espécie que podem estar relacionados à presença de lipídeos bioativos, fibras e compostos fenólicos, sugerindo ser esta espécie um alimento funcional promissor para o tratamento e/ou prevenção da DII.

Palavras-chaves: Doença Inflamatória Intestinal, TNBS, alimentos funcionais, *Persea americana*, abacate.

Abstract

Inflammatory Bowel Disease (IBD) comprises two major diseases: Crohn Disease and Ulcerative Colitis. This disease is multifactorial with complex and not fully elucidated etiology. Considering that there is no cure and the drugs may cause serious side effects, and many patients do not respond to the available treatments; therefore researches focused on the development of new treatment strategies are important. Studies have evidenced that the association between drugs and functional foods can result in a very successful relationship forward treating patients with chronic diseases, mainly diseases that affect the gastrointestinal tract. Thus, the use of functional foods, especially ones rich in fibers, antioxidants and bioactive lipids could be potential candidates to the prevention or treatment of IBD. Based on this, *Persea americana* Mill., popularly known as avocado, was selected for this study, due to the presence of mentioned compounds and also for the antioxidant, anti-cancer, anti-bacterial, anti-inflammatory and cicatrizing activities. Therefore the present study aimed to evaluate the activity of enriched diet with *Persea americana* Mill. var. Hass pulp in the experimental model of intestinal inflammation induced by TNBS in rats. For this, the fruit pulp was incorporated in the diet of male *Wistar* rats, in concentrations of 5%, 10% or 20% for 21 days before and 7 days after of induction of intestinal inflammation by TNBS and the animals were killed on the 29^o day. Additionally, the association activity of enriched diet in concentration of 20% with 5-aminosalicylic acid (5-ASA), a standard drug used in the clinical, was evaluated. Intestinal anti-inflammatory activity was analyzed macroscopically (weight/length colonic ratio, extent of lesion, score and diarrhea), biochemically (MPO, GSH, IL-1 β , INF- γ e TNF- α) and through optical microscopy. Complementarily, biochemical and behavioral studies were performed to analyze nonspecific effects of avocado long-term consumption. The results demonstrated that the enriched diet with avocado pulp in the concentration of 10% reduced IL-1 β levels and counteracted GSH depletion, so did the concentration of 20%, which also inhibited MPO activity, reduced TNF- α and INF- γ levels and decreased the weight/length colon ratio and the extension of lesions. The association maintained GSH levels and reduced TNF- α concentration. Prolonged consumption of the species did not cause any significant nonspecific effects. This study demonstrated that enriched diet with *Persea americana* pulp in concentration of 20% showed anti-inflammatory activity against the model of TNBS in rats, these effects are associated with the antioxidant and anti-inflammatory properties of the species which could be related to the presence of bioactive lipids, fibers and phenolic compounds, suggesting that this species could be a promising functional food for the treatment and/or prevention of IBD.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease, TNBS, functional foods, *Persea americana*, avocado.

Lista de Figuras

Figura 1. Consumo de ração por grupo. Dados expressos em consumo de ração (g)/número de animais por caixa (n=7).....	28
Figura 2. Média do ganho de peso corpóreo dos animais. Dados expressos em média (Peso final – Peso inicial) X 100/ Peso inicial) (n=7).	29
Figura 3. Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Dados expressos em média ± E.P.M. com **p<0,01, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.....	30
Figura 4. Avaliação do conteúdo de glutathiona total (GSH) colônico. Dados expressos em média ± E.P.M. com *p<0,05 e **p<0,01, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.	31
Figura 5. Avaliação dos níveis de IL-1β, TNF-α e INF-γ no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. com *p<0,05 e **p<0,01, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.....	32
Figura 6. Média do consumo de ração por grupo. Dados expressos em consumo de ração (g)/número de animais por caixa (n=7).....	34
Figura 7. Média do ganho de peso corpóreo dos animais. Dados expressos em média (Peso final – Peso inicial) X 100/ Peso inicial) (n=7).	35
Figura 8. Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Dados expressos em média ± E.P.M. com *p<0,05 e **p<0,01, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.	36
Figura 9. Avaliação do conteúdo de glutathiona total (GSH). Dados expressos em média ± E.P.M. com *p<0,05, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.....	37
Figura 10. Avaliação dos níveis de TNF-α (A), IL-1β (B), e INF-γ (C) no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. com *p<0,05 e **p<0,01, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.....	38
Figura 11. Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais 7 dias após a administração do TNBS. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). Microfotografadas com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 5X. (A) Grupo não-colítico, (B) Grupo não colítico + dieta 20%, (C) Grupo controle-TNBS, (D) Grupo 5-ASA 50mg/Kg, (E) Grupo dieta 20%+5-ASA 50mg/Kg e (F) Grupo dieta 20%. L=lúmen, M=mucosa, S=submucosa, CM=camada muscular, a=infiltração celular, b=alteração da citoarquitetura, c=edema, d=secreção do muco, seta preta=depleção do muco e seta vermelha=vascularização.....	40
Figura 12. Escore microscópico expresso em mediana, analisados estatisticamente por teste Dunn com teste a posteriori de Kruskal-Wallis vs. grupo controle-TNBS, onde ** p<0,01.	41
Figura 13. Análise histológica do fígado de ratos que consumiram dieta normal (A) ou dieta enriquecida (B). Capilares sinusóide (seta preta); vaso centrol-lobular (asterisco); hepatócito (seta branca).	44

Lista de Tabelas

Tabela 1. Componentes da ração padrão Nuvilab em pó, para roedores. Dados fornecidos pelo fabricante.	18
Tabela 2. Critérios da avaliação da avaliação da severidade e da extensão da lesão colônica.	21
Tabela 3. Critério de avaliação microscópico de lesão colônica.	24
Tabela 4. Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos animais que receberam dieta enriquecida com <i>Persea americana</i> (5 e 10%) no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.	29
Tabela 5. Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos animais que receberam dieta enriquecida com <i>Persea americana</i> (20%) e sua associação com 5-ASA no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.	35
Tabela 6. Número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados no labirinto em cruz elevado.	42
Tabela 7. Avaliação dos movimentos de levantamento e do número de quadrantes percorridos no campo aberto.	42
Tabela 8. Avaliação do peso dos órgãos dos animais que consumiram dieta enriquecida com a polpa de <i>Persea americana</i> (20%) por 28 dias.	43
Tabela 9. Análise bioquímica do soro dos animais para avaliação de possíveis efeitos não específicos do consumo prolongado da dieta enriquecida com a polpa de <i>Persea americana</i> a 20%.	45

Lista de abreviações

5-ASA – ácido 5-aminossalicílico
AIEC – Escherichia coli aderente-invasiva
AGCC – ácido graxo de cadeia curta
ALFAC – álcool 80%, formaldeído e ácido acético
ALT – alanina aminotransferase
AST – aspartato aminotransferase
BHT – hidroxitolueno butilado
COX – ciclo-oxigenase
DC – Doença de Crohn
DII – Doença Inflamatória Intestinal
DSS – sulfato de sódio dextrano
DTNB – ditiobisnitrobenzóico
EROS – espécies reativas de oxigênio
GGT – gama-glutamil-transferase
GSH – glutathiona
GSSG – glutathiona oxidada
HDL – lipoproteína de alta densidade
IL – interleucina
I κ B α – inibidor κ B α
INF – interferon
iNOS – óxido nítrico sintetase induzível
LDL – lipoproteína de baixa densidade
LOX – lipo-oxigenase
LTB₄ – leucotrieno B₄
MPO – mieloperoxidase
MUFAS – ácidos graxos monoinsaturados
NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NF- κ B – fator nuclear kappa B
NO – óxido nítrico
PPAR- γ – receptores ativados por proliferadores de peroxissomo
PUFAs – ácidos graxos poli-insaturados
RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RPM – rotação por minuto
RCU – Retocolite ulcerativa
SUS – Sistema Único de Saúde
TFH – T helper follicular
Th – T helper
TGI – trato gastrointestinal
TNBS – ácido trinitrobenzenosulfônico
TNF – fator de necrose tumoral
Treg – T reguladora
VLDL – lipoproteína de muito alta densidade

Sumário

I.	Introdução.....	1
1.	O sistema imune Intestinal	1
2.	Microbiota intestinal.....	2
3.	Doença Inflamatória Intestinal	4
II.	Objetivo.....	16
III.	Material e Métodos	17
1.	Material Vegetal.....	17
2.	Animais.....	18
3.	Delineamento Experimental	19
4.	Indução do Processo Inflamatório Intestinal.....	20
5.	Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal	21
6.	Efeitos não específicos do consumo prolongado de <i>Persea americana</i> Mill. ...	24
7.	Análise Estatística	26
IV.	Resultados.....	27
	FASE EXPERIMENTAL I	27
1.	Análise clínica dos animais e macroscópica	27
2.	Análises bioquímicas	30
	FASE EXPERIMENTAL II	33
1.	Avaliação macroscópica	33
3.	Análises bioquímicas	36
4.	Análises microscópicas.....	38
5.	Efeitos não específicos do consumo prolongado da espécie <i>Persea americana</i> Mill.....	41
V.	Discussão	46
VI.	Conclusão	60
VII.	Referências	61
VIII.	Anexos	73

I. Introdução

O trato gastrointestinal (TGI) compreende uma rede complexa e dinâmica, com interações entre diferentes células da mucosa, moléculas de defesa, sistema imunológico, partículas de alimento e a microbiota residente (LOPETUSO et al., 2016; MANSON et al., 2008). Este "ecossistema", mais especificamente o intestino, funciona como uma unidade organizada, com sistema de multicamadas semipermeáveis que permitem a absorção de nutrientes e macromoléculas necessários para processos metabólicos, ao mesmo tempo em que protege o indivíduo de potenciais microorganismos invasores (LOPETUSO et al., 2016). Para tanto, possui um complexo sistema de defesa que separa os conteúdos luminiais, regula a absorção de nutrientes, e permite a tolerância entre a flora bacteriana e o sistema imune intestinal, enquanto inibe a translocação de agentes infecciosos para os tecidos internos (LOPETUSO et al., 2016).

Alterações desse organizado complexo estão relacionadas com o desenvolvimento de diversas doenças, como por exemplo, a síndrome do cólon irritável, a doença inflamatória intestinal (DII) e o câncer de cólon (GHAISAS et al., 2015; SANTHANAM et al., 2015; SEIDELIN et al., 2015).

1. O sistema imune Intestinal

O sistema imune intestinal é composto por uma complexa população de células que equilibram a necessidade fisiológica de tolerância aos antígenos luminiais (agentes não-nocivos) e a necessidade de defesa contra os patógenos (agentes nocivos) (LARMONIER et al., 2015).

As respostas do sistema imune intestinal podem ser do tipo inata ou adaptativa. Os componentes celulares da imunidade inata compreendem as células fagocíticas, como os neutrófilos, macrófagos e células natural killer (NK) (MCDADE

et al., 2016; MOWAT; AGACE, 2014). Já os da resposta imune adaptativa são os linfócitos T e B, que são estimulados por exposição a um antígeno específico (MCDADE et al., 2016; MOWAT; AGACE, 2014).

No caso de doenças intestinais, como a DII, quando encontra-se ativa, as respostas imunitárias são caracterizadas por uma infiltração intensa de células imunes inatas (principalmente neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) e adaptativas (células T e B). Dentre as células T, as células efetoras TCD4⁺ (Th1, Th2, Th17 e T helper folicular-TFH) são críticas na defesa contra agentes patogênicos, enquanto as células T reguladoras (Treg, TR1 e Th3) regulam a expansão e hiperatividade das células TCD4⁺.

Na DII ocorre uma ativação excessiva de células T efectoras e uma alteração na atividade imunossupressora de células Treg (LARMONIER et al., 2015), levando a uma intensa e persistente resposta imune, o que pode causar um desequilíbrio da simbiose entre o intestino do hospedeiro e sua microbiota, e consequentemente desencadear uma inflamação intestinal.

De fato, tem sido evidenciado que as bactérias e seus metabólitos exercem um importante papel na manutenção da homeostase intestinal, e um desequilíbrio entre o sistema imune e essa microbiota podem levar a progressão de doenças do TGI inferior, como a DII (SHARON et al., 2014).

2. Microbiota intestinal

O trato intestinal abriga uma complexa e diversa comunidade microbiana (GUINANE; COTTER, 2013; LEY et al., 2006), sendo que os dois principais filos de bactérias são os Bacteroidetes (bactérias gram-negativas) e Firmicutes (bactérias gram-positivas) que englobam gêneros como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* e *Butyricoccus* (ECKBURG et al., 2005; GEIRNAERT et al., 2014;

MORELLI, 2008).

As atividades das bactérias que habitam o intestino são consideradas importantes no papel de manutenção da saúde do intestino e também estão relacionadas com a etiologia das doenças inflamatórias intestinais (LOUIS et al., 2007), bem como de outras doenças. Tem sido demonstrado que uma disbiose da microbiota intestinal, ou seja, aumento de espécies patogênicas e diminuição do número de bactérias benéficas, está relacionada com obesidade, desnutrição e doenças sistêmicas, como diabetes (KAU et al., 2012; LEY et al., 2006; QIN et al., 2012; ZHANG et al., 2009).

Muitos estudos evidenciam tal disbiose em pacientes com DII, onde encontra-se uma maior presença de bactérias patogênicas, principalmente *E. coli* aderente-invasiva (AIEC), em detrimento de bactérias que conferem proteção da doença, como as do filo Firmicutes (ANANTHAKRISHNAN, 2015; CONTE et al., 2014; KOSTIC et al., 2014).

Estudos demonstram que espécies bacterianas benéficas, como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, e *Faecalibacterium*, podem diminuir o risco do hospedeiro desenvolver o processo inflamatório intestinal por vários mecanismos, incluindo a diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-17 (IL-17) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e/ou estimulação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (LLOPIS et al., 2009; SOKOL et al., 2008), além de atuarem como uma barreira física, exercendo uma proteção da mucosa contra a invasão de patógenos e competindo com estes por nutrientes, estimulando a produção de substâncias antimicrobianas, como defensinas, lisozimas, catelicidinas e histatina pelas células do hospedeiro, melhorando a reparação epitelial entre os componentes da resposta imune inata e garantindo a integridade da barreira intestinal (DUERKOP et al., 2009;

GARRETT et al., 2007; HOOPER et al., 2001).

Concomitantemente, o sistema imune do intestino desenvolve inúmeras estratégias para manter a população dessas bactérias equilibradas, possibilitando a colonização da camada externa da mucosa intestinal, ao passo que protege a camada interna contra invasão pelas mesmas (FRAHER et al., 2012). Além disso, a camada epitelial também auxilia nesta proteção, pois possui uma ligação entre as células, chamada *tight junction*, que possibilitam a passagem de nutrientes entre os tecidos, enquanto impede a penetração das bactérias (GARRETT et al., 2007).

Um desbalanço na interação entre sistema imune e a microbiota pode por em risco a integridade da barreira e conseqüentemente a homeostase intestinal, podendo desencadear doenças, como a DII.

3. Doença Inflamatória Intestinal

3.1. Definição e etiologia

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) engloba duas principais doenças conhecidas como Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCU), que acometem o trato gastrointestinal provocando inflamações crônicas, dores abdominais, diarreia e perda de peso, sendo que estes sintomas podem apresentar períodos de remissão e recidiva, afetando significativamente a qualidade de vida dos pacientes (BOUMA; STROBER, 2003; PEYRIN-BIROULET et al., 2012; STROBER et al, 2002).

Embora apresentem sintomas semelhantes, essas doenças diferem quanto às características inflamatórias e distribuição pelo TGI. Na DC o processo inflamatório pode ocorrer ao longo de todo TGI, desde a boca até o ânus, mais comumente na porção terminal do íleo, ceco, área perianal e cólon (BOUMA; STROBER, 2003). Apresenta lesões descontínuas, ao longo do TGI, transmuralis, podendo

desencadear complicações como estenose, abscessos e/ou fístulas, bem como infiltrações de linfócitos, formação de granulomas e fibrose (BAUMGART; SANDBORN, 2007; ZORZI et al., 2014).

Já na RCU, o processo inflamatório restringe-se ao cólon e reto, atingindo camadas mais superficiais da mucosa, apresentando principalmente infiltração de linfócitos, granulócitos e neutrófilos e perda de células caliciformes, podendo formar abscesso das criptas, com presença de neutrófilos e ocorrência de ulcerações. Além, dos sintomas descritos acima, pode ocorrer perda progressiva da função peristáltica, o que pode ocasionar rigidez do tecido colônico (BOUMA; STROBER, 2003).

A DII vem sendo estudada há décadas, porém sua etiologia não está totalmente elucidada, mas sabe-se que trata-se de uma doença multifatorial (BARABÁSI, 2007; FIOCCHI, 2012), resultado de uma interação complexa entre alterações da microbiota, imunológicas, genéticas, associadas a fatores ambientais, como estresse, dieta e medicamentos (anti-inflamatórios não-esteroidais e anticoncepcionais via oral) (SU et al., 2009).

3.2. Epidemiologia

A DII afeta um número estimado de 1,5 milhões de americanos, 2,2 milhões de europeus e centenas de milhares de pessoas em todo o mundo (ANANTHAKRISHNAN, 2015; MOLODECKY et al., 2012).

Estudos epidemiológicos recentes têm mostrado que a DC e a RCU têm uma prevalência similar de cerca de 100-200 casos para cada 100.000 indivíduos na Europa e na América do Norte (ANANTHAKRISHNAN, 2015; MALIK, 2015; MOLODECKY et al., 2012).

No passado, a DII tinha sido considerada uma condição que ocorria principalmente em populações brancas da Europa, América do Norte e Austrália (ANANTHAKRISHNAN, 2015; COSNES et al., 2011; MALIK, 2015; MOLODECKY et al., 2012). Apesar destas regiões ainda apresentarem o maior número de casos quando comparados às outras regiões, a DII está aumentando com o passar do tempo em diferentes regiões do mundo, indicando sua emergência como doença global (ANANTHAKRISHNAN, 2015; MALIK, 2015; MOLODECKY et al., 2012).

No Brasil, a prevalência de DII não é bem documentada, porém alguns estudos sugerem que esta tem aumentado na população brasileira, seguindo a tendência observada em muitas populações ocidentais (ELIA et al., 2007; PARENTE, 2015; VICTORIA et al., 2009).

O aumento na incidência da DII tem sido associado, a mudanças nos hábitos alimentares, tabagismo, sedentarismo e estresse, bem como perturbações da microbiota intestinal através de uso de antibióticos (ANANTHAKRISHNAN, 2015; COSNES et al., 2011; ELIA et al., 2007; MALIK, 2015). Além disso, pacientes com DII apresentam maiores riscos de desenvolverem câncer de cólon, devido ao processo inflamatório crônico, característico da doença, representar um potencial risco de mutações e proliferações celulares do trato-gastrointestinal (CHOI et al., 2014; FRANCESCONE et al., 2015).

Além do aumento do número de casos, outro problema que envolve a doença é o alto custo dos fármacos disponíveis para o seu tratamento. Foi estimado um custo de mais de US\$ 6 bilhões nos EUA (KAPLAN, 2015; KAPPELMAN; RIFASHIMAN, 2008) e de 5,6 bilhões de euros na Europa por ano (BURISCH et al., 2013; KAPLAN, 2015), tais gastos são devido ao uso prolongado dos medicamentos,

necessidade de inúmeros e complexos exames diagnósticos, frequentes internações hospitalares e cirurgias (ELIA et al., 2007).

3.3. Terapêutica disponível

Dentro da terapêutica utilizada para a DII destacam-se: os aminossalicilatos, os glicocorticóides, os imunossupressores, os imunomoduladores (YAMAMOTO-FURUSHO, 2007) e a terapia biológica (MORRISON et al., 2009).

Os aminossalicilatos compreendem a classe dos derivados do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), que atuam bloqueando a produção de prostaglandinas e leucotrienos, inibindo o peptídeo bacteriano capaz de induzir a quimiotaxia dos neutrófilos e a secreção de adenosina induzida, que retira os metabólitos reativos do oxigênio (PODOLSKY, 2002). Tem como principais representantes a sulfassalazina, balsalazina, olsalazina e mesalazina.

A sulfassalazina, composta por 5-ASA e sulfapiridina, tem sido um dos principais agentes na terapia de DC e RCU leves e moderadas por mais de 50 anos, porém, após comprovação de que o 5-ASA é o composto ativo da sulfassalazina e que a sulfapiridina seria responsável por acentuar os seus efeitos adversos, a mesalazina, composta apenas por 5-ASA, tornou-se mais utilizada atualmente no tratamento da DC e RCU leves e moderadas (GISBERT et al., 2007; KANE et al., 2003; KHAN et al., 1977). No entanto, ambos os fármacos podem desencadear efeitos adversos similares, tais como doenças renais e cardiovasculares (SONU et al., 2013; VAN STAA et al., 2004).

Os glicocorticóides ou corticosteróides são fármacos com efeito anti-inflamatório utilizados no tratamento dos casos severos de RCU e nos casos moderados e severos da DC (NAVARRO; HANAUER, 2003), sendo a prednisolona e a prednisona os fármacos mais utilizados desta classe. Devido ao

fato dos receptores para os glicocorticóides estarem presentes em vários tecidos, o seu uso prolongado e em altas doses leva a graves efeitos colaterais, que são decorrentes principalmente da supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (ROGLER, 2010), dentre estes podemos citar o desbalanço eletrolítico e de fluidos corpóreos, distúrbios ácido-base, anormalidades metabólicas, alterações nos sistemas hepático, cardiovascular, mental e músculo-esquelético, hiperglicemia, aumento do risco de diabetes, desenvolvimento de hipertensão arterial e edema.

Quanto aos imunossupressores destacam-se a azatioprina e seu metabólito ativo 6-mecarptopurina, que apresentam efeitos na doença ativa, bem como na manutenção da remissão tanto da DC como da RCU (ROGLER, 2010). Seu principal mecanismo de ação se dá através da supressão de células T (BIONDO-SIMÕES; MANDELLI, 2003). Apesar do importante efeito imunossupressor, essa classe de medicamentos possui como principal efeito colateral a toxicidade da medula óssea, desenvolvimento de leucopenia e trombocitopenia, além de estarem amplamente associados com o desenvolvimento de linfomas e risco de diabetes nos pacientes (ANANTHAKRISHNAN et al., 2015; NAVARRO; HANAUER, 2003).

Por fim a terapia biológica, que incluem os agentes anti-TNF, tais como infliximab e adalimumab, são anticorpos que se ligam ao TNF- α e promovem inibição do tráfego de leucócitos, bloqueio de integrinas e citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-12, IL-17, IL-18 e IL-23 (DANESE, 2012). No entanto, a resposta terapêutica a estes agentes não é uniforme e grande parte dos pacientes não apresentam melhora ou deixam de responder após um período de tratamento (ZAMPELI et al., 2014).

Apesar desses fármacos promoverem efeitos benéficos no tratamento da doença (NAVARRO; HANAUER, 2003), eles não representam a cura e/ou

promovem sérios efeitos colaterais. Somado a isso, ainda apresentam alto custo e muitos pacientes não respondem a nenhum dos fármacos disponíveis (WITAICENIS et al., 2013).

Diante do exposto, novas pesquisas, tanto na busca por novos compostos, quanto na busca por novas estratégias de tratamento e/ou prevenção para a DII são muito importantes e necessárias.

3.4. Novas estratégias no tratamento da DII

Uma interessante estratégia terapêutica evidenciada é a utilização em conjunto de fármacos e alimentos, o que pode resultar em uma relação de muito sucesso e de grande custo-benefício para os pacientes com diferentes doenças crônicas, especialmente doenças que afetam o TGI, como a DII (ALISSA; FERNS, 2012; ANDERSEN; FERNANDEZ, 2013; EUSSEN et al., 2011; JEW et al., 2009; SCARMINIO et al., 2012; TRIGUEROS et al., 2013).

3.4.1. Alimentos funcionais como estratégia de tratamento na DII

Os alimentos funcionais são alimentos, que além de apresentarem valor nutricional, afetam benéficamente uma ou mais funções do organismo, promovem bem-estar e saúde e reduzem o risco de doenças (ROBERFROID, 2002).

A importância dos alimentos funcionais nas doenças do TGI reside na enorme relação entre o sistema imune do intestino com a microbiota intestinal (GUINANE; COTTER, 2013; MAGRONE; JIRILLO, 2013). Dentre estes encontram-se os alimentos probióticos (produtos lácteos ricos em bactérias do ácido lático e leveduras não patogênicas) (DAMASKOS; KOLIOS, 2008; QUIGLEY, 2012), os prebióticos (produtos ricos em fibra dietária, carboidratos, amido resistente, oligossacarídeos e/ou inulina) (ROBERFROID et al., 2010) e os simbióticos (associação de probióticos com prebióticos) (SCALDAFERRI et al., 2013).

Os probióticos são microrganismos vivos, capazes de sobreviver ao pH gástrico e a ação da bile, atingindo o intestino, e quando ingeridos em quantidades adequadas conferem benefícios ao hospedeiro (DAMASKOS; KOLIOS, 2008; QUIGLEY, 2012).

Estes alimentos probióticos apresentam em sua composição bactérias como as espécies *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *E. coli* Nissle 1917 (cepa não patogênica), *Saccharomycesboulardii* e *C. butyricum*, ou associações delas como o VSL#3 (probiótico contendo 8 diferentes cepas) (DAMASKOS; KOLIOS, 2008; QUIGLEY, 2012). Vários mecanismos de ação dos probióticos, como supressão do crescimento de bactérias patogênicas, capacidade de modular o sistema imunológico e manter a função da barreira intestinal, são importantes na prevenção e tratamento de doenças crônicas, como a DII (GIACINTO et al., 2005; RIOUX; FEDORAK, 2006).

Sabe-se que muitas das propriedades benéficas da microbiota intestinal também são atribuídas à fermentação de prebióticos por bactérias, com a consequente produção de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e principalmente o butirato) (MACFARLANE; MACFARLANE, 2011), que podem restaurar o equilíbrio da microbiota gastrointestinal de modo a reduzir ou impedir a inflamação intestinal (WITAICENIS et al., 2010).

Os prebióticos são carboidratos não digeríveis, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, pois promovem a modulação da microbiota intestinal (TOWARD et al., 2012), favorecendo o crescimento de espécies como, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *E. coli* não patogênica (DAMASKOS; KOLIOS, 2008). Os prebióticos mais comumente utilizados são a lactulose, lactosacarose, oligossacarídeos (fruto-oligossacarídeos, galacto-oligossacarídeo), inulina, *Plantago*

ovata (psyllium), alimentos que contenham cevada, amido resistente e fibras (DAMASKOS; KOLIOS, 2008; TOWARD et al., 2012).

No cólon, os prebióticos são fermentados por bactérias anaeróbicas, e esse processo de fermentação gera ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o acetato, propionato, butirato, ácido pentanóico e ácido hexanóico, sendo os três primeiros os principais envolvidos em vários sistemas celulares e moleculares do intestino, como preservação da barreira epitelial e modulação do sistema imune (TAN et al., 2014).

O acetato, propionato e butirato, após produzidos por fermentação, são rapidamente absorvidos pelo intestino, mas a distribuição, destino e efeitos destes AGCC no metabolismo celular do hospedeiro são diferentes (LOUIS et al., 2014). O butirato é usado preferencialmente como fonte de energia pelas células epiteliais do intestino, atuando como anti-inflamatório e imunomodulador; o propionato é metabolizado pelo fígado servindo como substrato na gliconeogênese, e também pode inibir a síntese de colesterol; já o acetato, o AGCC produzido em maior proporção no cólon, passa livremente para circulação periférica atingindo concentrações elevadas no sangue, e é utilizado como substrato na síntese de ácidos graxos de cadeia longa, como glutamato, glutamina e beta-hidroxibutirato (BLOEMEN et al., 2010; SLEETH et al., 2010).

Estudos demonstram que tanto o propionato quanto o acetato apresentam atividades anti-inflamatória intestinal, porém são menos potentes que o butirato, demonstrando que os efeitos anti-inflamatórios dos AGCC, além de serem importantes para as células do intestino, também contribuem para a homeostase da microbiota intestinal (LOUIS et al., 2014; TEDELIND et al., 2007).

Além dos probióticos e dos prebióticos, outro importante grupo de substâncias

biologicamente ativas encontradas nos alimentos funcionais são os lipídeos bioativos (MORAES; COLLA, 2006) que estão presentes em diferentes alimentos, principalmente em peixes, ovos, leite e espécies vegetais, como frutos, sementes e óleos (CHEN et al., 2013; TANEJA; SINGH, 2012).

Os lipídeos bioativos podem ser categorizados em quatro grupos principais: os carotenóides, como o β -caroteno, luteína e licopeno; os fitoesteróis, como estigmasterol, β -sitosterol; as vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K; e o grupo dos ácidos graxos, como os ácidos graxos saturados (ácidos palmítico, esteárico e mirístico), monoinsaturados (ácidos palmitoléico e oleico – ômega 9) e poli-insaturados (ácidos linoléico – ômega 6 e linolênico – ômega 3) sendo que grande parte destes lipídeos podem representar importantes benefícios a saúde humana (CHEN et al., 2013).

Estudos em animais e ensaios clínicos têm relatado várias atividades biológicas competentes dos lipídeos, apresentando positivos efeitos em doenças cardiovasculares (MATHUR et al., 2015), câncer (DI FRANCESCO et al., 2015; JU et al., 2009), obesidade (KENNEDY et al., 2010) e na DII (CALDER, 2009, 2012).

Recentemente têm-se sugerido que a associação do ômega 6 e ômega 3, ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS), promovem efeitos benéficos na DII (DE SILVA et al., 2014; HUANG et al., 2014; MASOODI et al., 2013; TYAGI et al., 2014), devido ao ômega 3 ser capaz de inibir a produção de mediadores inflamatórios, tais como IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , eicosanóides e espécies reativas de oxigênio (EROS), além de estimular a produção de IL-10, citocina anti-inflamatória (CALDER, 2012; HOU et al., 2015) e poder exercer um controle nos níveis de ômega 6, competindo por mediadores lipídicos, controlando assim a produção de leucotrienos e prostaglandinas (SIMOPOULOS, 2002). Enquanto o ômega 6 sugere-se que sua

atividade esteja relacionada a regulação da expressão de genes anti-inflamatórios e a modulação do sistema imune (SCARPA et al., 2008; VILADOMIU et al., 2015).

Com base no exposto, a espécie vegetal *Persea americana* Mill. foi selecionada para o presente estudo, devido aos constituintes presentes na espécie, apresentando-se como um alimento funcional potencial para ser estudado no tratamento e/ou prevenção da DII.

3.4.2. *Persea americana* Mill. (Abacate)

A *Persea americana* Mill. é conhecida popularmente por abacate ou avocado (WITJAKSONO et al., 1999), esta espécie apresenta duas variedades comuns, a Fuerte e a Hass (RODRÍGUEZ-CARPENA et al., 2011), e tem como sinonímia *Persea gratissima*, *Persea nubigena* e *Persea persea* (THE PLANTLIST; TROPICOS, 2014).

Pertencente à família Lauraceae é uma espécie nativa do Sul do México, porém atualmente é cultivada na América, Austrália, Sul da África e Espanha. No ano de 2008, sua produção foi de mais de 3,2 milhões de toneladas, sendo 2/3 produzidos na América Latina e Caribe e atualmente seu maior importador é a Europa (RODRÍGUEZ-CARPENA, et al., 2011). O interesse da indústria, tanto de cosméticos como alimentícia, pela fruta tem aumentado consideravelmente (RODRÍGUEZ-CARPENA et al., 2011).

Devido ao seu alto valor nutricional e aumento de seu consumo, as pesquisas para avaliar seus efeitos benéficos, compreendem uma importante área de investigação dentro da farmacologia de produtos naturais.

A espécie *Persea americana* Mill. foi selecionada para o presente estudo, pois é rica em fibras, potássio, magnésio, vitaminas A, C, B-2, B-5, B-6, E e K1, ácido fólico, niacina, ácido pantotênico, riboflavina, colina, carotenóides (α -caroteno, β -

caroteno, luteína, zeaxantina), fitoesteróis e ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados (DREHER; DAVENPORT, 2013; HURTADO-FERNÁNDEZ et al., 2013).

As fibras totais presentes no abacate representam cerca de 6,8g a cada 100g do fruto, sendo que aproximadamente 75% são fibras insolúveis e 25% fibras solúveis (DREHER; DAVENPORT, 2013; NAVEH et al., 2002).

Dentre os principais ácidos graxos descritos estão os ácidos linoléico (13,4%), alfa linolênico (1,6%), oleico (47,2%), palmitoléico (3,58%), palmítico (23,6%), esteárico, docosadienóico (8,8%), eicosenóico (1,29%) e ácido mirístico (0,3%), compreendendo uma importante fonte de ácidos graxos (DE OLIVEIRA et al., 2013; LU et al., 2009).

Além disso, a *Persea americana* possui glutationa e outros compostos polifenólicos, o que sugere potencial atividade antioxidante para a espécie (LI et al., 2013).

De fato, um estudo recente demonstrou que a espécie *Persea americana* apresentou alta atividade antioxidante e antimicrobiana no modelo *in vitro*, utilizando o extrato da polpa, semente e casca do fruto (RODRÍGUEZ-CARPENA, et al., 2011). Li et al., (2013) demonstraram que a ingestão da polpa da fruta junto com hambúrguer, evitou o aumento da secreção de IL-6, e inibiu a expressão de inibidor- κ B- α (I κ B- α) e, portanto, inibiu a ativação de fator nuclear- κ B (NF- κ B) em células polimorfonucleadas humanas, sugerindo atividade anti-inflamatória para a espécie.

O extrato acetônico do fruto de *Persea americana* apresentou atividade antiproliferativa e antitumoral no câncer de próstata (LU et al., 2005) e o extrato hidroalcolico apresentou a mesma atividade em linhagens celulares de câncer de esôfago e de cólon (LARIJANI et al., 2014). Estudos pré-clínicos, demonstraram que o óleo da espécie aplicado topicamente em feridas na pele de ratos, promoveu uma

aceleração da cicatrização, evidenciada por um aumento na formação de colágeno e uma atividade anti-inflamatória destacada pela redução do número de células inflamatórias no local da lesão (DE OLIVEIRA et al., 2013).

Outros estudos sugerem que a introdução da *Persea americana* na dieta promove um aumento na ingestão de nutrientes, como fibras e ácidos graxos monoinsaturados (MUFAS), resultando em níveis mais elevados de lipoproteínas de alta densidade (HDL), menor risco do desenvolvimento de síndrome metabólica e do aumento do peso corpóreo (FULGONI et al., 2013). Pieterse et al., (2005) demonstraram que o consumo de meia fruta da espécie *Persea americana* em cada refeição, promoveu controle e/ou perda de peso de pacientes com sobrepeso e obesidade.

Uma pesquisa realizada em humanos, saudáveis e com sobrepeso, que consumiram diariamente, durante 4 semanas, um abacate da variedade Hass, apresentaram uma redução nos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e portanto menores riscos de doenças cardiovasculares, sugerindo que tal efeito se deva a combinação de MUFAS, fitoesteróis e fibras presentes na espécie (WANG et al., 2015).

Apesar de seus importantes compostos com potencial anti-inflamatório e antioxidante, do aumento na produção e consumo desta fruta, a espécie *Persea americana* Mill. ainda possui poucos estudos, e nenhum estudo que caracterize sua atividade anti-inflamatória intestinal. Além disso, o gênero *Persea* faz parte da lista de Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) (RENISUS), projeto do Ministério da Saúde que pretende incorporar espécies vegetais com comprovada atividade farmacológica no SUS, o que reforça ainda mais a pesquisa com esta espécie vegetal.

II. Objetivo

Com base no exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com a polpa da espécie *Persea americana* Mill. var. Hass no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

III. Material e Métodos

1. Material Vegetal

Os frutos da espécie *Persea americana* Mill. var. Hass (abacate) foram adquiridos comercialmente da empresa produtora Jaguacy Brasil, Bauru-SP. Os frutos permaneceram em estufa ventilada, temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até a sua maturação, em seguida a polpa fresca foi separada e armazenada em freezer -80°C para posterior preparo da ração.

1.1. Preparo da ração

A polpa da espécie foi devidamente pesada e misturada à ração em pó (Nuvilab) (Tabela 1), nas concentrações de 5%, 10% ou 20% por diluição geométrica, até obter-se uma mistura homogênea. Após a mistura, o material obtido passou por uma peletizadora, obtendo assim uma ração enriquecida de *Persea americana* (abacate) nas diferentes concentrações. A peletização e secagem da ração foram realizadas junto à Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu – SP, Brasil.

Tabela 1. Componentes da ração padrão Nuvilab em pó, para roedores. Dados fornecidos pelo fabricante.

Composição básica do produto: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio (sal comum), vitaminas A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT.

Níveis de garantia por quilograma de produto:

Umidade (máx)	125g/kg	Pantotenato de cálcio (min)	20mg/kg
Proteína bruta (min)	220g/kg	Ácido Fólico (min)	1mg/kg
Extrato etéreo (min)	40g/kg	Biotina (min)	0,05mg/kg
Material mineral (máx)	90g/kg	Colina (min)	1.900mg/kg
Fibra bruta (máx)	70g/kg	Sódio (min)	2.700mg/kg
Cálcio (min-máx)	10-14g/kg	Ferro (min)	50mg/kg
Fósforo (min)	8.000g/kg	Manganês (min)	60mg/kg
Vitamina A (min)	13.000UI/kg	Zinco (min)	60mg/kg
Vitamina D3 (min)	2.000UI/kg	Cobre (min)	10mg/kg
Vitamina E (min)	34UI/kg	Iodo (min)	2mg/kg
Vitamina K3 (min)	3UI/kg	Selênio (min)	0,05mg/kg
Vitamina B1 (min)	5mg/kg	Cobalto (min)	1,50mg/kg
Vitamina B2 (min)	6mg/kg	Fluor (máx)	80mg/kg
Vitamina B6 (min)	7mg/kg	Lisina (min)	12g/kg
Vitamina B12 (min)	22mg/kg	Metionina (min)	4.000mg/kg
Niacina (min)	60mg/kg	BHT (min)	100mg/kg

2. Animais

Ratos machos albinos *Wistar* pesando de 180 a 220 g, adquiridos do biotério Anilab, Paulínia–SP, foram utilizados. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec), localizado, no Instituto de Biociências da UNESP Botucatu–SP. Este biotério dispõe de estantes climatizadas, com temperatura controlada de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e um ciclo de claro-escuro de 12 horas.

O protocolo e delineamento experimental foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto, segundo o Protocolo n. 2014/617 – CEEA.

3. Delineamento Experimental

3.1. Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal de *Persea americana* Mill.

Após aclimatação, por no mínimo 7 dias, os animais (n=7 por grupo), foram alojados em caixas, e alimentados com dieta normal ou dieta enriquecida com a polpa de *Persea americana* Mill. nas diferentes concentrações, por um período de 21 dias. Após esse período os animais passaram por um jejum de 12 horas e foram submetidos à indução do processo inflamatório por TNBS, no 22º dia. Em seguida, continuaram a ser alimentados com ração normal ou dieta enriquecida por mais 7 dias, e no 8º dia após a indução, os animais foram anestesiados e mortos por deslocamento cervical.

Na fase I, foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

- A) Grupo não-colítico: animais sem indução do processo inflamatório intestinal que receberam dieta normal;
- B) Grupo controle-TNBS: animais que receberam dieta normal e indução do processo inflamatório intestinal;
- C) Grupo dieta 5%: animais que receberam dieta enriquecida com polpa de *Persea americana* Mill. na concentração de 5% e indução do processo inflamatório intestinal;
- D) Grupo dieta 10%: animais que receberam dieta enriquecida com polpa de *Persea americana* Mill. na concentração de 10% e indução do processo inflamatório intestinal.

Na fase experimental II, foram utilizados os seguintes grupos experimentais (n=7) conforme descrito abaixo:

- A) Grupo não-colítico: animais sem indução do processo inflamatório intestinal que receberam dieta normal;
- B) Grupo controle-TNBS: animais que receberam dieta normal e indução do processo inflamatório intestinal;
- C) Grupo não-colítico + dieta 20%: animais que receberam a dieta enriquecida com polpa de *Persea americana* Mill. na concentração de 20% sem indução do processo inflamatório intestinal.
- D) Grupo dieta 20%: animais que receberam a dieta enriquecida com polpa de *Persea americana* Mill. na concentração de 20% com indução do processo inflamatório intestinal;
- E) Grupo 5-ASA 100 mg/kg: animais que receberam a dose de 100 mg/Kg de 5-ASA por 5 dias antes da indução do processo inflamatório intestinal e por 7 dias após indução;
- F) Grupo 5-ASA 50mg/kg: animais que receberam a dose de 50 mg/Kg de 5-ASA por 5 dias antes da indução do processo inflamatório intestinal, e por 7 dias após indução;
- G) Grupo dieta 20% + 5ASA 50 mg/kg: animais que receberam a dieta enriquecida com a polpa de *Persea americana* Mill. na concentração de 20% e 5-ASA na dose de 50 mg/Kg.

4. Indução do Processo Inflamatório Intestinal

A indução do processo inflamatório intestinal foi realizada pelo método descrito por Morris et al., (1989), com pequenas modificações. Os animais foram submetidos a um período de jejum de aproximadamente 12 horas e posteriormente anestesiados. Em seguida, foi realizada a administração retal (intracolônica) com a ajuda de um catéter (diâmetro de 2 mm, pelo ânus do animal até uma distância de 8

cm) de 0,25 mL de uma solução de 10 mg de TNBS em etanol a 50% v/v. Os animais foram mantidos de cabeça para baixo desde o momento da instilação do hapteno até a recuperação da anestesia. Os animais do grupo não colítico foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS. Todos os animais foram mortos 8 dias após a indução do processo inflamatório por anestesia seguida de deslocamento cervical.

5. Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal

5.1. Análise clínica dos animais e macroscópica da lesão

Durante o desenvolvimento dos distintos experimentos, os animais foram avaliados diariamente em diferentes parâmetros de caráter geral tais como: consumo de alimento, peso corporal e aparecimento de fezes diarreicas.

Após a morte dos animais os cólons foram extraídos e analisados quanto à relação peso/comprimento colônico, análise da severidade e extensão do prejuízo intestinal, segundo escore macroscópico proposto por Bell et al., (1995) (Tabela 2).

Tabela 2. Critérios da avaliação da avaliação da severidade e da extensão da lesão colônica.

Escala	Critério
0	Sem danos
1	Hiperemia, sem úlceras.
2	Úlcera linear sem inflamação significativa
3	Úlcera linear com inflamação em um sítio
4	Dois ou mais sítios de ulceração/inflamação
5	Dois ou mais sítios de ulceração e inflamação ou um sítio de inflamação maior que 1 cm ao longo da extensão do cólon
6-10	Se o dano cobrir mais que 2 cm ao longo da extensão do cólon (a escala é aumentada em 1 ponto para cada centímetro adicional)

5.2. Determinações Bioquímicas

Após a análise macroscópica, o cólon foi dividido em fragmentos longitudinais e congelados em freezer – 80°C para as determinações bioquímicas, que foram

realizadas em homogeneizados de tecido colônico, a frio, com ajuda de um homogeneizador automático, provido de um pistilo de teflón e um recipiente de vidro.

Na análise bioquímica foram avaliados os seguintes parâmetros:

- A- Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) (KRAWISZ et al., 1984)
- B- Determinação do conteúdo de glutathiona total (ANDERSON, 1985);
- C- Determinação dos níveis de IL-1 β , INF- γ e TNF- α pela técnica de ELISA.

5.2.1. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A determinação da atividade da MPO em fragmentos de cólon de rato foi realizada pelo método de Krawisz et al., (1984), e os resultados expressos como unidades de MPO por grama de tecido (1 unidade de atividade de MPO é definida como aquela que degrada 1 μ mol de peróxido de hidrogênio por minuto a 25°C). A atividade da MPO é utilizada como marcador da infiltração de neutrófilos, mesmo que esta enzima não seja específica deste tipo celular.

5.2.2. Determinação do conteúdo de glutathiona total

A determinação do conteúdo de glutathiona total foi realizada de acordo com o método descrito por Anderson, (1985), que está baseado na oxidação total da glutathiona reduzida (GSH) presente em uma amostra a sua forma oxidada (GSSG), mediante a incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). O DTNB reduzido adquire uma coloração amarelada, que pode ser determinada espectrofotometricamente. O GSSG gerado é reduzido por ação da enzima glutathiona redutase na presença de NADPH. O GSH formado se oxida novamente, gerando um ciclo contínuo, no qual a velocidade de redução do DTNB (com o seu consequente incremento de absorbância a 412 nm) é proporcional à quantidade total

de glutationa (GSH+GSSG). Os resultados foram expressos como nanomoles por grama de tecido.

5.2.3. Determinação dos níveis de citocinas

Os níveis de IL-1 β , INF- γ e TNF- α foram determinados a partir de amostras de cólon pesadas e homogeneizadas em solução de PBS (tampão fosfato sódico), pH 7.2, na proporção de (1:5) peso/volume a 4°C. Após homogeneização as amostras foram agitadas em banho-maria à 37°C durante 20 minutos e após isso centrifugadas a 10.000 RPM por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado em freezer - 80°C até a realização da dosagem. Os níveis das referidas citocinas foram determinados por kit de imunoenensaio (ELISA), e os valores obtidos foram expressos em pg/mg de proteína que foi determinada segundo metodologia adaptada de Rodríguez-Cabezas et al., (2002).

5.3. Avaliação microscópica das amostras de cólon

Imediatamente após a avaliação macroscópica, amostras de tecido localizadas a 0,5 cm da lesão foram coletadas e fixadas em ALFAC (álcool 80%, formaldeído e ácido acético) por 48 horas. Após fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações etanólicas crescentes, diafanizadas em xilol, incluídas em parafina, cortadas em micrótomo de maneira seriada (3 μ m de espessura), desparafinizadas, reidratadas e coradas com hematoxilina e eosina.

A análise morfológica das lesões e determinação do escore foi realizada com base nos parâmetros propostos por Stucchi et al., (2000) (Tabela 3).

Tabela 3. Critério de avaliação microscópico de lesão colônica.

Local do Dano	Critérios para Avaliação
Mucosa	1. Ulceração: (0) Nenhum; (1) Suave; (2) Moderado; (3) Severo
Criptas	2. Atividade Mitótica: (0) Nenhum; (1) Suave; (2) Moderado; (3) Severo 3. Depleção de Muco: (0) Nenhum; (1) Suave; (2) Moderado; (3) Severo
Lâmina Própria	4. Infiltrado Mononuclear: (0) Nenhum; (1) Suave; (2) Moderado; (3) Severo 5. Infiltrado Granulocítico: (0) Nenhum; (1) Suave; (2) Moderado; (3) Severo 6. Vascularidade: (0) Nenhum; (1) Suave; (2) Moderado; (3) Severo
Submucosa	7. Infiltrado Mononuclear: (0) Nenhum; (1) Suave; (2) Moderado; (3) Severo 8. Infiltrado Granulocítico: (0) Nenhum; (1) Suave; (2) Moderado; (3) Severo 9. Edema: (0) Nenhum; (1) Suave; (2) Moderado; (3) Severo

Escore Máximo: 27, modificado de Stucchi et al., 2000.

6. Efeitos não específicos do consumo prolongado de *Persea americana*

Mill.

Adicionalmente foram realizados estudos para avaliação dos efeitos não específicos do consumo da dieta enriquecida com a polpa de *Persea americana* Mill. na concentração de 20%, por meio de testes comportamentais e avaliações macroscópica e microscópica de órgãos-alvos e bioquímicos do soro dos animais.

6.1. Triagem Farmacológica comportamental

Durante todo período de tratamento os animais foram avaliados quanto à evolução do peso corporal e alterações comportamentais, como irritabilidade, vocalização e piloereção. Além disso, foram realizados testes de ansiedade nos animais que receberam dieta normal (controle negativo) e nos animais que receberam a dieta enriquecida com abacate a 20%, por meio do teste do labirinto em cruz elevado, além da avaliação da atividade exploratória e locomotora no teste do campo aberto.

Para realização do teste do labirinto em cruz elevado os animais foram colocados em um aparelho formado por dois braços cercados por paredes e sem cobertura, que medem aproximadamente 50 cm de comprimento por 10 cm de largura e 30 cm de altura, colocados perpendicularmente a outros dois braços abertos com o mesmo comprimento e largura, estando o conjunto elevado em relação ao assoalho. Neste teste os ratos foram colocados na junção dos quatro braços do labirinto, de frente para um braço aberto e o número de entradas e o tempo de permanência em cada braço foram registrados por um sistema de vídeo e simultaneamente observados durante 5 minutos (WALF; FRYE, 2007). Também observou-se a exploração das extremidades dos braços abertos e comportamentos indicativos de avaliação de risco (GRAEFF; GUIMARÃES, 1999; WALF; FRYE, 2007), porém estes não foram quantificados.

No teste do campo aberto os animais foram colocados em uma arena circular, pintada de branco, medindo 55 cm de diâmetro por 40 cm de altura. O piso da arena é dividido em três círculos concêntricos (15, 34 e 55 cm de diâmetro, respectivamente), que, por sua vez, são subdivididos em um total de 16 segmentos (quadrantes), tendo ainda um círculo central (WALSH; CUMMINS, 1976; ALMEIDA, 2006). Neste teste cada animal foi colocado no centro do aparelho onde avaliou-se a atividade exploratória dos animais durante 5 minutos por meio dos seguintes parâmetros: número de segmentos invadidos (movimentação espontânea), número de comportamentos de levantar (rearing) (MONTGOMERY, 1955; PRUT et al., 2003).

6.2. Avaliação macro e microscópica dos órgãos

Após a morte dos animais os órgãos-alvo: coração, pulmões, fígado, baço e rins foram pesados e avaliados macroscopicamente. Os órgãos que apresentaram

alteração de peso foram submetidos a preparo histológico, conforme descrito anteriormente para posterior análise histológica.

6.3. Avaliação bioquímica do soro

Para análise de parâmetros bioquímicos, após a decapitação, o sangue dos animais foi coletado em tubos adequados, mantidos em temperatura ambiente por 30 min e centrifugados a 4000 RPM por 20 min. Amostras de soro foram aspiradas e estocadas em freezer - 80°C até a análise bioquímica em aparelho do tipo Cobas Mira Plus® Chemistry Analyzer (Roche Diagnostic Systems, USA), do laboratório de análises clínicas do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp de Botucatu. Foram avaliados: colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamil-transferase (GGT), uréia, creatinina, albumina, proteinúria, triglicerídeos e fosfatase alcalina.

7. Análise Estatística

Resultados expressos como média \pm erro padrão da média, foram analisados por teste de Análise de Variância (ANOVA) seguida por testes de significância. Dados não paramétricos foram expressos como mediana analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguido por teste a posteriori de Dunn, ou expressos por mediana com intervalo interquartil analisados por teste Mann-Whitney. Significância estatística foram consideradas para valores de $p < 0,05$.

IV. Resultados

FASE EXPERIMENTAL I

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com *Persea americana* nas concentrações de 5 ou 10%

Na Fase experimental I avaliou-se a atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com a espécie *Persea americana* (abacate) nas concentrações de 5 e 10%, a fim de verificar qual concentração seria a mais efetiva frente ao processo inflamatório intestinal induzido por TNBS em ratos.

1. Análise clínica dos animais e macroscópica

Durante todo o protocolo experimental os animais foram avaliados quanto ao consumo de ração e evolução do peso corpóreo.

Com relação ao consumo de ração do 1º ao 21º dia, todos os grupos apresentaram um consumo normal, demonstrando que a dieta enriquecida é palatável e bem aceita pelos animais. Após a indução do processo inflamatório intestinal, os animais que receberam a dieta enriquecida e os animais do grupo controle-TNBS apresentaram um baixo consumo de alimento, diferindo significativamente do grupo não-colítico, no entanto, a partir do 24º dia o consumo foi restabelecido igualando-se o consumo entre todos os grupos experimentais, conforme demonstrado na figura 1.

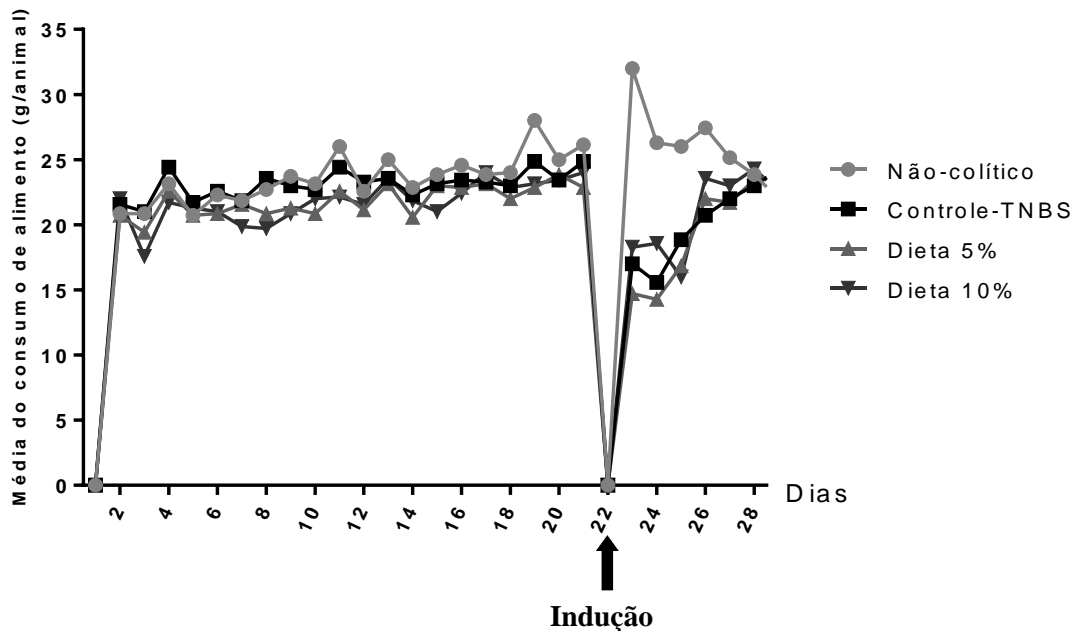


Figura 1. Consumo de ração por grupo. Dados expressos em consumo de ração (g)/número de animais por caixa (n=7).

Quanto ao peso corpóreo dos animais, foi possível observar, que todos os grupos apresentaram um ganho normal e gradativo de peso, do primeiro até o dia anterior a indução do processo inflamatório intestinal (21º dia). Após o jejum, os animais do grupo não-colítico voltaram a ganhar peso normalmente (22º dia), porém os animais aos quais se administrou TNBS apresentaram uma perda de peso significativa, nos primeiros dias após a indução, e a partir do 24º dia iniciaram uma recuperação do peso corpóreo, sendo que os grupos que receberam a dieta enriquecida nas concentrações de 5 e 10% apresentaram um maior ganho de peso em comparação com os animais do grupo controle-TNBS até o 28º dia, conforme pode ser observado na figura 2, porém tal diferença não foi significativa.

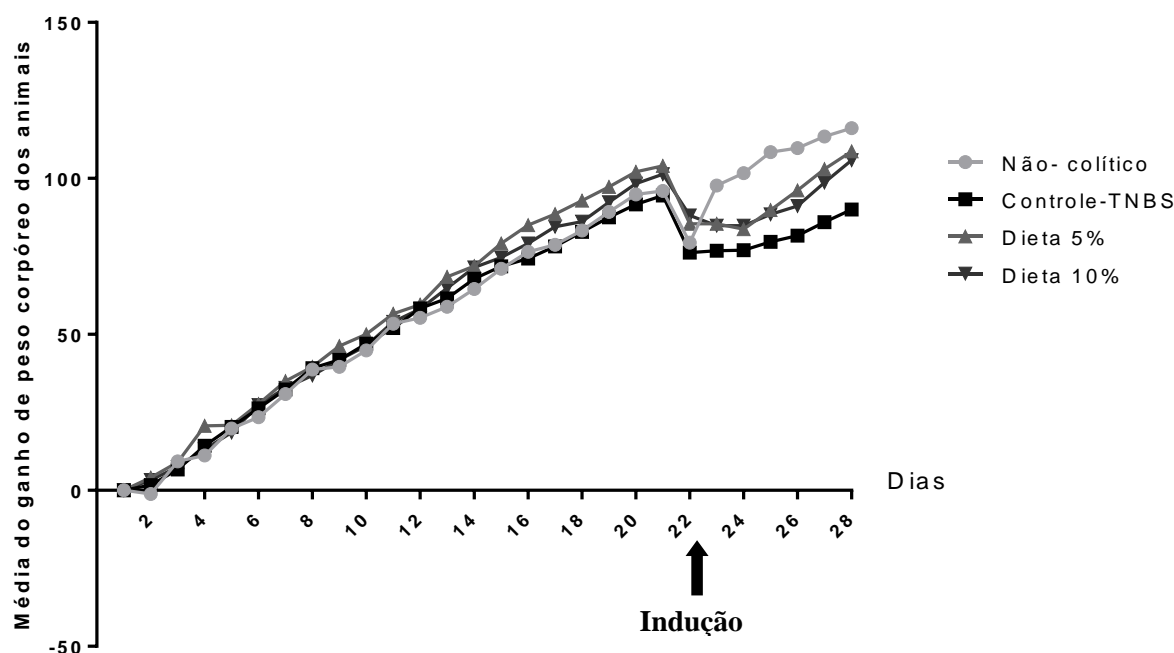


Figura 2. Média do ganho de peso corpóreo dos animais. Dados expressos em média (Peso final – Peso inicial) X 100/ Peso inicial) (n=7).

Quanto aos parâmetros macroscópicos, diarreia, escore, extensão da lesão e relação peso/comprimento colônico, apesar de não haver diferença estatística significativa, os animais que receberam a dieta enriquecida na concentração de 10% apresentaram uma tendência em diminuir a extensão da lesão, a relação peso/comprimento colônico e ocorrência de diarreia em comparação com o grupo controle TNBS (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos animais que receberam dieta enriquecida com *Persea americana* (5 e 10%) no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

Grupo	Escore macroscópico (0-10) ^a	Extensão da lesão (cm) ^b	Relação Peso/Comprimento (mg/cm) ^b	Diarreia (%) ^c
Não-colítico	0**	0**	107,65±4,79**	0%*
Controle-TNBS	6,5(4-9)	2,78±0,32	194,91±17,06	71,42%
Dieta 5%	7(4-9)	2,24±0,23	173,90±12,23	57,14%
Dieta 10%	7(4-8)	2,13±0,25	163,83±9,65	42,85%

^a Valores de escore expressos em mediana (intervalo) e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, ^b extensão da lesão e relação peso/comprimento colônico expressos em média ± E.P.M. e analisados por (ANOVA) seguida por teste *a posteriori* de Dunnett. ^c Valores de diarreia expressos em (%) e foram analisados por teste exato de Fisher. Todos os grupos comparados ao grupo controle-TNBS onde **<0,01 e *<0,05.

2. Análises bioquímicas

Os animais que receberam a dieta enriquecida com abacate, tanto na concentração de 5% quanto de 10%, não apresentaram uma diminuição significativa na atividade da enzima MPO em comparação ao grupo controle-TNBS (Figura 3).

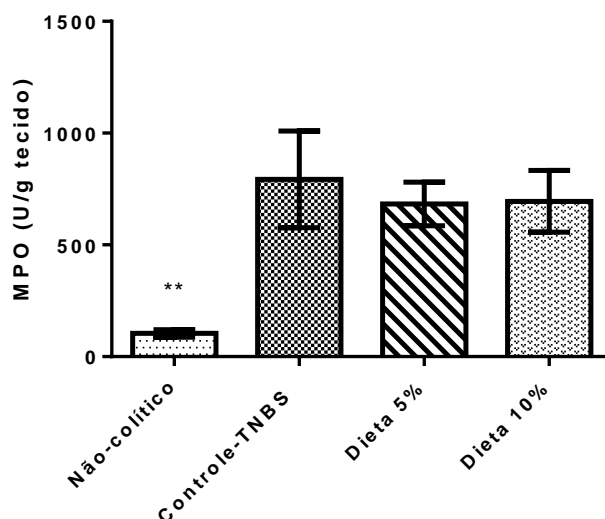


Figura 3. Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Dados expressos em média \pm E.P.M. com $**p < 0,01$, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.

Com relação à determinação do conteúdo de glutathiona total colônica, nossos resultados demonstraram que o consumo da dieta enriquecida com abacate na concentração de 10% evitou a depleção do seu conteúdo em comparação com o grupo controle-TNBS, conforme demonstrado na figura 4.

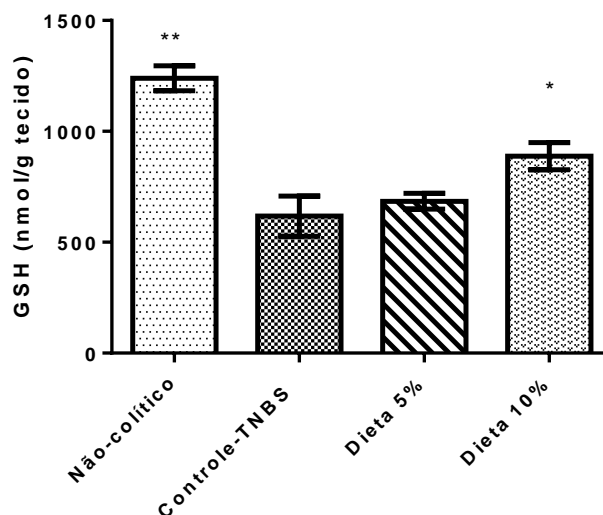


Figura 4. Avaliação do conteúdo de glutatona total (GSH) colônico. Dados expressos em média \pm E.P.M. com * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.

Quanto às citocinas, nossos resultados demonstraram que os níveis de TNF- α e IL-1 β encontraram-se significativamente aumentados nos animais do grupo controle-TNBS (Figura 5 A e 5 B). Já os animais que receberam a dieta enriquecida com 5 e 10% não apresentaram uma redução significativa nos níveis de TNF- α (Figura 5 A), porém o consumo da dieta a 10% foi capaz de diminuir significativamente os níveis de IL-1 β em comparação aos animais do grupo controle-TNBS (Figura 5 B). Na análise de INF- γ , nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos experimentais (Figura 5 C).

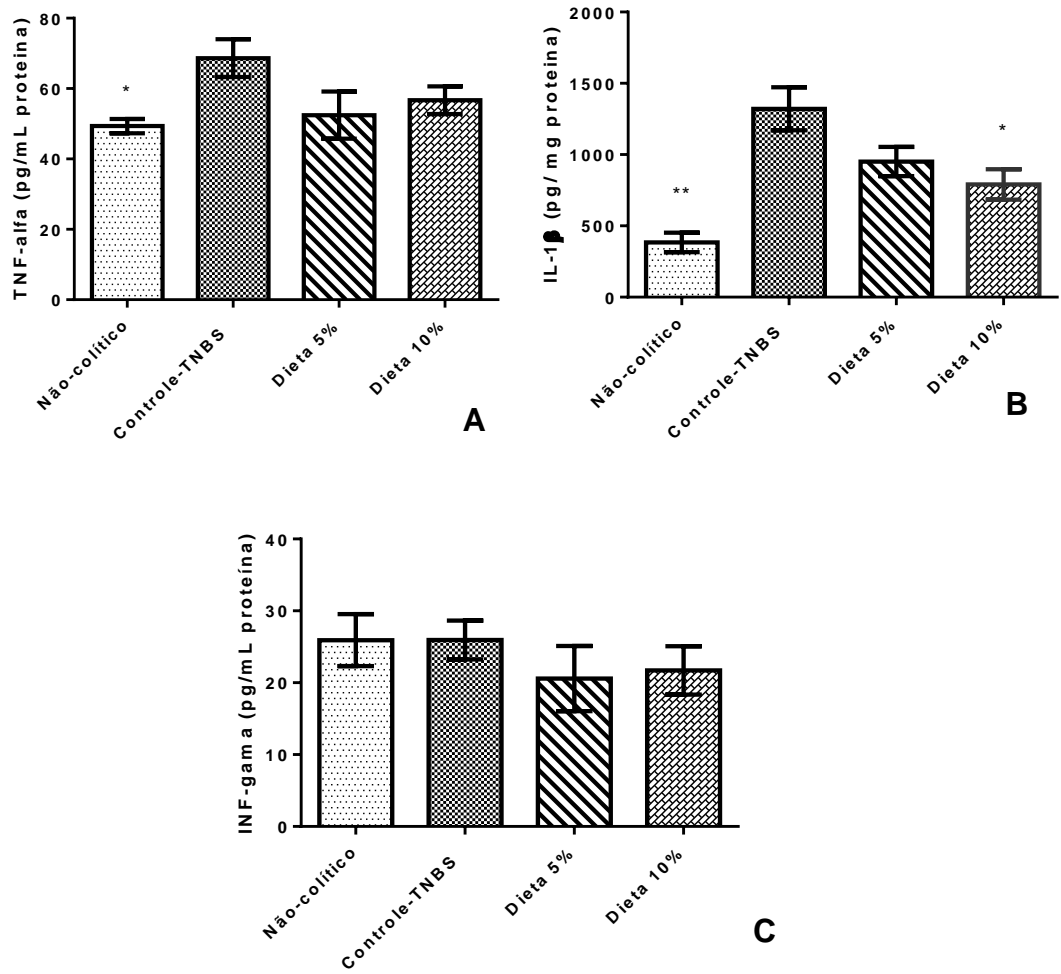


Figura 5. Avaliação dos níveis de IL-1 β , TNF- α e INF- γ no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. com * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.

FASE EXPERIMENTAL II

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com *Persea americana* na concentração de 20% e de sua associação com 5-ASA.

Nesta fase experimental, avaliamos a atividade da dieta enriquecida com a polpa de abacate na concentração de 20%, bem como de sua associação com o fármaco de referência 5-ASA na dose de 50 mg/Kg. Adicionalmente, avaliamos os efeitos do consumo prolongado da dieta enriquecida com a polpa de abacate na concentração de 20% em animais saudáveis (não-colíticos).

1. Avaliação macroscópica

Assim como observado na fase experimental I, do 1º ao 21º dia, todos os grupos apresentaram um consumo de alimento normal. Após a indução do processo inflamatório intestinal todos os grupos colíticos apresentaram um baixo consumo de alimento, diferindo significativamente dos animais do grupo não-colítico. A partir do 24º dia houve um aumento gradativo do consumo até o 28º dia, aproximando-se do consumo dos animais do grupo não-colítico, porém nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos experimentais, conforme demonstrado na figura 6.

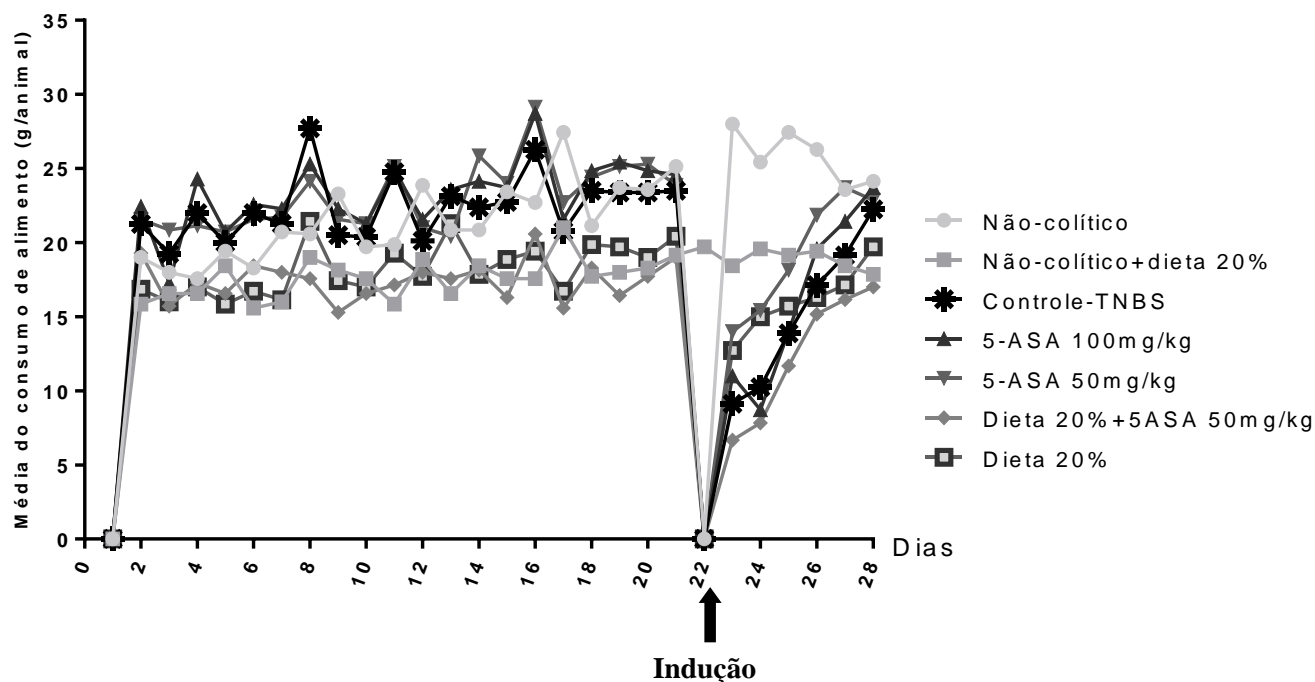


Figura 6. Média do consumo de ração por grupo. Dados expressos em consumo de ração (g)/número de animais por caixa (n=7).

Quanto à evolução do peso corpóreo dos animais, foi possível observar um ganho de peso normal até o 21º. Após a indução houve uma perda de peso significativa nos primeiros dias nos animais aos quais se induziu o processo inflamatório intestinal em comparação com os animais não-colíticos. A partir do 24º dia, os animais colíticos iniciaram uma recuperação natural do peso corpóreo, o que pode ser observado até o 28º dia, não havendo nenhuma diferença significativa no ganho de peso entre esses grupos, em comparação com o grupo controle-TNBS (Figura 7).

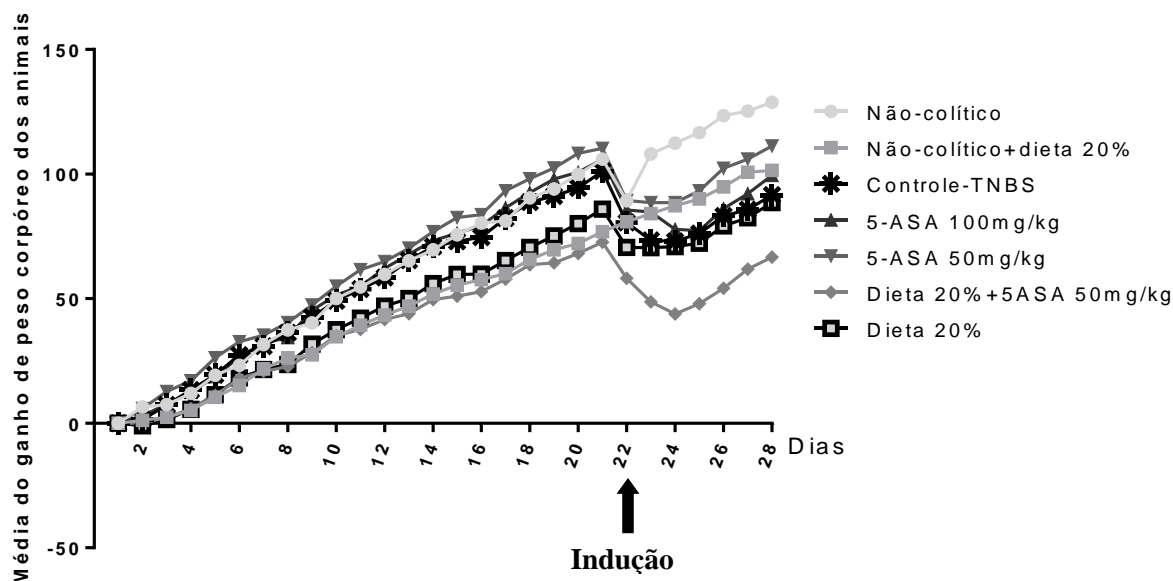


Figura 7. Média do ganho de peso corpóreo dos animais. Dados expressos em média (Peso final – Peso inicial) X 100/ Peso inicial) (n=7).

Com relação à avaliação dos parâmetros macroscópicos, os animais que receberam a dieta enriquecida na concentração de 20% diminuíram significativamente a relação peso/comprimento colônico e a extensão da lesão, e embora não seja significativo, também apresentaram um menor escore macroscópico e uma menor incidência de diarreia (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos animais que receberam dieta enriquecida com *Persea americana* (20%) e sua associação com 5-ASA no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

Grupos	Escore macroscópico (0-10) ^a	Extensão da lesão (cm) ^b	Relação Peso/Comprimento (mg/cm) ^b	Diarreia (%) ^c
Não-colítico	0**	0**	96,06±6,4**	0,00*
Não-colítico + dieta 20%	0**	0**	95,46±16,0**	0,00*
Controle-TNBS	8 (6-10)	2,6±0,79	199,24±57,36	62,50
5-ASA 100mg/Kg	9 (7-9)	2,68±0,35	199,40±27,23	85,71
5-ASA 50mg/Kg	8 (1-9)	2,42±0,48	176,65±42,21	100,00
Dieta 20% + 5-ASA 50mg/Kg	8 (6-8)	2,58±0,30	174,03±18,0	83,33
Dieta 20%	5 (0-8)	1,38±0,99**	151,03±31,45*	42,85

^a Valores de escore expressos em mediana (intervalo) e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, ^b extensão da lesão e relação peso/comprimento colônico expressos em média ± E.P.M. e analisados por (ANOVA) seguida por teste *a posteriori* de Dunnett. ^c Valores de diarreia expressos em (%) e foram analisados por teste exato de Fisher. Todos os grupos comparados ao grupo controle-TNBS onde **<0,01 e *<0,05.

3. Análises bioquímicas

O consumo da dieta enriquecida na concentração de 20% promoveu uma diminuição significativa na atividade da enzima MPO em comparação com o grupo controle-TNBS (Figura 8), sendo que somente essa intervenção foi capaz de diminuir os níveis dessa enzima.

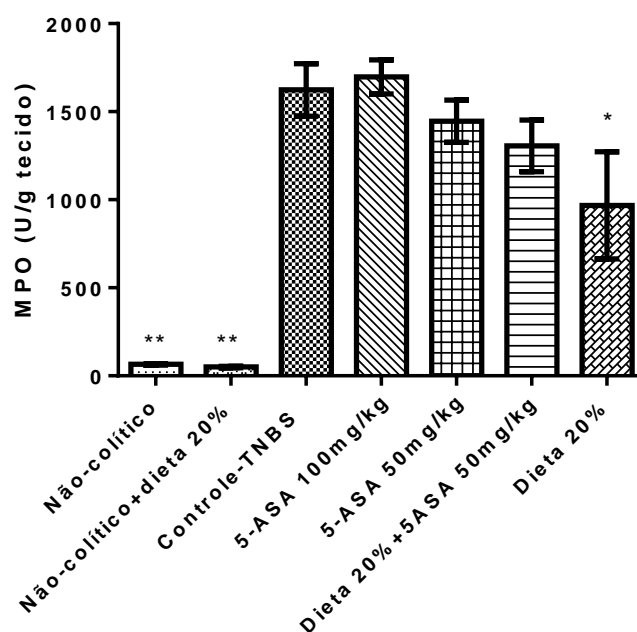


Figura 8. Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Dados expressos em média \pm E.P.M. com * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.

Com relação ao conteúdo de glutathiona, nossos resultados demonstraram que os animais do grupo controle-TNBS após 7 dias da indução do processo inflamatório intestinal, apresentaram uma depleção do conteúdo da GSH intracelular em comparação com os animais não-colíticos. Porém, pudemos observar que os animais que consumiram a dieta enriquecida 20% e a associação (Dieta + 5-ASA na dose de 50 mg/Kg) foram capazes de evitar significativamente a depleção de GSH em comparação com o grupo controle-TNBS (Figura 9).

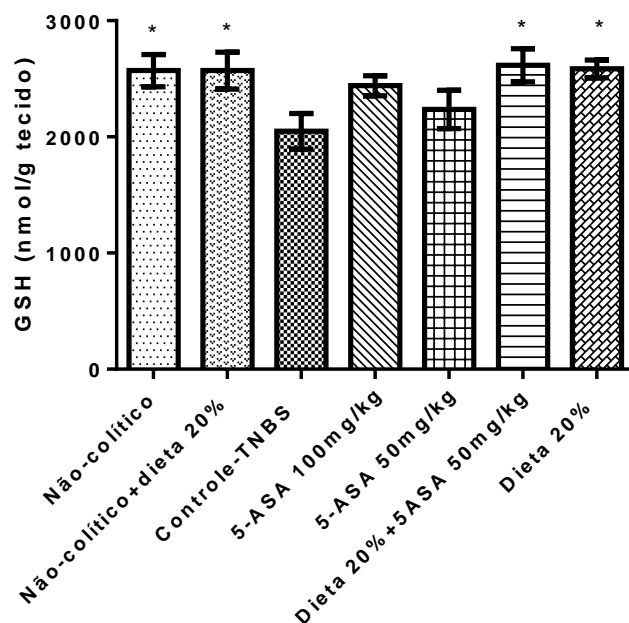


Figura 9. Avaliação do conteúdo de glutatona total (GSH). Dados expressos em média \pm E.P.M. com $*p < 0,05$, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.

Quanto as citocinas pró-inflamatórias, foi observado um aumento nos níveis de TNF- α e IL-1 β no grupo controle-TNBS em comparação com os animais não-colíticos. Os animais que receberam a dieta enriquecida a 20% apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de TNF- α e IL-1 β , quando comparados aos animais do grupo controle-TNBS. Também observamos uma diminuição nos níveis de TNF- α nos animais tratados com 5-ASA na dose de 50 mg/Kg, assim como nos animais do grupo da associação (Figura 10 A e 10 B).

Com relação ao INF- γ , os resultados obtidos no presente estudo, demonstraram que não houve diferença significativa entre os animais não-colíticos e os animais do grupo controle-TNBS. Porém, pudemos observar que os animais colíticos que receberam a dieta enriquecida a 20% e os animais tratados com 5-ASA na dose de 50 mg/kg apresentaram níveis significativamente menores de INF- γ , quando comparados ao grupo controle-TNBS (Figura 10 C).

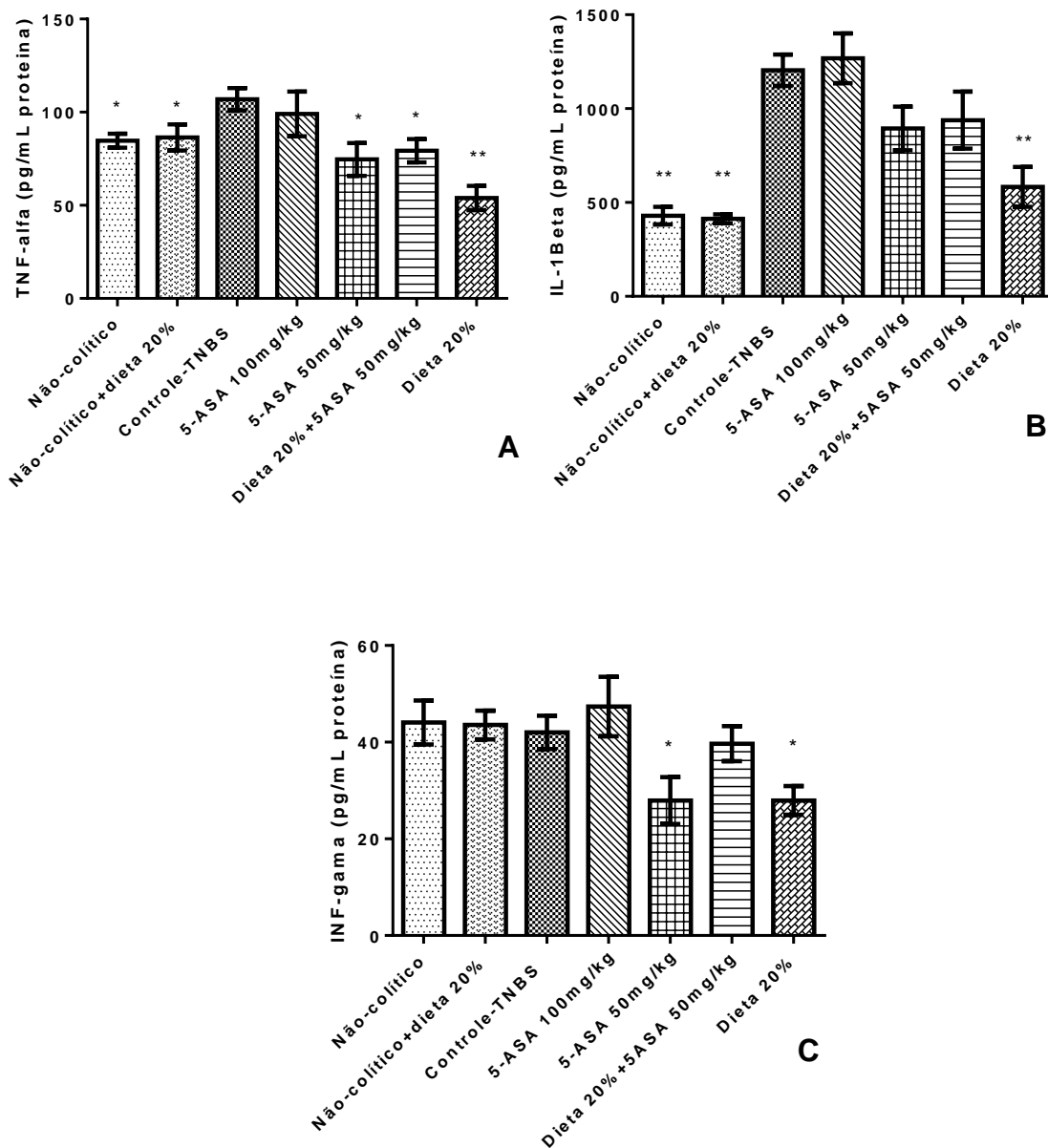


Figura 10. Avaliação dos níveis de TNF- α (A), IL-1 β (B), e INF- γ (C) no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. com * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle-TNBS.

4. Análises microscópicas

A análise histológica demonstrou que os animais do grupo controle-TNBS apresentaram uma severa alteração da citoarquitetura colônica, com ulceração envolvendo todas as camadas do cólon, presença de edema, intensa infiltração de células inflamatórias e depleção de muco (Figura 11 C) em comparação com os

animais não-colíticos (Figura 11 A e B), o que também foi expresso através do escore microscópico (Figura 12).

Já os animais que receberam a dieta enriquecida a 20% apresentaram uma menor ulceração e desestruturação da citoarquitetura colônica, menor infiltração de células inflamatórias, tanto na camada mucosa quanto na submucosa, e menor depleção de muco e também a presença de acúmulo de muco na superfície da mucosa. No entanto, apesar da evidente melhora histológica no processo inflamatório intestinal dos animais que receberam a dieta enriquecida, e estes apresentarem um menor escore microscópico, não houve diferença estatística entre estes e o grupo controle-TNBS, conforme demonstrado na figura 11 F e no escore (Figura 12).

Os animais que receberam o tratamento com 5-ASA na dose de 50 mg/kg apresentaram uma menor alteração da citoarquitetura colônica, porém com inflamação intensa na camada mucosa, evidenciada por uma grande infiltração de células inflamatórias e depleção de muco, e presença de vascularização na camada submucosa e edema (Figura 11 D). Enquanto os animais do grupo associação (dieta enriquecida + 5-ASA) apresentaram uma histologia semelhante aos animais tratados com 5-ASA na dose de 50 mg/kg, porém menor infiltração de células inflamatórias e vascularização na camada submucosa (Figura 11 E).

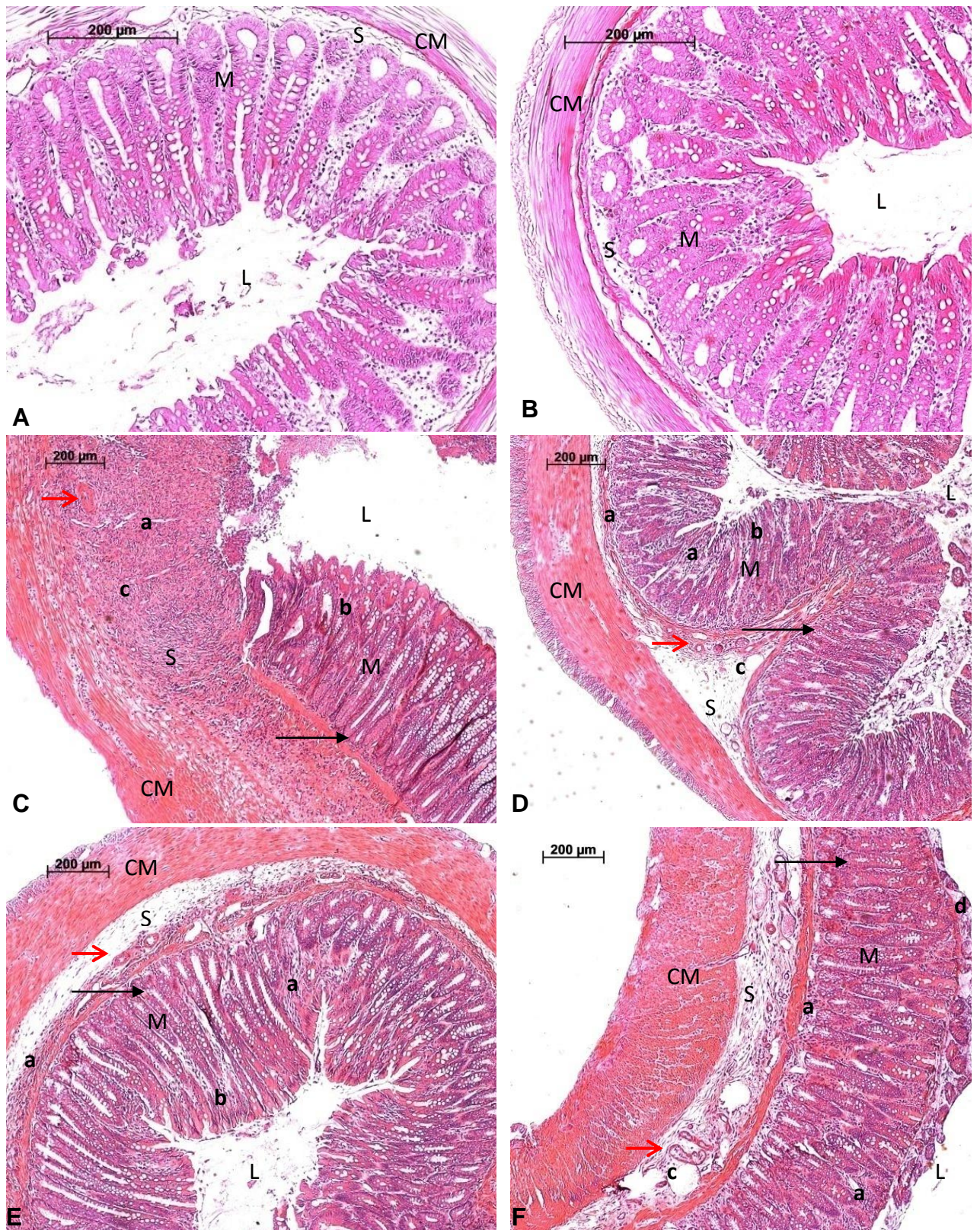


Figura 11. Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais 7 dias após a administração do TNBS. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). Microfotografadas com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 5X. (A) Grupo não-colítico, (B) Grupo não-colítico + dieta 20%, (C) Grupo controle-TNBS, (D) Grupo 5-ASA 50 mg/Kg, (E) Grupo dieta 20%+5-ASA 50 mg/Kg e (F) Grupo dieta 20%. L=lúmen, M=mucosa, S=submucosa, CM=camada muscular, a=infiltração celular, b=alteração da citoarquitetura, c=edema, d=secreção do muco, seta preta=depleção do muco e seta vermelha=vascularização.

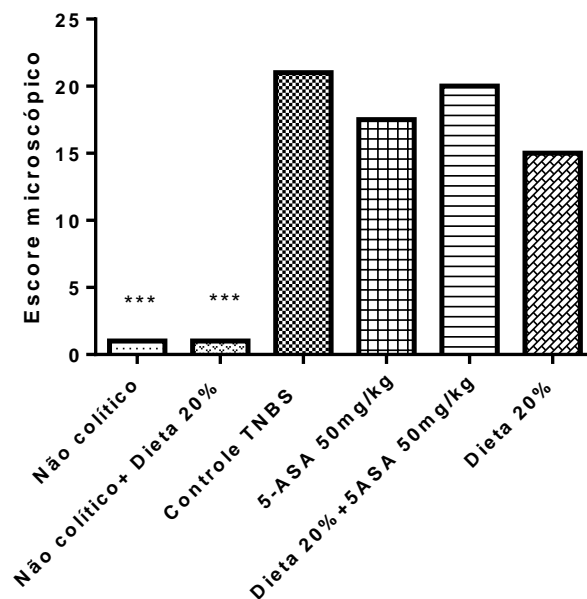


Figura 12. Escore microscópico expresso em mediana, analisados estatisticamente por teste Dunn com teste a posteriori de Kruskal-Wallis vs. grupo controle-TNBS, onde ** $p < 0,01$.

5. Efeitos não específicos do consumo prolongado da espécie *Persea americana* Mill.

Devido a caracterização da atividade anti-inflamatória intestinal apresentada pela espécie *Persea americana* no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos, realizamos a avaliação dos efeitos do consumo prolongado da espécie em animais normais (não-colíticos).

5.1. Triagem farmacológica comportamental

Nenhuma alteração comportamental foi observada durante todo o período de experimentação, como por exemplo, na aparência geral do animal, ocorrência de frêmito vocal, irritabilidade, ataxia, tremores, convulsões, straub, lacrimação, ptose, piloereção ou alteração na respiração.

Na avaliação comportamental de ansiedade, realizada através do teste do labirinto em cruz elevado, foi possível observar que os ratos, apesar de explorarem ambos os braços, abertos e fechados, ambos os grupos, da dieta normal e da dieta enriquecida a 20%, apresentaram um maior número de entradas e maior tempo de

permanência nos braços fechados conforme demonstrado na tabela 6, não havendo diferença entre os grupos.

Tabela 6. Número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados no labirinto em cruz elevado.

	Dieta normal	Dieta enriquecida
Braço Aberto	6 (4-6)	5 (5-7)
	81 (55-99)	72 (53-80)
Braço Fechado	9 (7-9)	9 (8-10)
	179 (128-205)	143 (128-174)

Número de entradas (linha cinza) e tempo de permanência em segundos (linha branca). Valores expressos em mediana (intervalo interquartil). Dados comparados utilizando o teste Mann-Whitney.

Na avaliação da atividade exploratória, realizada através do teste do campo aberto, observamos que ambos os grupos apresentaram atividade exploratória muito semelhante de acordo com o número de levantamentos e quadrantes atravessados, não apresentando nenhuma diferença significativa entre os grupos conforme mostrado na tabela 7.

Tabela 7. Avaliação dos movimentos de levantamento e do número de quadrantes percorridos no campo aberto.

	Dieta normal	Dieta enriquecida
Levantamento	33 (27-48)	37 (26-41)
Quadrantes percorridos	78 (63-99)	97 (70-113)

Valores expressos em mediana (intervalo interquartil). Dados comparados utilizando o teste Mann-Whitney.

5.2. Avaliação macro e microscópica dos órgãos

Na avaliação dos órgãos nossos resultados demonstraram que não houve nenhuma alteração macroscópica em todos os órgãos avaliados. Quanto à diferença de peso, somente o fígado apresentou um aumento significativo no grupo que consumiu a dieta enriquecida a 20%, conforme demonstrado na tabela 8.

Tabela 8. Avaliação do peso dos órgãos dos animais que consumiram dieta enriquecida com a polpa de *Persea americana* (20%) por 28 dias.

Grupo	Peso corpóreo	Peso Baço	PO/PC	Peso coração	PO/PC	Peso Fígado	PO/PC	Peso Pulmão	PO/PC	Peso Rins	PO/PC
Dieta normal	292±17	0,69±0,10	0,23±0,03	0,97±0,08	0,33±0,01	11,21±0,80	3,83±0,12	1,65±0,21	0,56±0,07	2,06±0,10	0,70±0,02
Dieta enriquecida	270±20	0,59±0,12	0,21±0,03	0,86±0,06	0,32±0,01	12,45±1,22	4,60±0,02***	1,37±0,53	0,50±0,18	1,92±0,13	0,71±0,05

Valores expressos média ± E.P.M analisados pelo teste de Mann-Whitney, onde ***p<0,001. Relação dada pelo peso do órgão (PO) dividido pelo peso corpóreo (PC) x 100 (g).

Devido ao aumento no peso do fígado no grupo que consumiu a dieta enriquecida, esse órgão foi submetido à análise microscópica. No entanto, não observamos nenhuma alteração ou dano no fígado dos animais que receberam a dieta enriquecida com abacate a 20%, ambos os grupos apresentaram uma morfologia semelhante e normal (Figura 13).

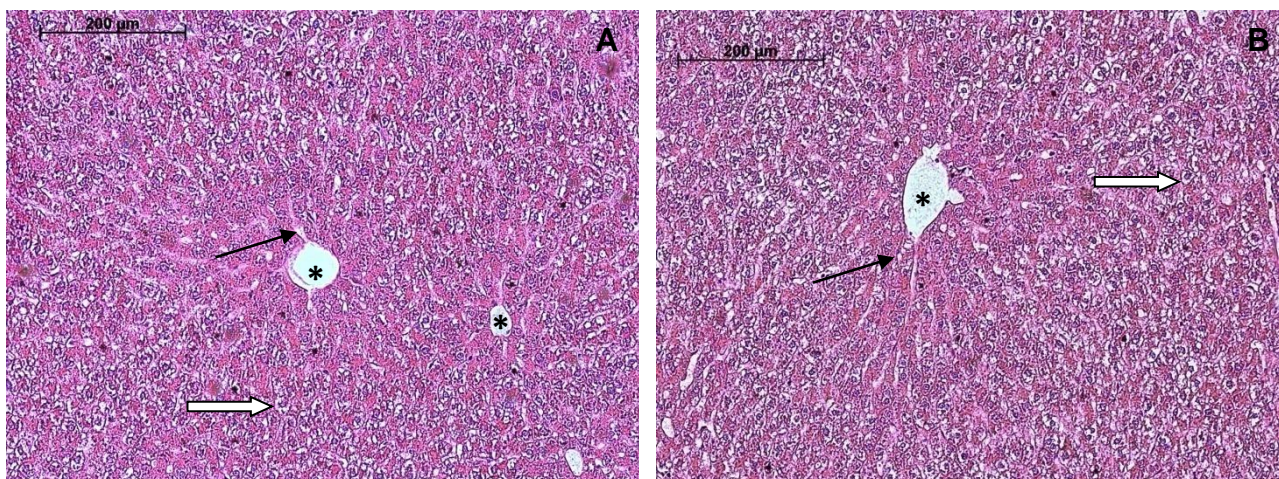


Figura 13. Análise histológica do fígado de ratos que consumiram dieta normal (A) ou dieta enriquecida (B). Capilares sinusóide (seta preta); vaso centrol-lobular (asterisco); hepatócito (seta branca).

5.3. Avaliações bioquímicas

5.3.1. Cólon

Os cólons dos animais sem indução do processo inflamatório intestinal que consumiram a dieta enriquecida com a polpa de *Persea americana* na concentração de 20% ou dieta normal, por 28 dias, foram submetidos às análises bioquímicas (MPO, GSH, TNF- α , IL-1 β e INF- γ), e os resultados demonstraram que não houve nenhuma alteração comparando-se os dois grupos experimentais (Figuras 8, 9 e 10).

5.3.2. Soro

As análises bioquímicas do soro demonstraram que não houve diferença significativa nos níveis de colesterol total, VLDL, HDL, triglicerídeos, fosfatase alcalina, proteínas totais, albumina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, gama-glutamil-transferase e creatinina. Porém, observamos que

houve uma pequena redução nos níveis de uréia nos animais que consumiram a dieta enriquecida com abacate a 20%. Quanto aos níveis de LDL, os resultados obtidos inviabilizaram uma análise estatística, no entanto, foi possível observar que os animais que receberam a dieta normal apresentaram valores iguais ou menores que 6, enquanto os animais que receberam a dieta enriquecida apresentaram valores entre 6 e 8, com média aproximada de 7,5 (Tabela 9).

Tabela 9. Análise bioquímica do soro dos animais para avaliação de possíveis efeitos não específicos do consumo prolongado da dieta enriquecida com a polpa de *Persea americana* a 20%.

Análise do soro		
Parâmetros	Dieta normal	Dieta enriquecida
Alanina (ALT) (U/L)	96±8,14	73,28±27,36
Albumina (g/dL)	3,04±0,19	3,12±0,07
Aspartato (AST) (U/L)	296,71±30,81	278,28±81,17
Colesterol total (mg/dL)	75,85±4,05	78,71±4,78
Creatinina (mg/dL)	0,43±0,05	0,41±0,07
Fosfatase Alcalina (U/L)	344,28±112,49	406,42±71,11
GGT (U/L)	<1	<1
HDL (mg/dL)	56,28±0,48	56,71±0,48
LDL (mg/dL)	≤ 6,0	≤ 6,0 ≤ 8,0
Proteinúria (g/dL)	6,47±0,19	6,68±0,39
Triglicerídeos (mg/dL)	68,14±19,01	72,85±21,72
Uréia (mg/dL)	53,41±3,26	45,97±5,41**
VLDL (mg/dL)	13,62±3,80	14,57±4,34

Valores expressos média ± E.P.M analisados por teste T-Student, onde **p<0,01 e ***p<0,001. GGT (gama-glutamil-transferase), HDL (lipoproteínas de alta densidade), LDL (lipoproteínas de baixa densidade) e VLDL (lipoproteínas de muita baixa densidade).

V. Discussão

Novas abordagens para o tratamento das DII são importantes e necessárias, sendo uma interessante estratégia, o uso de alimentos funcionais. Diante disso, o presente estudo visou avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com a polpa de *Persea americana* Mill. (abacate).

Nossos resultados demonstraram que, a dieta enriquecida foi bem aceita pelos animais, pois o consumo foi semelhante à dieta normal. Após a indução do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS, houve uma redução no consumo alimentar dos animais colíticos, o que pode estar relacionado à dor abdominal e a diarreia durante a fase ativa da inflamação, o que conseqüentemente leva a perda de peso dos animais (CAMPOS et al., 2002), sendo necessário um período de recuperação para que os mesmos restabeleçam o consumo de alimento e o peso corpóreo (MORRIS et al., 1989), conforme demonstrado nas figuras 1, 2, 6 e 7.

A dieta enriquecida com *Persea americana* na concentração de 20% foi capaz de reduzir parâmetros macroscópicos, como a relação peso/comprimento colônico e a extensão da lesão (Tabela 5). A relação peso comprimento colônico, reflete de modo geral, a intensidade do processo inflamatório, que é caracterizado pelo edema no local da inflamação (NISHIMURA et al., 2010), o que promove aumento de peso do cólon, devido à migração de células inflamatórias e formação de exsudato, e acarreta no encurtamento do comprimento colônico e diminuição dessa relação. De forma que os resultados macroscópicos obtidos indicam que a dieta enriquecida na concentração de 20% promoveu melhora no processo inflamatório intestinal.

Além das alterações macroscópicas, o processo inflamatório intestinal é caracterizado por aumento de mediadores inflamatórios que encontram-se em intensa atividade após administração do TNBS, o que pode ser observado

bioquimicamente, através do aumento da atividade da enzima MPO, aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e INF- γ , bem como por uma redução do conteúdo de glutatona colônica, no grupo controle-TNBS em comparação com o grupo não-colítico.

A atividade da enzima MPO, é um importante marcador bioquímico que caracteriza a infiltração de neutrófilos e a intensidade da inflamação tecidual (KATO et al., 2003). Devido sua capacidade de catalisar a conversão do ânion cloro (Cl⁻) e peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso (HClO) que é secretado durante condições inflamatórias, esta enzima está associada a uma atividade pró-oxidativa e pró-inflamatória (LORIA et al., 2008) e sua atividade encontra-se significativamente elevada em diversos modelos experimentais de inflamação intestinal (SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004).

Nossos resultados demonstraram que o consumo da dieta enriquecida na concentração de 20% promoveu redução na atividade da enzima MPO (Figura 8), o que demonstra uma diminuição na infiltração de neutrófilos no local da inflamação, conforme também observado histologicamente, evidenciando a atividade anti-inflamatória intestinal do abacate.

Além disso, o aumento da atividade da enzima MPO nos processos inflamatórios leva a uma produção de radicais livres, que em elevada concentração, pode promover danos celulares e destruição tecidual, e conseqüentemente promover diminuição dos níveis de glutatona colônico (KIM et al., 2014; SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004; SÁNCHEZ-FIDALGO et al., 2007).

A glutatona é o principal sistema antioxidante endógeno, não enzimático (LOGUERCIO et al., 2003), que em sua forma reduzida interage com radicais livres, neutralizando-os, o que aumenta os níveis de sua forma oxidada no citoplasma

(CIRCU; AW, 2012; COSTA et al., 2015), forma esta que é facilmente depletada da célula, podendo esgotar seu conteúdo intracelular (KARP; KOCH, 2006; WHITE et al., 1994), isto é observado na DII, em que há uma grande produção de radicais livres (KARP; KOCH, 2006).

Estudos têm avaliado tratamentos, incluindo o uso de alimentos funcionais, para tentar melhorar os sistemas antioxidantes e reduzir o estresse oxidativo e consequentemente os danos na mucosa intestinal (DODDA et al., 2014; FRUET et al., 2012; MAZZOLIN et al., 2013; SCARMINIO et al., 2012; WITAICENIS et al., 2010).

Loguercio, et al. (2003) demonstraram que a suplementação com glutatona diminui o dano colônico, promove restauração nos níveis de GSH e cisteína e diminui a peroxidação lipídica em ratos, no modelo experimental de colite induzida por TNBS.

Nossos resultados evidenciaram que o consumo da dieta enriquecida com *Persea americana* tanto na concentração de 10% (Figura 4), quanto na concentração de 20%, evitaram a depleção da glutatona (Figura 9), assim como a associação (Dieta + 5-ASA). O abacate é rico em compostos antioxidantes, como por exemplo, a glutatona, o tocoferol e vários outros compostos polifenólicos (LI et al., 2013), que provavelmente são os responsáveis pela atividade antioxidante da espécie (SUN et al., 2002). Assim como observado em nossos resultados, Rodríguez-Carpena et al. (2011) também demonstraram que o extrato da polpa, semente e casca do fruto da espécie *Persea americana* apresenta alta atividade antioxidante *in vitro*. Nossos resultados evidenciaram que, ao menos em parte, os compostos fenólicos presentes na espécie estão relacionados com a manutenção no

conteúdo de GSH colônico, e conseqüentemente com os efeitos benéficos observados no processo inflamatório intestinal.

A inflamação intestinal também é caracterizada por um desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17 e INF- γ , e citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4, tal desequilíbrio é considerado o mecanismo central para o desenvolvimento da DII (HUR et al., 2012).

O TNF- α é uma das citocinas pró-inflamatórias mais importantes (CHO et al., 2011), pois sua secreção por monócitos e macrófagos ativados, pode promover apoptose das células epiteliais, rompimento da barreira e induzir a secreção de quimiocinas (CHO et al., 2011), além de contribuir com a ativação e recrutamento de neutrófilos em condições inflamatórias, como a DII (GÁLVEZ, 2014; PELLETIER et al., 2010). De fato, estudos evidenciam que os níveis de TNF- α encontram-se significativamente aumentados em pacientes com DII (KAISTHA; LEVINE, 2014; SINGH et al., 2015; SOUZA; FIOCCHI, 2016).

A IL-1 β , citocina pró-inflamatória produzida por vários tipos celulares como os monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais e células do músculo liso (OHAMA et al., 2003), também exerce papel chave na progressão da DII (CHO et al., 2011), está envolvida na iniciação e amplificação da resposta inflamatória, com conseqüente lesão do epitélio intestinal (AL-SADI; MA, 2007).

Nossos resultados demonstraram que o consumo da dieta enriquecida 20% promoveu uma redução significativa nos níveis tanto de TNF- α (Figura 10 A) como de IL-1 β (Figura 10 B) evidenciando a atividade anti-inflamatória intestinal da espécie.

Outra citocina avaliada no presente estudo foi o INF- γ , cuja produção, realizada principalmente por células T e Natural Killer (NK), é controlada por

citocinas produzidas, sobretudo, por macrófagos e monócitos, sendo as citocinas IL-12 e IL-18 as principais indutoras (DA SILVA et al., 2013; FRUCHT et al., 2001; GOLAB et al., 2000; YAMAGUCHI et al., 2005). O INF- γ juntamente com o TNF- α , podem estimular a apoptose das células do epitélio intestinal, contribuindo com o desenvolvimento da inflamação nesse local (MUKHERJEE et al., 2011).

Nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os animais do grupo não-colítico e os animais do grupo controle-TNBS. Apesar disso, foi possível observar que o consumo de dieta enriquecida 20% promoveu redução nos níveis de INF- γ (Figura 10 C), enfatizando ainda mais a atividade anti-inflamatória da espécie *Persea americana*.

Estudos recentes têm evidenciado que na inflamação intestinal, os níveis de INF- γ são mais elevados no início do processo inflamatório, ocorrendo um declínio ao longo do tempo (COSTA et al., 2015; FICHTNER-FEIGL et al., 2008; JIN et al., 2012; LUGER et al., 2008), o que pode ter ocorrido em nossos resultados por se tratar de animais colíticos 8 dias após a administração do TNBS.

A melhora no processo inflamatório intestinal colônico promovida pelo consumo da espécie *Persea americana* (20%), evidenciada pela redução significativa na extensão da lesão, na relação peso/comprimento colônico, na inibição da atividade da enzima MPO, redução dos níveis de TNF- α , IL-1 β e INF- γ e por evitar a depleção do conteúdo de GSH, também foi observada histologicamente, caracterizada por menor ulceração, infiltração de células inflamatórias e menor depleção de muco (Figura 11 F e Figura 12).

Essa importante atividade anti-inflamatória intestinal, associada a atividade antioxidante e anti-inflamatória da espécie, pode estar relacionada à presença de lipídeos bioativos, a presença de fibras e aos compostos fenólicos.

O fruto de *Persea americana* é reconhecido como uma fonte particularmente rica de lipídeos bioativos (LU et al., 2005; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ et al., 2013), também caracterizados como antioxidantes lipofílicos que podem penetrar nas membranas celulares, e atingir níveis mais elevados de biodisponibilidade do que antioxidantes hidrofílicos, como ácido ascórbico (vitamina C), que são normalmente excretados na urina (DURAND et al., 2015; KURAYA et al., 2015; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ et al., 2013). Dentre os antioxidantes lipofílicos presentes em seu fruto destacam-se o β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina e α -tocoferol (vitamina E).

Os carotenóides, β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, são provitaminas A, presentes em frutos e vegetais, que após ingeridos são convertidos no intestino em vitamina A, exercendo importante papel na diferenciação celular, modulação do sistema imune e na comunicação *gap junction* (KOPEC et al., 2014; WU et al., 2013) o que contribui com a manutenção da permeabilidade e integridade do epitélio intestinal.

Estudos demonstram que uma suplementação com vitamina A pode ter uma grande importância para a imunidade, estimulando a formação de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos, como as células T e B, contribuindo na prevenção de doenças inflamatórias (KIM, 2011; LIMA et al., 2010; ROSJO et al., 2014; SOBOUTI et al., 2013). Kang, et al. (2009) demonstraram que camundongos SAMP1/YP (modelo animal para Doença de Crohn) alimentados com vitamina A por aproximadamente 20 semanas apresentaram redução da inflamação intestinal.

A luteína e a zeaxantina, potenciais antioxidantes pertencentes ao grupo dos carotenóides, denominados xantofilas, também demonstraram capacidade de reduzir a inflamação (GRAYDON et al., 2012; ROBERTS et al., 2009; SASAKI et al., 2009).

Já o α -tocoferol ou vitamina E é um potente antioxidante e um dos mais importantes nas membranas biológicas, está presente em todas as células do corpo e é considerada a primeira linha de defesa contra a peroxidação lipídica e tem importante papel na função normal das células do sistema imune, podendo modular sua ação e limitar os efeitos tóxicos de EROS durante o processo inflamatório (PEKMEZCI, 2011). De forma que o uso de uma dieta enriquecida com vitamina E por um período de 4 semanas foi capaz de diminuir o estresse oxidativo e os níveis de IL-1 β , melhorando a inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos (GONZÁLEZ et al., 2001).

Além destes, a espécie *Persea americana* é rica em ácidos graxos, e recentes estudos têm demonstrado importante papel modulador dos ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oleico, e poli-insaturados, como os ômega 3 e 6, sobre vias metabólicas, antioxidantes e anti-inflamatórias, como as vias da ciclo-oxigenase (COX) e lipo-oxigenase (LOX), responsáveis pela produção de metabólitos inflamatórios (CALDER, 2012; CÁRDENO et al., 2014; DI FRANCESCO et al., 2015; HIGA et al., 2014; HOU et al., 2015; SÁNCHEZ-FIDALGO, 2010; 2013; SCARPA et al., 2008; VILADOMIU et al., 2015).

O ácido oleico representa aproximadamente 47% dos ácidos graxos presentes na espécie e tem sido descrito por sua atividade anti-inflamatória, através da modulação do sistema imune e da expressão de genes pró-inflamatórios, redução do estresse oxidativo, além de contribuir com a redução de LDL (HUANG et al., 2010; PÉREZ-MARTÍNEZ et al., 2011). Bem como por efeitos anti-inflamatórios em doenças auto-imunes, como diabetes, câncer de cólon e DII (CÁRDENO et al., 2014; PÉREZ-MARTÍNEZ et al., 2011; SALES-CAMPOS et al., 2013; SÁNCHEZ-FIDALGO et al., 2010).

Estudos demonstram que uma dieta enriquecida com azeite de oliva (rico em ácido oleico) promoveu redução da COX-2, na expressão de iNOS (SÁNCHEZ-FIDALGO et al., 2012), inibição da proliferação celular, regulação da atividade de PPAR- γ (Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma), inibição da expressão de genes pró-inflamatórios, como NF- κ B (SÁNCHEZ-FIDALGO, 2013) na mucosa colônica de camundongos submetidos à inflamação intestinal induzida por DSS.

Estudo realizado em pacientes com DII utilizou um complemento alimentar a base de óleo de oliva e observou que este foi capaz de modular a atividade de células T, reduzir INF- γ e promover um efeito pró-apoptótico (CÁRDENO et al., 2014).

O importante papel desempenhado pelos lipídeos bioativos, em especial pelos ácidos graxos frente a processos inflamatórios, sugerem que estes estejam relacionados, ao menos em parte, com a atividade anti-inflamatória intestinal da espécie *Persea americana*.

Além disso, o abacate é rico em fibras, sendo estas 75% do tipo insolúveis (celulose e lignina) e 25% solúveis (hemicelulose e pectina) (DREHER; DAVENPORT, 2013; NAVEH et al., 2002).

As fibras podem afetar a fisiologia do TGI alterando positivamente a viscosidade, motilidade, absorção de nutrientes, tempo de trânsito, esvaziamento e modulação da microbiota intestinal (NAVEH et al., 2002). Principalmente as insolúveis, que podem favorecer o aumento de bactérias benéficas no intestino e consequentemente a produção de ácidos graxos de cadeia curta, como butirato, acetato e proprionato, que desempenham papel na manutenção da saúde do cólon e na função de barreira, bem como têm ação anti-inflamatória (BLOEMEN et al., 2010;

HAMER et al., 2008, 2010; LOUIS; HOLD; FLINT, 2014; SLEETH et al., 2010; TEDELIND et al., 2007), especialmente o butirato, que pode acelerar a proliferação celular do epitélio colônico e reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (HAMER et al., 2010; HUDA-FAUJAN et al., 2010).

Estudo realizado em paciente com RCU que receberam uma dieta contendo cevada, por um período de 2 meses, demonstrou que esta foi capaz de reduzir os níveis de $TNF\alpha$, IL-8 e IL-6, melhorando os sintomas clínicos da doença (FAGHFOORI et al., 2014). Outro estudo realizado em pacientes com doença de Crohn que receberam por 4 semanas um mix contendo inulina e oligofrutose, fibras insolúveis, apresentaram um aumento de ácidos graxos de cadeia curta, como o acetato e o butirato, o que pode ter promovido uma melhora nos sintomas clínicos da doença (DE PRETER et al., 2013).

Estudos realizados em modelos animais também demonstraram que o consumo de polidextrose, uma fibra solúvel e dietética, foi capaz de diminuir os danos no cólon, por evitar a depleção de GSH e reduzir a atividade da enzima MPO em ratos no modelo do TNBS (WITAICENIS et al., 2010). Outro estudo realizado em camundongos no modelo de inflamação intestinal induzida por DSS, demonstrou que uma dieta enriquecida com fibras solúveis e insolúveis, por 14 dias, foi capaz de modular os níveis de IL-10, aumentar a produção de células T reguladoras e reduzir sintomas clínicos, como diarreia e perda de peso (HARTOG et al., 2015).

Diante disso, podemos inferir que as fibras também podem ter contribuído com a atividade anti-inflamatória intestinal apresentada pela dieta enriquecida com abacate.

Quanto ao tratamento com 5-ASA nossos resultados demonstraram que na dose 100 mg/kg, este não foi efetivo em nenhum dos parâmetros analisados e a dose de 50 mg/kg foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α e INF- γ .

Li et al. (2014) também observaram que a administração oral do 5-ASA na dose de 100 mg/Kg em ratos no modelo do TNBS, não promoveu redução nos níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α e também não diminuiu a atividade da enzima MPO, porém, quando administrado localmente no cécum foi capaz de promover atividade anti-inflamatória intestinal, por diminuir os níveis dessas citocinas e a atividade da enzima MPO.

De fato, estudos recentes evidenciaram melhores efeitos do 5-ASA encapsulado, em forma de pellets (KARROUT et al., 2014; XU et al., 2014) ou aplicação direta no cécum (LI et al., 2014), conferindo maior ação quando aplicado localmente (XU et al., 2014). Estudos sugerem que a eficácia clínica do 5-ASA não é dependente da absorção sistêmica e redistribuição para o órgão-alvo, mas sim de seus efeitos locais sobre o cólon (WILLIAMS et al., 2011).

Quanto à associação de 5-ASA com a dieta enriquecida observamos que esta foi capaz de evitar a depleção de GSH e reduzir os níveis de TNF- α , promovendo uma melhora menos evidente do que nos animais que receberam apenas a dieta enriquecida.

Estudos demonstram que a combinação de 5-ASA com outra terapia tradicional para a DII, como azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato, prednisona, infliximabe, entre outras, também não mostrou melhorar o ganho terapêutico ou minimizar a toxicidade de qualquer um dos fármacos. Em pacientes que não conseguiram atingir uma resposta terapêutica ao 5-ASA, a adição de outro medicamento mais potente, não aumentou o efeito do 5-ASA, nem da outra terapia.

Além disso, os fármacos 5-ASA têm forte potencial para interações medicamentosas (KAPLAN; PANACCIONE, 2008).

Um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, também evidenciou que cumarina ou 4-hidroxycumarina (4-OH) associada a diferentes doses de sulfassalazina não apresentaram a mesma atividade anti-inflamatória intestinal do que quando administradas isoladamente, resultados similares foram observados somente com a cumarina associada a sulfassalazina na dose de 5 mg/Kg e 4-OH com a dose de 15 mg/Kg (LUCHINI et al., 2008; LUCHINI, 2009), o que sugere que outras doses de 5-ASA devam ser avaliadas em associação com a dieta enriquecida.

Como foi caracterizada a importante atividade anti-inflamatória intestinal de *Persea americana*, foram realizados estudos para avaliar se o consumo da espécie por um tempo prolongado poderia causar algum efeito inespecífico em sua concentração efetiva.

O teste do labirinto em cruz elevado descrito por Montgomery, (1955), e modificado por Handley & Mithani, (1984), trata-se de um modelo que baseia-se no conhecimento de que ratos e roedores evitam locais abertos e elevados. Quando neles confinados, mostram sinais de medo (congelamento, defecação e micção) e aumento do nível plasmático do hormônio de estresse, cortisona (GRAEFF; GUIMARÃES, 1999). Os ratos, apesar de explorarem ambos os braços, abertos e fechados, tipicamente entram com maior frequência e permanecem por mais tempo nos braços fechados, refletindo um conflito pela preferência do roedor por áreas protegidas (braços fechados) e sua motivação inata para explorar novos ambientes (braços abertos) (WALF; FRYE, 2007). Nossos resultados demonstraram que ambos

os grupos apresentaram maior número de entradas e maior tempo de permanência nos braços fechados não havendo nenhuma diferença entre eles (Tabela 6).

Um dos testes comumente utilizado antes do labirinto em cruz elevado é o do campo aberto, devido ao fato de que animais colocados em um ambiente novo, antes da exposição ao labirinto em cruz elevado, tendem a aumentar a probabilidade de explorar os braços abertos (PELLOW et al., 1985; WALF; FRYE, 2007).

No teste do campo aberto, originalmente descrito por Hall, (1934) sujeita-se o roedor a um ambiente desconhecido, no qual o mesmo é impedido de escapar devido a paredes circundantes do campo aberto. Neste teste avalia-se a atividade exploratória dos animais, demonstrando que a tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado pelo novo ambiente (MONTGOMERY, 1955). Corroborando com os parâmetros descritos, foi possível observar que ambos os grupos apresentaram atividade exploratória muito semelhante de acordo com o número de levantamentos e quadrantes atravessados, não havendo nenhuma diferença entre os animais que receberam dieta normal ou dieta enriquecida (Tabela 7).

De acordo com os resultados obtidos no teste do labirinto em cruz elevado e no campo aberto, e com base na avaliação geral dos animais durante todo o período experimental, podemos inferir que o consumo prolongado da dieta enriquecida com abacate na concentração de 20% não promoveu nenhum efeito inespecífico nos parâmetros comportamentais avaliados.

Testes toxicológicos utilizam-se de comparações entre os pesos dos órgãos para avaliar possíveis efeitos tóxicos de produtos químicos, biológicos, alimentares e drogas (MICHAEL et al., 2007). Dentre os principais órgãos-alvos avaliados estão fígado, rins, coração, baço e pulmão (MICHAEL et al., 2007). Nossos resultados

evidenciaram que nenhum destes órgãos apresentaram alterações macroscópicas, porém os animais que consumiram a dieta enriquecida apresentaram um aumento no peso do fígado quando comparado aos animais que receberam a dieta normal (Tabela 8).

Estudos que avaliam efeitos tóxicos no fígado, comumente observam presença de gorduras, vasodilatação ou infiltrações de células inflamatórias (BRAI et al., 2014; MA et al., 2009; YOUNES et al., 2010). No entanto, não observamos nenhuma alteração ou dano no fígado dos animais que receberam dieta enriquecida, não sendo possível identificar histologicamente ou bioquimicamente o motivo que levou o órgão a apresentar tal aumento de peso.

Pelo contrário, estudos demonstram que o consumo da polpa de *Persea americana* pode interferir no metabolismo de gordura no fígado promovendo menor dano e teor de gordura hepática, além de preservar a estrutura dos hepatócitos (NAVEH et al., 2002; PAHUA-RAMOS et al., 2014) e promover atividade hepatoprotetora (BRAI et al., 2014; KAWAGISHI et al., 2001) efeitos estes atribuídos à presença da grande quantidade de ácido oleico (47,2%) e ácido linoléico (13,4%) presentes no fruto, que estão associados a supressão da atividade plasmática da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), protegendo o fígado contra lesões (KAWAGISHI et al., 2001).

As atividades séricas da ALT e AST são indicadores chaves de toxicidade hepática (TARRANT et al., 2013) e de acordo com os nossos resultados estas enzimas não apresentaram diferença nos dois grupos experimentais (Tabela 9), o que reforça os resultados histológicos, indicando que não houve nenhum efeito tóxico hepático.

Quanto aos demais parâmetros bioquímicos avaliados no soro, os animais que consumiram a dieta enriquecida apresentaram uma pequena redução nos níveis de uréia (Tabela 9). A diminuição da uréia é denominada de hipouremia e está relacionada com insuficiência hepática grave, aumento da diurese, redução do catabolismo proteico, gravidez normal e em indivíduos submetidos a dietas com baixo valor proteico e alto teor glicídico (MOTTA, 2009). É considerado hipouremia valores muito menores que a referência mínima de 51 mg/dL e esse parâmetro é mais usado em associação com a dosagem de creatinina, como prova de função renal. A dosagem de uréia e creatinina são os principais biomarcadores para avaliação de lesões renais comumente utilizados (WON et al., 2015).

Nossos resultados demonstraram que os níveis de uréia, dos animais que consumiram a dieta enriquecida, estão somente 13,9% menor do que o grupo que consumiu a dieta normal e não houve alteração nos níveis de creatinina, o que sugere ausência de alterações renais promovidas pela espécie em estudo.

Outros estudos também observaram que o consumo de *Persea americana* não promoveu nenhuma alteração no peso dos órgãos ou em análises bioquímicas dos animais (BRAI et al., 2014; OZOLUA et al., 2009; RAO; ADINEW, 2011), o que sugere que a espécie é segura para ser consumida, mesmo por um período prolongado.

Este estudo demonstrou que a espécie *Persea americana* incorporada na dieta dos animais na concentração de 20% promove atividade anti-inflamatória intestinal no modelo de indução por TNBS em ratos. Esta atividade está associada às atividades antioxidantes e anti-inflamatórias da espécie que provavelmente estão relacionadas a presença dos lipídeos bioativos, presença de fibras e de compostos fenólicos.

VI. Conclusão

De acordo com o objetivo proposto, os resultados e discussões apresentados, concluímos que:

- ✓ A dieta enriquecida com a polpa da fruta da espécie *Persea americana* na concentração de 20% apresenta atividade anti-inflamatória intestinal no modelo de indução por TNBS em ratos;
- ✓ A atividade anti-inflamatória intestinal da espécie é devida as suas propriedade antioxidantes e anti-inflamatórias, e provavelmente estão relacionadas com a presença de lipídeos bioativos, presença de fibras e de compostos fenólicos;
- ✓ O consumo da espécie na concentração efetiva, por um período prolongado, não promoveu nenhum efeito inespecífico considerável.

VII. Referências

- ALISSA, E. M.; FERNS, G. A. Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2012, p. 569486, jan. 2012.
- ALMEIDA, R. N. PSICOFARMACOLOGIA - Fundamentos Práticos. 1. ed. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan S.A.**, 2006
- AL-SADI, R. M.; MA, T. Y. IL-1 β Causes an Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability¹. **Journal Immunology**, v. 178, n. 7, p. 4641–4649, 2007.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. et al. Diabetes and the risk of infections with immunomodulator therapy in inflammatory bowel diseases. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 41, n. 11, p. 1141–1148, 2015.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, p. 205–217, 2015.
- ANDERSEN, C. J.; FERNANDEZ, M. L. Dietary strategies to reduce metabolic syndrome. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v. 14, n. 3, p. 241–54, set. 2013.
- ANDERSON, M. Glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymology**, v. 113, p. 548–555, 1985.
- BARABÁSI, A. Network medicine—from obesity to the “diseasome”. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 4, p. 404–407, 2007.
- BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **The Lancet**, v. 369, p. 1641–1657, 2007.
- BELL, C. J.; GALL, D. G.; WALLACE, J. L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **The American journal of physiology**, v. 268, p. G622–G630, 1995.
- BIONDO-SIMÕES, M.; MANDELLI, K. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 23, n. 3, p. 172–182, 2003.
- BLOEMEN, J. G. et al. Short chain fatty acids exchange: Is the cirrhotic, dysfunctional liver still able to clear them? **Clinical Nutrition**, v. 29, n. 3, p. 365–369, 2010.
- BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 7, p. 521–533, jul. 2003.
- BRAI, B. I. C.; ADISA, R. A.; ODETOLA, A. A. HEPATOPROTECTIVE PROPERTIES OF AQUEOUS LEAF EXTRACT OF PERSEA AMERICANA, MILL (LAURACEAE) “AVOCADO” AGAINST CCL4-INDUCED DAMAGE IN RATS. **African Journal of Traditional Complementary, and Alternative Medicines**, v. 11, n. 2, p. 237–244, 2014.
- BURISCH, J. et al. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. **Journal of Crohn’s and Colitis**, v. 7, n. 4, p. 322–337, 2013.
- CALDER, P. C. Fatty acids and immune function: relevance to inflammatory bowel diseases. **International Reviews of Immunology**, v. 28, n. 6, p. 506–534, 2009.
- CALDER, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: Nutrition or pharmacology? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 645–662, 2012.
- CAMPOS, F. G. et al. Inflammatory bowel diseases: principles of nutritional therapy. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 57, n. 4, p. 187–98, 2002.
- CÁRDENO, A. et al. The unsaponifiable fraction of extra virgin olive oil promotes apoptosis and attenuates activation and homing properties of T cells from patients with inflammatory bowel disease. **Food Chemistry**, v. 161, n. 2014, p. 353–360, 2014.
- CHEN, B.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Design of foods with bioactive lipids for improved

- health. **Annual review of food science and technology**, v. 4, p. 35–56, jan. 2013.
- CHO, E. et al. Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Patrinia scabiosaefolia* in mice with ulcerative colitis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 428–35, 2011.
- CHOI, S. H. et al. Synthetic triterpenoid induces 15-PGDH expression and suppresses inflammation-driven colon carcinogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 6, p. 2472–2482, 2014.
- CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Glutathione and modulation of cell apoptosis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1823, n. 10, p. 1767–77, out. 2012.
- CONTE, M. P. et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features. **BioMed Central**, v. 7, n. 748, p. 1–12, 2014.
- COSNES, J. et al. Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1785–1794.e4, 2011.
- COSTA, C. A. R. A. et al. Anti-inflammatory effects of Brazilian ginseng (*Pfaffia paniculata*) on TNBS-induced intestinal inflammation: Experimental evidence. **International Immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 459–469, 2015.
- DA SILVA, I. et al. Maturation of human iDCs by IL-18 plus PGE2, but not by each stimulus alone, induced migration toward CCL21 and the secretion of IL-12 and IFN- γ . **Immunobiology**, v. 218, n. 2, p. 238–44, 2013.
- DAMASKOS, D.; KOLIOS, G. Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: Microflora “on the scope”. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 65, n. 4, p. 453–467, 2008.
- DANESE, S. New therapies for inflammatory bowel disease: from the bench to the bedside. **Gut**, v. 61, n. 6, p. 918–32, 2012.
- DE OLIVEIRA, A. P. et al. Effect of semisolid formulation of persea americana mill (avocado) oil on wound healing in rats. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2013, p. 472382, jan. 2013.
- DE PRETER, V. et al. Metabolic profiling of the impact of oligofructose-enriched inulin in Crohn's disease patients: a double-blinded randomized controlled trial. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 4, n. 1, p. e30, 2013.
- DE SILVA, P. S. A. et al. Dietary arachidonic and oleic acid intake in ulcerative colitis etiology. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 26, n. 1, p. 11–18, 2014.
- DI FRANCESCO, A. et al. Extravirgin olive oil up-regulates CB1 tumor suppressor gene in human colon cancer cells and in rat colon via epigenetic mechanisms. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 3, p. 250–8, 2015.
- DODDA, D.; CHHAJED, R.; MISHRA, J. Protective effect of quercetin against acetic acid induced inflammatory bowel disease (IBD) like symptoms in rats: possible morphological and biochemical alterations. **Pharmacological reports : PR**, v. 66, n. 1, p. 169–73, fev. 2014.
- DREHER, M. L.; DAVENPORT, A. J. Hass avocado composition and potential health effects. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 53, n. 7, p. 738–50, jan. 2013.
- DUERKOP, B. A.; VAISHNAVA, S.; HOOPER, L. V. Immune Responses to the Microbiota at the Intestinal Mucosal Surface. **Immunity**, v. 31, n. 3, p. 368–376, 2009.
- DURAND, E. et al. Assessing interactions between lipophilic and hydrophilic antioxidants in food emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2015.
- ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635–1638, 2005.
- ELIA, P. P. et al. Análise descritiva dos perfis social, clínico, laboratorial e antropométrico de

pacientes com doenças inflamatórias intestinais, internados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 44, n. 4, p. 332–339, 2007.

- EUSSEN, S. R. B. M. et al. Functional foods and dietary supplements: products at the interface between pharma and nutrition. **European journal of pharmacology**, v. 668 Suppl , p. S2–9, set. 2011.
- FAGHFOORI, Z. et al. Effects of an Oral Supplementation of Germinated Barley Foodstuff on Serum CRP Level and Clinical Signs in Patients with Ulcerative Colitis. **Health Promotion Perspectives**, v. 4, n. 1, p. 116–121, 2014.
- FICHTNER-FEIGL, S. et al. Cytokines Mediating the Induction of Chronic Colitis and Colitis Associated Fibrosis. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 0 1, p. S24–S27, 2008.
- FIOCCHI, C. Towards a “cure” for IBD. **Digestive diseases (Basel, Switzerland)**, v. 30, n. 4, p. 428–33, jan. 2012.
- FRAHER, M. H.; O’TOOLE, P. W.; QUIGLEY, E. M. M. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, n. 6, p. 312–322, 2012.
- FRANCESCONI, R.; HOU, V.; GRIVENNIKOV, S. I. Cytokines, IBD, and Colitis-associated Cancer. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 21, n. 2, p. 409–418, 2015.
- FRUCHT, D. M. et al. IFN- γ production by cells : mechanisms emerge. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 10, p. 556–560, 2001.
- FRUET, A. C. et al. Dietary intervention with narrow-leaved cattail rhizome flour (*Typha angustifolia* L.) prevents intestinal inflammation in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, p. 62–73, 2012.
- FULGONI, V. L.; DREHER, M.; DAVENPORT, A. J. Avocado consumption is associated with better diet quality and nutrient intake, and lower metabolic syndrome risk in US adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2001-2008. **Nutrition journal**, v. 12, p. 1, jan. 2013.
- GÁLVEZ, J. Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. **ISRN inflammation**, v. 2014, p. 928461, 2014.
- GARRETT, W. S. et al. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. **Cell**, v. 131, n. 1, p. 33–35, 2007.
- GEIRNAERT, A. et al. Anaerobe *Butyrivibrio pullicaecorum* , a butyrate producer with probiotic potential , is intrinsically tolerant to stomach and small intestine conditions. **Anaerobe**, v. 30, p. 70–74, 2014.
- GHAISAS, S.; MAHER, J.; KANTHASAMY, A. Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, 2015.
- GIACINTO, C. DI et al. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF- β -bearing regulatory cells. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3237–3246, 2005.
- GISBERT, J. P.; GONZÁLEZ-LAMA, Y.; MATÉ, J. 5-Aminosalicylates and renal function in inflammatory bowel disease: a systematic review. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 13, n. 5, p. 629–38, maio 2007.
- GOLAB, J. et al. Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18 - A bridge too far? **Immunology Letters**, v. 72, n. 3, p. 153–157, 2000.
- GONZÁLEZ, R. et al. Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.

71, n. 4, p. 243–250, 2001.

- GRAYDON, R. et al. The effect of lutein- and zeaxanthin-rich foods v. supplements on macular pigment level and serological markers of endothelial activation, inflammation and oxidation: pilot studies in healthy volunteers. **The British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 2, p. 334–42, 2012.
- GRAEFF F.G., GUIMARÃES F.S. *Fundamentos da Psicofarmacologia*. São Paulo: **Atheneu**, 1999.
- GUINANE, C. M.; COTTER, P. D. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. **Therapeutic advances in gastroenterology**, v. 6, n. 4, p. 295–308, jul. 2013.
- HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385–403, 1934.
- HAMER, H. M. et al. Review article: the role of butyrate on colonic function. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 104–19, 15 jan. 2008.
- HAMER, H. M. et al. Effect of butyrate enemas on inflammation and antioxidant status in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis in remission. **Clinical Nutrition**, v. 29, n. 6, p. 738–44, 2010.
- HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1–5, 1984.
- HARTOG, A. et al. A potential role for regulatory T-cells in the amelioration of DSS induced colitis by dietary non-digestible polysaccharides. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 3, p. 227–33, 2015.
- HIGA, R. et al. Effects of maternal dietary olive oil on pathways involved in diabetic embryopathy. **Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 49C, n. 2014, p. 185–195, 2014.
- HOOPER, L. V et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science**, v. 291, n. 5505, p. 881–884, 2001.
- HOU, T. Y.; MCMURRAY, D. N.; CHAPKIN, R. S. Omega-3 fatty acids, lipid rafts, and T cell signaling. **European Journal of Pharmacology**, p. 1–8, 2015.
- HUANG, C. B.; GEORGE, B.; EBERSOLE, J. L. Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. **Archives of Oral Biology**, v. 55, n. 8, p. 555–560, 2010.
- HUANG, C.-H. et al. A soybean and fish oil mixture with different n-6/n-3 PUFA ratios modulates the inflammatory reaction in mice with dextran sulfate sodium-induced acute colitis. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 5, p. 1018–1024, 2014.
- HUDA-FAUJAN, N. et al. The impact of the level of the intestinal short chain Fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects. **The Open Biochemistry Journal**, v. 4, n. 1c, p. 53–58, 2010.
- HUR, S. J. et al. Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. **Nutrition Research**, v. 32, n. 11, p. 801–816, 2012.
- HURTADO-FERNÁNDEZ, E. et al. Merging a sensitive capillary electrophoresis-ultraviolet detection method with chemometric exploratory data analysis for the determination of phenolic acids and subsequent characterization of avocado fruit. **Food chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3492–503, 15 dez. 2013.
- JEW, S.; ABUMWEIS, S. S.; JONES, P. J. H. Review Evolution of the Human Diet: Linking Our Ancestral Diet to Modern Functional Foods as a Means of Chronic Disease Prevention.

- Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 5, p. 925–934, 2009.
- JIN, Y. et al. *IL-17/IFN- γ* Interactions Regulate Intestinal Inflammation in TNBS-Induced Acute Colitis. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 32, n. 11, p. 548–556, 2012.
- JU, J. et al. Cancer-preventive activities of tocopherols and tocotrienols. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 4, p. 533–542, 2009.
- KAISTHA, A.; LEVINE, J. Inflammatory Bowel Disease: The Classic Gastrointestinal Autoimmune Disease. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 44, p. 328–334, 2014.
- KANE, S. V; BJORKMAN, D. J.; EPID, S. M. The Efficacy of Oral 5-ASAs in the Treatment of Active Ulcerative Colitis: A Systematic Review. **REVIEWS IN GASTROENTEROLOGICAL DISORDERS**, v. 3, n. 4, p. 210–218, 2003.
- KANG, S. et al. High and low vitamin A therapies induce distinct FoxP3+ T cell subsets and Effectively Control Intestinal Inflammation. **Gastroenterology**, v. 137, n. 4, p. 1391–1402, 2009.
- KAPLAN, G.; PANACCIONE, R. Use of combination therapy in IBD. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 14 Suppl 2, p. S219–S221, 2008.
- KAPLAN, G. G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 12, p. 720–727, 2015.
- KAPPELMAN, M.; RIFAS-SHIMAN, S. Direct health care costs of Crohn's disease and ulcerative colitis in United States children and adults. **Gastroenterology**, v. 135, n. 6, p. 1907–1913, 2008.
- KARP, S. M.; KOCH, T. R. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. **Disease-a-month : DM**, v. 52, n. 5, p. 199–207, maio 2006.
- KARROUT, Y. et al. In vivo efficacy of microbiota-sensitive coatings for colon targeting: A promising tool for IBD therapy. **Journal of Controlled Release : Official Journal of The Controlled Release Society**, v. 197C, n. 2015, p. 121–130, 2014.
- KATO, Y. et al. Inhibition of myeloperoxidase-catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants in vitro. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 67, n. 5, p. 1136–1139, 2003.
- KAU, A. L. et al. Human nutrition, the gut microbiome, and immune system: envisioning the future. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 327–336, 2012.
- KAWAGISHI, H. et al. Liver Injury Suppressing Compounds from Avocado (*Persea americana*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2215–2221, 2001.
- KENNEDY, A. et al. Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 3, p. 171–179, 2010.
- KHAN, A.; PIRIS, J.; TRUELOVE, S. C. An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. **The Lancet**, v. 2, n. 8044, p. 892–895, 1977.
- KIM, C. H. Retinoic acid, immunity, and inflammation. **Vitamins and Hormones**, v. 86, p. 83–101, 2011.
- KIM, H.-R. et al. Attenuation of Experimental Colitis in Glutathione Peroxidase 1 and Catalase Double Knockout Mice through Enhancing Regulatory T Cell Function. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–12, 2014.
- KOPEC, R. E. et al. Avocado Consumption Enhances Human Postprandial Provitamin A Absorption and Conversion from a Novel High- β -Carotene Tomato Sauce and from Carrots. **The Journal of Nutrition**, p. jn.113.187674–, 2014.
- KOSTIC, A. D.; XAVIER, R. J.; GEVERS, AND D. The Microbiome in Inflammatory Bowel Diseases: Current Status and the Future Ahead. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1489–

1499, 2014.

- KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, v. 87, p. 1344–1350, 1984.
- KURAYA, E. et al. Simultaneous Electrochemical Analysis of Hydrophilic and Lipophilic Antioxidants in Bicontinuous Microemulsion. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 3, p. 1489–1493, 2015.
- LARIJANI, L. V. et al. Evaluating the Effect of Four Extracts of Avocado Fruit on Esophageal Squamous Carcinoma and Colon Adenocarcinoma Cell Lines in Comparison with Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Acta Medica Iranica**, v. 52, n. 3, p. 201–205, 2014.
- LARMONIER, C. B. et al. T Lymphocyte Dynamics in Inflammatory Bowel Diseases: Role of the Microbiome. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–9, 2015.
- LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 837–848, 2006.
- LI, J. et al. Efficacy of topical versus oral 5-aminosalicylate for treatment of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. **Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science**, v. 34, n. 1, p. 59–65, 2014.
- LI, Z. et al. Hass avocado modulates postprandial vascular reactivity and postprandial inflammatory responses to a hamburger meal in healthy volunteers. **Food & function**, v. 4, n. 3, p. 384–91, 26 fev. 2013.
- LIMA, A. A. M. et al. Vitamin A supplementation effects on intestinal barrier function, growth, total parasit and epecific Giardia spp. infections in Brazilian children: a prospective randomize, double-blind, placebo-controlled trial. **Journal Pediatrics Gastroenterology Nutrition**, v. 50, n. 1315, p. 309–315, 2010.
- LLOPIS, M. et al. Lactobacillus casei downregulates commensals' inflammatory signals in Crohn's disease mucosa. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 15, n. 2, p. 275–283, 2009.
- LOGUERCIO, C. et al. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. **Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, v. 35, p. 635–641, 2003.
- LOPETUSO, L. R. et al. Gut Microbiota Modulation and Mucosal Immunity: Focus on Rifaximin. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 179–185, 2016.
- LORIA, V. et al. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators of inflammation**, v. 2008, p. 135625, 2008.
- LOUIS, P. et al. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 5, p. 1197–1208, 2007.
- LOUIS, P.; HOLD, G. L.; FLINT, H. J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. **Nature Reviews Microbiology**, n. September, p. 1–12, 2014.
- LU, Q. et al. California Hass Avocado: Profiling of Carotenoids, tocopherol, fatty acid, and fat content during maturation and from different growing areas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 10408–10413, 2009.
- LU, Q.-Y. et al. Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid-soluble bioactive substances. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 16, n. 1, p. 23–30, jan. 2005.
- LUCHINI, A. C. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 31, n. 7, p. 1343–1350, 2008.

- LUCHINI, A. C. **Avaliação dos efeitos da cumarina e da 4-hidroxi-cumarina e de diferentes associações com a sulfassalazina no modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos.** 2009. 130 f. Tese (Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2009).
- LUGER, D. et al. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 4, p. 799–810, 2008.
- MA, L. et al. The Acute Liver Injury in Mice Caused by Nano-Anatase TiO₂. **Nanoscale Research Letters**, v. 4, n. 11, p. 1275–1285, 2009.
- MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 45 Suppl, p. S120–7, 2011.
- MAGRONE, T.; JIRILLO, E. The interplay between the gut immune system and microbiota in health and disease: nutraceutical intervention for restoring intestinal homeostasis. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 7, p. 1329–42, jan. 2013.
- MALIK, T. A. Inflammatory Bowel Disease. **Surgical Clinics of North America**, v. 95, n. 6, p. 1105–1122, 2015.
- MANSON, J. M.; RAUCH, M.; GILMORE, M. S. The commensal microbiology of the gastrointestinal tract. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 635, p. 15–28, 2008.
- MASOODI, M. et al. Altered Colonic Mucosal Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) Derived Lipid Mediators in Ulcerative Colitis: New Insight into Relationship with Disease Activity and Pathophysiology. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.
- MATHUR, P. et al. Tocopherols in the Prevention and Treatment of Atherosclerosis and Related Cardiovascular Disease. **Clinical Cardiology**, v. 38, n. 9, p. 570–576, 2015.
- MAZZOLIN, L. P. et al. Antidiarrheal and intestinal antiinflammatory activities of a methanolic extract of *Qualea parviflora* Mart. in experimental models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 1016–23, 12 dez. 2013.
- MCDADE, T. W.; GEORGIEV, A. V; KUZAWA, C. W. Trade-offs between acquired and innate immune defenses in humans. **Evolution, Medicine, & Public Health**, v. 2016, p. 1–16, 2016.
- MICHAEL, B. et al. Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 5, p. 742–750, 2007.
- MOLODECKY, N. A. et al. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 46–54.e42, 2012.
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, n. 4, p. 254–260, 1955.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS: DEFINIÇÕES, LEGISLAÇÃO E BENEFÍCIOS À SAÚDE. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109–122, 2006.
- MORELLI, L. Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 9, p. 1791S–1795S, 2008.
- MORRIS, G. P. et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v. 96, p. 795–803, 1989.
- MORRISON, G.; HEADON, B.; GIBSON, P. Update in inflammatory bowel disease. **Australian**

- family physician**, v. 38, n. 12, p. 956–961, 2009.
- MOTTA, V. T. BIOQUÍMICA CLÍNICA PARA O LABORATÓRIO - Princípios e interpretações. 5. ed. Rio de Janeiro: **Editora Medbook**, 2009.
- MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667–685, 2014.
- MUKHERJEE, P. K. et al. Bioactive compounds from natural resources against skin aging. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 19, n. 1, p. 64–73, 15 dez. 2011.
- NAVARRO, F.; HANAUER, S. Treatment of inflammatory bowel disease: safety and tolerability issues. **The American journal of gastroenterology**, v. 98, n. 12, p. S18–S23, dez. 2003.
- NAVEH, E. et al. Defatted Avocado Pulp Reduces Body Weight and Total Hepatic Fat But Increases Plasma Cholesterol in Male Rats Fed Diets with Cholesterol. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 7, p. 2015–2018, 2002.
- NISHIMURA, T. et al. Cellobiose Prevents the Development of Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Experimental Colitis. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 46, p. 105–110, 2010.
- OHAMA, T. et al. Chronic treatment with interleukin-1beta attenuates contractions by decreasing the activities of CPI-17 and MYPT-1 in intestinal smooth muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 49, p. 48794–804, 2003.
- OZOLUA, R. I. et al. ACUTE AND SUB-ACUTE TOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF THEAQUEOUS SEED EXTRACT OF PERSEA AMERICANAMILL (LAURACEAE) IN RATS. **African Journal of Traditional Complementary, and Alternative Medicines**, v. 6, n. 4, p. 573–578, 2009.
- PAHUA-RAMOS, M. E. et al. Reduced-calorie Avocado Paste Attenuates Metabolic Factors Associated with a Hypercholesterolemic-high Fructose Diet in Rats. **Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)**, v. 69, n. 1, p. 18–24, mar. 2014.
- PARENTE, J. M. L. Inflammatory bowel disease in an underdeveloped region of Northeastern Brazil. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 4, p. 1197, 2015.
- PEKMEZCI, D. Vitamin E and immunity. **Vitamins and Hormones**, v. 86, p. 179–215, 2011.
- PELLETIER, M. et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. **Blood**, v. 115, n. 2, p. 335–343, 2010.
- PELLOW, S. et al. Validation of open " closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neurosciencie Methods**, v. 14, p. 149–167, 1985.
- PÉREZ-MARTÍNEZ, P. et al. Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 769–777, 2011.
- PEYRIN-BIROULET, L. et al. Development of the first disability index for inflammatory bowel disease based on the international classification of functioning, disability and health. **Gut**, v. 61, n. 2, p. 241–7, mar. 2012.
- PIETERSE, Z. et al. Substitution of high monounsaturated fatty acid avocado for mixed dietary fats during an energy-restricted diet: effects on weight loss, serum lipids, fibrinogen, and vascular function. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 21, n. 1, p. 67–75, jan. 2005.
- PODOLSKY, D. K. Inflammatory Bowel Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 6, p. 417–429, 2002.
- PRUT, L. et al. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors : a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3–33, 2003.
- QIN, J. et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. **Nature**, v.

490, n. 7418, p. 55–60, 4 out. 2012.

- QUIGLEY, E. M. M. Prebiotics and Probiotics: Their Role in the Management of Gastrointestinal Disorders in Adults. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 27, n. 2, p. 195–200, 2012.
- RAO, U. S. M.; ADINEW, B. REMNANT B-CELL-STIMULATIVE AND ANTI-OXIDATIVE EFFECTS OF PERSEA AMERICANA FRUIT EXTRACT STUDIED IN RATS INTRODUCED INTO STREPTOZOTOCIN - INDUCED HYPERGLYCAEMIC STATE. **African Journal of Traditional Complementary, and Alternative Medicines**, v. 8, n. 3, p. 210–217, 2011.
- RENISUS. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-antiores-agencia-saude/3487-ms-elabora-relacao-de-plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus> (acesso março de 2014).
- RIOUX, K. P.; FEDORAK, R. N. Probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 40, n. 3, p. 260–263, 2006.
- ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, v. 34 Suppl 2, p. S105–10, set. 2002.
- ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **The British journal of nutrition**, v. 104 Suppl , p. S1–S63, 2010.
- ROBERTS, R. L.; GREEN, J.; LEWIS, B. Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 2, p. 195–201, 2009.
- RODRÍGUEZ-CABEZAS, M. E. et al. Dietary Fiber Down-Regulates Colonic Tumor Necrosis Factor α and Nitric Oxide Production in Trinitrobenzenesulfonic Acid-Induced Colitic Rats. **Biochemical and Molecular Actions of Nutrients**, v. 132, p. 3263–3271, 2002.
- RODRÍGUEZ-CARPENA, J.-G. et al. Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5625–35, 25 maio 2011.
- RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, D. et al. Activity-guided identification of acetogenins as novel lipophilic antioxidants present in avocado pulp (*Persea americana*). **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 942-943, n. 2013, p. 37–45, 2013.
- ROGLER, G. Gastrointestinal and liver adverse effects of drugs used for treating IBD. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 157–165, abr. 2010.
- ROSJO, E. et al. Increasing serum levels of vitamin A, D and E are associated with alterations of different inflammation markers in patients with multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 271, n. 1-2, p. 60–65, 2014.
- SALES-CAMPOS, H. et al. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 201–210, 2013.
- SÁNCHEZ DE MEDINA, F. et al. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: A novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 2004, p. 2317–2326, 2004.
- SÁNCHEZ-FIDALGO, S. et al. PARP inhibition reduces acute colonic inflammation in rats. **European journal of pharmacology**, v. 563, n. 1-3, p. 216–223, 2007.
- SÁNCHEZ-FIDALGO, S. et al. Extra-virgin olive oil-enriched diet modulates DSS-colitis-associated colon carcinogenesis in mice. **Clinical Nutrition**, v. 29, n. 5, p. 663–673, 2010.
- SÁNCHEZ-FIDALGO, S. et al. Influence of extra virgin olive oil diet enriched with hydroxytyrosol in a chronic DSS colitis model. **European journal of nutrition**, v. 51, n. 4, p. 497–506, 2012.

- SÁNCHEZ-FIDALGO, S. Dietary extra virgin olive oil polyphenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice. **The Journal of nutritional ...**, v. 24, n. 7, p. 1401–1413, jul. 2013.
- SANTHANAM, S.; ALVARADO, D. M.; CIORBA, M. A. Therapeutic targeting of inflammation and tryptophan metabolism in colon and gastrointestinal cancer. **Translational Research**, p. 1–13, 2015.
- SASAKI, M. et al. Neuroprotective effect of an antioxidant, lutein, during retinal inflammation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, n. 3, p. 1433–1439, 2009.
- SCALDAFERRI, F. et al. Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 435268, 2013.
- SCARMINIO, V. et al. Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa sp AAA*) prevents intestinal inflammation in a trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. **Nutrition research (New York, N.Y.)**, v. 32, n. 3, p. 202–9, mar. 2012.
- SCARPA, M. et al. Restorative proctocolectomy for ulcerative colitis: Impact on lipid metabolism and adipose tissue and serum fatty acids. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 12, n. 2, p. 279–287, 2008.
- SEIDELIN, J. B. et al. Cellular inhibitor of apoptosis protein 2 controls human colonic epithelial restitution, migration, and Rac1 activation. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 308, n. 2, p. G92–G99, 2015.
- SHARON, G. et al. Specialized Metabolites from the Microbiome in Health and Disease. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 5, p. 719–730, 2014.
- SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 495–505, 2002.
- SINGH, U. P. et al. Cytokine Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. **Cytokine**, v. 77, n. 2016, p. 44–49, 2015.
- SLEETH, M. L. et al. Free fatty acid receptor 2 and nutrient sensing: a proposed role for fibre, fermentable carbohydrates and short-chain fatty acids in appetite regulation. **Nutrition research reviews**, v. 23, n. 1, p. 135–145, 2010.
- SOBOUTI, B.; HOOMAN, N.; MOVAHED, M. The effect of vitamin E or vitamin A on the prevention of renal scarring in children with acute pyelonephritis. **Pediatric Nephrology**, v. 28, n. 2, p. 277–283, 2013.
- SOKOL, H. et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 43, p. 16731–16736, 2008.
- SONU, I.; WONG, R.; ROTHENBERG, M. E. 5-ASA induced recurrent myopericarditis and cardiac tamponade in a patient with ulcerative colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 8, p. 2148–50, ago. 2013.
- SOUZA, H. S. P. DE; FIOCCHI, C. Immunopathogenesis of IBD: **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 1, p. 13–27, 2016.
- STROBER, W.; FUSS, I. J.; BLUMBERG, R. S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annual review of immunology**, v. 20, p. 495–549, jan. 2002.
- STUCCHI, A F. et al. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 279, n. 6, p. G1298–306, dez. 2000.
- SU, L. et al. Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. **Gastroenterology**, v. 136, n. 2, p. 551–563, fev.

2009.

- SUN, J. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 23, p. 7449–7454, 2002.
- TAN, J. et al. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. **Advances in Immunology**, v.121, p.91-119, 2014.
- TANEJA, A.; SINGH, H. Challenges for the delivery of long-chain n-3 fatty acids in functional foods. **Annual review of food science and technology**, v. 3, p. 105–23, jan. 2012.
- TARRANT, J.; MEYER, D.; KATAVOLOS, P. Use of optimized aminotransferase methods in regulated preclinical studies. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 4, p. 535–538, 2013.
- TEDELIND, S. et al. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 20, p. 2826–2832, 2007.
- THE PLANT LIST. Disponível em: <http://www.theplantlist.org> (acesso março de 2014).
- TOWARD, R. E. et al. Effect of prebiotics on the human gut microbiota of elderly persons. **Gut Microbes**, v. 3, n. 1, p. 57–60, 2012.
- TRIGUEROS, L. et al. Food ingredients as anti-obesity agents: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 53, n. 9, p. 929–42, jan. 2013.
- TROPICOS. Disponível em: <http://www.tropicos.org> (acesso março de 2014).
- TYAGI, A. et al. Partial replacement of dietary linoleic acid with long chain n-3 polyunsaturated fatty acids protects against dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 91, n. 6, p. 289–297, 2014.
- VAN STAA, T. P. et al. 5-aminosalicylic acids and the risk of renal disease: A large British epidemiologic study☆. **Gastroenterology**, v. 126, n. 7, p. 1733–1739, jun. 2004.
- VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, H. R. D. C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, n. 1, p. 20–25, 2009.
- VILADOMIU, M.; HONTECILLAS, R.; BASSAGANYA-RIERA, J. Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. **European Journal of Pharmacology**, p. 1–9, 2015.
- WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 322–328, 2007.
- WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: A Critical Review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482–504, 1976.
- WANG, L. et al. Effect of a Moderate Fat Diet With and Without Avocados on Lipoprotein Particle Number, Size and Subclasses in Overweight and Obese Adults: A Randomized, Controlled Trial. **Journal of the American Heart Association**, v. 4, n. 1, p. 1–14, 2015.
- WHITE, A. C.; THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Glutathione deficiency in human disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 5, n. 5, p. 218–226, 1994.
- WILLIAMS, C. et al. Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 4, n. 4, p. 237–48, 2011.
- WITAICENIS, A. et al. Dietary polydextrose prevents inflammatory bowel disease in trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 6, p. 1391–6, dez. 2010.
- WITAICENIS, A. et al. Mechanism and effect of Esculetin in an experimental animal model of Inflammatory Bowel Disease. **European Journal of Inflammation**, v. 11, p. 433–446, 2013.

- WITJAKSONO; LITZ, R. E.; PLIEGO-ALFARO, F. Somatic Embryogenesis of Avocado (*Persea americana* Mill .). **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**, v. 59, p. 197–214, 1999.
- WON, A. J. et al. Discovery of urinary metabolomic biomarkers for early detection of acute kidney injury. **Molecular BioSystems**, 2015.
- WU, J.; TAYLOR, R. N.; SIDELL, N. Retinoic acid regulates gap junction intercellular communication in human endometrial stromal cells through modulation of the phosphorylation status of connexin 43. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. October, p. 903–910, 2013.
- XU, M. et al. Preparation and evaluation of colon adhesive pellets of 5-aminosalicylic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 468, n. 1-2, p. 165–71, 2014.
- YAMAGUCHI, N. et al. Interferon-gamma production by human cord blood monocyte-derived dendritic cells. **Annals of hematology**, v. 84, n. 7, p. 423–8, 2005.
- YAMAMOTO-FURUSHO, J. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 13, p. 1893–1896, 2007.
- YOUNES, N. R. BEN et al. Subacute toxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in male rats: emotional behavior and pathophysiological examination. **Environmental Science and Pollution Research**, n. 2015, p. 8728–8737, 2010.
- ZAMPELI, E. et al. Predictors of response to anti-tumor necrosis factor therapy in ulcerative colitis. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 5, n. 3, p. 293–303, 2014.
- ZHANG, H. et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 7, p. 2365–2370, 2009.
- ZORZI, F. et al. A Sonographic Lesion Index for Crohn's Disease Helps Monitor Changes in Transmural Bowel Damage During Therapy. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 12, p. 2071–2077, 2014.

VIII. Anexos

ANEXO I

Tabela de composição da polpa da espécie *Persea americana* Mill. var. Hass. (Adaptado de DREHER; DAVENPORT, 2013).

Nutrientes/Fitoquímicos			
Principais componentes	Valor por g	Vitaminas e Fitoquímicos	Valor por g
Água (g)	0,723	Vitamina C (mg)	0,088
Energia (Kcal)	1,670	Riboflavina (mg)	0,001
Energia (Kcal) (fibra insolúvel ajustado)	1,480	Niacina (mg)	0,019
Proteína (g)	0,019	Ác. Pantotênico (mg)	0,014
Lipídeos totais (g)	0,154	Vitamina B6 (mg)	0,002
Carboidratos (g)	0,086	Folato (µg)	0,890
Fibras totais (g)	0,068	Colina (mg)	0,142
Açúcar total (g)	0,003	Betaina (mg)10mg/kg	0,007
Amido (g)	0,001	Vitamina B12 (µg)	0
		Vitamina A (µg)	0,070
Minerais		β-caroteno (µg)	0,630
Cálcio (mg)	0,130	α-caroteno (µg)	0,240
Ferro (mg)	0,006	β-criptoxantina (µg)	0,270
Magnésio (mg)	0,290	Luteína + Zeaxantina (µg)	2,710
Fósforo (mg)	0,540	Vitamina E (α-tocoferol) (mg)	0,019
Potássio (mg)	5,070	γ-tocoferol (mg)	0,003
Sódio (mg)	0,080	Vitamina K1 (µg)	0,210
Zinco (mg)	0,006		
Cobre (mg)	0,001		
Manganês (mg)	0,001		
Selênio (mg)	0,004		
Lipídeos		Valor por g	
Ác. graxos saturados total (g)		0,021	
Ác. graxos monoinsaturados totais (g)		0,098	
Ác. graxos poli-insaturados totais (g)		0,018	
Colesterol (mg)		0	
Estigmasterol (mg)		0,020	
Campesterol (mg)		0,050	
β-sitosterol (mg)		0,760	



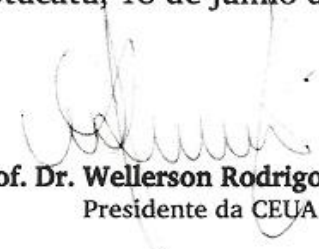
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o Protocolo nº 617-CEUA, sobre "Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal de *Persea americana* e de sua associação com sulfassalazina e prednisolona no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos", sob a responsabilidade de **Luiz Claudio Di Stasi**, está de acordo com a legislação vigente (Lei 11.794/2008 e Decreto 6.899/2009), com as resoluções normativas aplicáveis à luz dos Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), e foi aprovado "Ad referendum" da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Botucatu, 18 de junho de 2014.



Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA