

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 22/02/2019.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

TESE DE DOUTORADO

**Avaliação dos efeitos de dietas enriquecidas com  
frutos das espécies *Theobroma grandiflorum* e *Musa*  
spp AAA em diferentes modelos de inflamação  
intestinal**

***Alexandre da Silveira Chagas***

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi  
Co-orientador: Prof. Dr. Julio Juan Gálvez Peralta

Botucatu  
2017

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp, como parte das exigências para obtenção do título de *Doutor em Farmacologia e Biotecnologia*.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Instituto de Biociências – Campus de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

## TESE DE DOUTORADO

Avaliação dos efeitos de dietas enriquecidas com frutos das espécies  
*Theobroma grandiflorum* e *Musa* spp AAA em diferentes modelos de  
inflamação intestinal

Alexandre da Silveira Chagas

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia e  
Biotecnologia do Instituto de  
Biociências de Botucatu, Unesp,  
como parte das exigências para  
obtenção do título de *Doutor em  
Farmacologia e Biotecnologia*.

Orientador: Professor Dr. Luiz Claudio Di Stasi

Co-Orientador: Professor Dr. Julio Juan Gálvez Peralta

Botucatu  
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Chagas, Alexandre da Silveira.

Avaliação dos efeitos de dietas enriquecidas com frutos das espécies *Theobroma grandiflorum* e *Musa* spp AAA em diferentes modelos de inflamação intestinal / Alexandre da Silveira Chagas. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Luiz Claudio Di Stasi  
Coorientador: Julio Juan Gálvez Peralta  
Capes: 21001006

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Intestinos - Inflamação. 3. Crohn, Doença de. 4. Proctocolite. 5. Frutas - Uso terapêutico.

Palavras-chave: DSS; Inflamação intestinal; *Musa* spp AAA; TNBS; *Theobroma grandiflorum*.

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Instituto de Biociências –  
Campus de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

## **TESE DE DOUTORADO**

Alexandre da Silveira Chagas

Avaliação dos efeitos de dietas enriquecidas com frutos das espécies  
*Theobroma grandiflorum* e *Musa spp AAA* em diferentes modelos de  
inflamação intestinal

## **BANCA EXAMINADORA**

1º Prof. Titular - Dr. Luiz Claudio Di Stasi

*Dpto. Farmacologia / Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu-SP*

2º Prof. Assistente Doutor - Dr. Fernando Gomes Romeiro

*Dpto. Clínica Médica / FMB – UNESP – Botucatu-SP*

3º Prof. Adjunto – Dr. Carlos Augusto R. Martinez

*Dpto. Cirurgia / Faculdade de Medicina – USF – Bragança Paulista-SP*

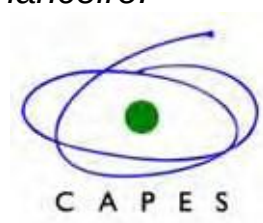
4º Prof. Adjunto - Dr. Josias Rodrigues

*Dpto. Microbiologia / Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu-SP*

5º Profa. Adjunto - Dra. Juliana Aparecida Severi

*Dpto. Farmácia e Nutrição / UFES – Alegre-ES*

*Auxílio  
Financeiro:*



*(Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)*

*Dedicatória*

Ao meu pai Carlos Alberto e a minha mãe Elô, pelos ensinamentos,  
educação, cuidados e pelo apoio incondicional para a realização dos meus  
sonhos;

Aos meus amigos e irmãos da República Só- Kanela, pela amizade e  
união de todos esses anos em que estamos juntos;

Aos meus amigos que conheci na Espanha que sempre estiveram comigo  
em todos os momentos nessa aventura que é morar fora do país : Sarah,  
Leo, Gi, Pablo, Nieves, Manolo, Rick. Gracias por la amistad chicos!!!

A todos os meus amigos, que mesmo estando longe, sempre torcem pelo  
meu sucesso.

## *Agradecimientos*

Aos meus amigos do laboratório, Kita, Ana, Celso, Luiz, Tainan,  
Cris, Erika, Késsien, Aline, Vinícius, Lesvi pelo apoio, diversão e  
muitos ensinamentos;

A mis amigos de Gálvez's Team: Teresa, Pepe, Maria, Maria  
Helena, Pilar, Francesca, Desi, y especialmente a Alba por toda la  
ayuda en Granada. Gracias por os haber conocido!

Ao meu co-orientador professor Dr Julio Gálvez por todo apoio,  
ensinamentos e acolhimento em Granada;

Ao professor Dr Anderson Herculano pelo apoio na coleta dos frutos  
de cupuaçu no Pará;

Aos amigos do FitoFarmaTec, Patrícia, Eduardo, Elisa, Ramon, Fer, Pri;

A todos os professores e funcionários do departamento de Farmacologia;

Aos funcionários da Pós Graduação;

A todos que auxiliaram de alguma maneira a realização deste trabalho.

Ao professor Dr Luiz Claudio Di Stasi por todos esses anos de orientação,  
ensinamentos, paciência, apoio e competência na elaboração deste trabalho,  
e principalmente, na participação da minha formação

***"Freedom of thought is best promoted by the gradual illumination of men's minds which follows from the advance of science." Charles Darwin***

## *Prefácio*

A tese "Avaliação dos efeitos de dietas enriquecidas com frutos das espécies *Theobroma grandiflorum* e *Musa spp AAA* em diferentes modelos de inflamação intestinal" foi realizada em quatro capítulos.

O primeiro capítulo descreve aspectos gerais da doença inflamatória intestinal, como sua fisiopatologia, etiologia, epidemiologia, os principais fármacos utilizados na clínica e novas estratégias terapêuticas baseadas em produtos naturais.

O segundo inclui os dados do trabalho desenvolvido no Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec) do Instituto de Biociências, UNESP-campus de Botucatu-SP. A ideia surgiu em estudar alimentos funcionais provenientes da Amazônia no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos. Em viagem de coleta em parceria com pesquisadores da UFPA, alguns frutos de importância na alimentação da população amazônica e também do Brasil foram coletados, incluindo Açaí, Buriti e Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), que devido a suas composições em fibras alimentares e compostos antioxidantes demonstravam potencial como terapia complementar ao tratamento da Doença Inflamatória intestinal em humanos. Dentre estas três espécies, o projeto focou o estudo da dieta enriquecida com polpa de cupuaçu no modelo de inflamação intestinal em ratos Wistar, e este capítulo está nas normas de publicação da revista *Nutrition Research*.

O terceiro capítulo foi realizado durante doutorado "sanduíche" pelo programa PDSE da CAPES na metade do ano de 2015, junto ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Granada-Espanha. Devido a resultados prévios no nosso laboratório, a farinha de banana nanica verde (*Musa spp AAA*) no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos foi selecionada para realização de estudos em outro modelo de inflamação intestinal, o modelo de inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos C57BL/6J. O grupo do Professor Julio Gálvez é referência no estudo da inflamação intestinal, tanto experimental quanto em humanos, e nosso laboratório tem uma parceria com o grupo espanhol há muitos anos.

O quarto capítulo descreve as considerações gerais da tese, mostrando os principais resultados obtidos e os potenciais produtos alimentares como tratamento complementar da Doença Inflamatória Intestinal em humanos.

Durante o período de realização do doutorado, foi realizada ainda uma série de atividades, descritas abaixo:

**Atividades realizadas durante o Doutorado (2013-2017)**

Matrícula número: 121122-4

Disciplinas cursadas:

| Disciplina                                                                                                                                                  | Ano  | Carga horária | Frequência (%) | Conceito |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------------|----------------|----------|
| Farmacocinética                                                                                                                                             | 2013 | 75            | 100            | B        |
| Laboratório de Didática em Farmacologia                                                                                                                     | 2013 | 90            | 91             | B        |
| Tópicos de atualização em farmacologia: Tópicos de atualização em Farmacologia: Mediadores da resposta inflamatória                                         | 2013 | 30            | 100            | A        |
| Tópicos de atualização em farmacologia: Tópicos de atualização em Farmacologia: Mediadores da resposta inflamatória II                                      | 2013 | 60            | 100            | A        |
| Empreendedorismo                                                                                                                                            | 2014 | 60            | 100            | A        |
| Tópicos Especiais em Farmacologia e Biotecnologia: Tópicos Integrados de Farmacologia e Biotecnologia da Doença Inflamatória Intestinal e Reprodução Bovina | 2016 | 30            | 100            | A        |
| <b>Disciplinas aproveitadas do mestrado</b>                                                                                                                 |      |               |                |          |
| Integração das Vias Metabólicas nos Estados Nutricionais                                                                                                    | 2011 | 60            | 100            | A        |
| Abordagem Estatística em Farmacologia I: Fundamentos                                                                                                        | 2011 | 15            | 100            | A        |
| Metodologia e Redação Científica                                                                                                                            | 2011 | 60            | 90             | A        |
| Tópicos Avançados em Imunologia e Imunopatologia                                                                                                            | 2011 | 75            | 93             | A        |

Total de carga horária em disciplinas = 555

Total de carga horária em atividades complementares = 675

**TOTAL GERAL = 1230****Participação em Congressos e Eventos:**

- 2013 III Simpósio de Farmacologia da UNESP – SIMFAR. 14 a 15 de Junho de 2013, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Botucatu.
- 2014 IV Simpósio de Farmacologia da UNESP – SIMFAR. 07 a 08 de Agosto de 2014, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Botucatu.
- 2015 V Simpósio de Farmacologia da UNESP – SIMFAR. 25 a 26 de Junho de 2015, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Botucatu.
- 2016 VII Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia Científica, realizado nos dias 28 e 29 de Janeiro de 2016 em Sevilha-Espanha

- 2016 7<sup>th</sup> European Congress of Pharmacology, realizado de 26 a 30 de Junho de 2016 em Istambul-Turquia

### Trabalhos apresentados em Congressos

- 2013 Avaliação dos efeitos de dietas enriquecidas com frutos das espécies *Theobroma cacao* L. e *Theobroma grandiflorum* Schum. na inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos apresentado (oral) no III Simpósio de Farmacologia da UNESP – SIMFAR. 14 a 15 de Junho de 2013, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Botucatu.
- 2014 Avaliação dos efeitos de dietas enriquecidas com frutos das espécies *Theobroma cacao* L. e *Theobroma grandiflorum* Schum. na inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos apresentado (poster) no IV Simpósio de Farmacologia da UNESP – SIMFAR. 07 a 08 de Agosto de 2014, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Botucatu.
- 2015 Avaliação dos efeitos de dietas enriquecidas com frutos da espécie *Theobroma grandiflorum* Schum. na inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos apresentado (poster) no V Simpósio de Farmacologia da UNESP – SIMFAR. 25 a 26 de Junho de 2015, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Botucatu.
- 2016 Intestinal anti-inflammatory effects of a *Theobroma grandiflorum* schum. (cupuaçu) enriched diet in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis, apresentado sob a forma de poster no 7th European Congress of Pharmacology, realizado de 26 a 30 de Junho de 2016 em Istambul-Turquia.

### Artigo publicado em periódico

- 2013 Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. Aline Witaicenis, Leonardo Noboru Seito, **Alexandre da Silveira Chagas**, Luiz Domingues de Almeida Junior, Ana Carolina Luchini, Patrícia Rodrigues-Orsi, Silvia Helena Cestari, Luiz Claudio Di Stasi. Phytomedicine.

## **Realização de estágio docência**

- Disciplina de Toxicologia  
Curso de Ciências Biomédicas  
Aula ministrada: "Noções de Toxicogenética"  
Professor responsável: Profa. Dra. Valéria Cristina Sandrim/ Professora Assistente Doutor/ Departamento de Farmacologia IBB/UNESP
- Disciplina de Plantas Medicinais  
Curso de Ciências Biológicas  
Aula ministrada: "Plantas Alucinógenas"  
Professor responsável: Profa. Dr. Luiz Claudio Di Stasi/ Professor Titular/ Departamento de Farmacologia IBB/UNESP

## **Colaboração em outros projetos de pesquisa**

- Avaliação das propriedades anti-inflamatórias da Chaya (*Cnidoscolus aconitifolus*) no tratamento da doença inflamatória intestinal.
- Avaliação da dieta enriquecida com farinha de banana nanica verde (*Musa* sp. AAA) no modelo de inflamação intestinal induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS) em ratos.
- Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de *Hibiscus esculentus* L. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.
- Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com banana prata verde (*Musa* sp AAB) no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.
- Validação de espécies brasileiras como alimentos funcionais úteis no controle e prevenção da doença inflamatória intestinal.
- Avaliação dos mecanismos de ação antioxidantes envolvidos no efeito anti-inflamatório intestinal da 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina.

*Resumo*

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma doença com etiologia desconhecida e sem terapêutica curativa disponível, englobando, fundamentalmente, duas doenças distintas: a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU), ambas caracterizadas por uma inflamação crônica do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos prolongados com remissão dos sintomas, cujo tratamento com os fármacos disponíveis apresentam sérios efeitos colaterais. Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento que combinem eficácia e segurança é uma importante meta na terapia da DII. Produtos de origem natural, especialmente oriundos de fontes vegetais com propriedades de modificar a microbiota intestinal têm sido amplamente estudados como agentes preventivos e/ou curativo destas doenças, visto que a manipulação da microbiota intestinal tem se mostrado como uma estratégia importante na manutenção da homeostase colônica. Neste contexto, muitos frutos de origem tropical, com ampla utilização pela população e ricos em fibras e/ou componentes que ativos como antioxidantes e/ou anti-inflamatórios podem representar uma nova estratégia complementar para a prevenção ou cura da DII. Dentre eles se destacam os frutos das espécies *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu) e *Musa spp AAA* (banana nanica), ricos em fibras alimentares e compostos fenólicos, os quais são potencialmente benéficos no tratamento e prevenção da DII. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos de uma dieta enriquecida com polpa de cupuaçu a 5 e 10% no modelo de inflamação intestinal induzido por TNBS em ratos, e os efeitos de uma dieta enriquecida com farinha de banana nanica verde a 10% e sua associação com *Bifidobacterium breve* no modelo de inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos. A dieta enriquecida com polpa de cupuaçu a 5% foi capaz de evitar a depleção do antioxidante endógeno glutatona, e a dieta enriquecida com polpa de cupuaçu a 10% diminuiu a atividade das enzimas mieloperoxidase e fosfatase alcalina, e também diminuiu os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6, as dietas enriquecidas com polpa de cupuaçu foram capazes também de manter a citoarquitetura intestinal e a secreção de muco no lúmen intestinal. Já a dieta enriquecida com farinha de banana nanica verde à 10% associada com o probiótico *B.breve* foi capaz de aumentar a expressão relativa colônica de ZO-1 e MUC-1 e da citocina anti-inflamatória TGF- $\beta$  e aumentar a expressão relativa de MMP-9, além de diminuir a expressão relativa, em fezes, do gênero *Clostridium*. O probiótico *B.breve* isolado foi capaz de aumentar a expressão relativa de ZO-1 e a dieta enriquecida com farinha de banana nanica verde a 10% isolada foi capaz de aumentar a expressão relativa colônica de MMP-9 e ICAM-1 e diminuir a expressão relativa fecal do gênero *Clostridium*. A dieta enriquecida com polpa de cupuaçu é potencialmente útil como produto complementar ao tratamento da DII em humanos, devido aos seus resultados apresentados no modelo de inflamação intestinal induzido por TNBS em ratos. Já a dieta enriquecida com farinha de banana verde se mostrou útil como produto complementar ao tratamento da DII em humanos associada ao probiótico *B.breve*, devido aos resultados apresentados na inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos.

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a disease with unknown etiology and no curative treatment available, encompassing essentially two distinct diseases: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), both characterized by chronic inflammation of the intestine, with periods of exacerbation followed by long intervals with symptom remission whose treatment with available drugs has serious side effects. Therefore, the development of new treatment strategies that combine effectiveness and safety is an important goal in the treatment of IBD. Dietary products are among the therapeutic approaches used to modify intestinal microbiota and to promote protective effects during the intestinal inflammatory process, since the manipulation of the intestinal microbiota has been shown as an important strategy in the maintenance of colonic homeostasis. In this context, many tropical fruits, widely used by population and because its composition rich in dietary fibers and activity compounds such as antioxidants and anti-inflammatory may represent a new complementary strategy for the prevention or cure of IBD. In this way, the fruits of *Theobroma grandiflorum* (cupuassu) e *Musa spp AAA* (dwarf banana), rich in dietary fruits and phenolic compounds, are potentially beneficial in the prevention and treatment of IBD. The aim of the present study was to evaluated the effects of a 5% and 10% cupuassu pulp enriched diet on the TNBS-induced intestinal inflammation model in rats and the effects of a 10% green dwarf banana flour enriched diet and its association with *Bifidobacterium breve* in the DSS-induced intestinal inflammation in mice. The enriched diet with cupuassu pulp at 5% maintained colonic levels of the endogenous antioxidant glutathione, and the enriched diet with cupuassu pulp at 10% diminish the activity of the enzymes myeloperoxidase and alkaline phosphatase, and diminish the levels of the inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  e IL-6, both enriched diets were also able to maintain the intestinal cytoarchitecture and the secretion of mucus in the intestinal lumen. The 10% green dwarf banana flour enriched diet associated with the probiotic *B.breve* was able to increase colonic relative expression of ZO-1 and MUC-1, and the anti-inflammatory cytokine TGF- $\beta$ , its increase also the relative expression of MMP-9, beyond diminish the relative expression, in faecal samples, of *Clostridium* genus. The monotherapy with the probiotic *B.breve* increase the relative expression of ZO-1 and the green dwarf banana flour increased the colonic relative expression of MMP-9 and ICAM-1 and reduced the faecal relative expression of *Clostridium* genus. The cupuassu pulp enriched diet is potentially useful as a complementary product to the treatment of IBD in humans because of its results presented in the TNBS-induced intestinal inflammation model in rats. Therefore, the green dwarf banana flour enriched diet associated with the probiotic *B.breve* could be useful as a complementary product to the treatment of IBD in humans because of its results presented in the DSS-induced intestinal inflammation model in mice.

## *Sumário*

## Sumário

|                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Dedicatória.....                                                                                                                                                                                                              | v  |
| Agradecimentos.....                                                                                                                                                                                                           | vi |
| Prefácio.....                                                                                                                                                                                                                 | x  |
| Resumo .....                                                                                                                                                                                                                  | xv |
| Capítulo I.....                                                                                                                                                                                                               | 1  |
| Introdução.....                                                                                                                                                                                                               | 2  |
| Capítulo II.....                                                                                                                                                                                                              | 11 |
| Anti-inflammatory effects of a cupuassu pulp ( <i>Theobroma grandiflorum</i> ) enriched diet in TNBS-induced intestinal inflammation .....                                                                                    | 12 |
| Capítulo III .....                                                                                                                                                                                                            | 34 |
| Avaliação dos efeitos da monoterapia e do tratamento combinado do probiótico <i>Bifidobacterium breve</i> com a farinha de banana verde ( <i>Musa</i> spp AAA) na inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos ..... | 35 |
| Capítulo IV .....                                                                                                                                                                                                             | 52 |
| Considerações finais.....                                                                                                                                                                                                     | 53 |
| Anexos .....                                                                                                                                                                                                                  | 54 |

# *Capítulo I*

## Introdução

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) engloba, fundamentalmente, duas doenças distintas: a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU). Ambas caracterizam-se por uma inflamação crônica do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos prolongados de remissão dos sintomas (ABRAHAM; CHO, 2009), sendo marcada pela ulceração e infiltração de neutrófilos na mucosa, desconforto ou dor abdominal com hábitos intestinais alterados tais como diarreia e constipação (SINGH et al., 2003), no entanto, ocorrem algumas diferenças quanto às características e distribuição do processo inflamatório.

A Doença de Crohn é uma inflamação transmural do trato gastrointestinal (TGI) que pode afetá-lo por completo, desde a boca até o ânus. Normalmente se apresenta de forma descontínua em várias porções do TGI e pode promover complicações como estenoses, abscessos ou fístulas. Esta doença caracteriza-se ainda pela infiltração de linfócitos, formação de granuloma e fibrose (COLLINS; CROITORU, 1994; BAUMGART; SANDBORN, 2007).

A Retocolite Ulcerativa é uma doença inflamatória intestinal restrita ao cólon e que dependendo da extensão e localização da inflamação pode ser classificada em proctite (parte inferior do cólon e reto), colite distal (cólon sigmóide com ou sem envolvimento do cólon descendente) ou pancolite (envolvimento de todo o cólon) (BAUMGART; SANDBORN, 2007). Histologicamente, a inflamação na RCU se restringe a camada mucosa colônica, sendo caracterizada pela infiltração de linfócitos e granulócitos e presença de abscessos das criptas com infiltração de neutrófilos (COLLINS; CROITORU, 1994).

Clinicamente, a RCU é caracterizada pela ocorrência de diarreia severa com sangue, muco e pus, perda do peristaltismo e da rigidez da parede intestinal e perfuração. Porém, na doença de Crohn, a apresentação clínica depende do local da

inflamação, podendo incluir dor abdominal intensa, diarreia, febre, ocorrência de estreitamento do lúmen intestinal (estenoses), desenvolvimento de fístulas e até mesmo sinais de obstrução intestinal (BOUMA; STROBER, 2003; BAUMGART; SANDBORN, 2007).

As doenças inflamatórias intestinais são consideradas um dos grandes problemas da população moderna, uma vez que geram repercussões importantes na qualidade de vida de seus portadores, acarretando alterações no âmbito social, psicológico e profissional (KAPLAN, 2015).

A epidemiologia da Doença Inflamatória Intestinal está sendo analisada em diversos estudos e apesar das tendências para o aparecimento da DII estarem mudando, certos padrões demográficos parecem ser semelhantes. As taxas de incidência são maiores em países desenvolvidos e mais industrializados, como no nordeste Europeu, Reino Unido, América do Norte e Austrália, estima-se que 0,5% da população ocidental é portadora dessas doenças (KAPLAN, 2015). À medida que os países em desenvolvimento evoluem para países industrializados, a incidência da DII aumentou e fatores de risco ambientais associados a sociedades industrializadas estão inegavelmente envolvidos com a patogênese da DII (ANANTHAKRISHNAN, 2015). Dados mundiais indicam que a incidência da DII está em um range de 10-30 para cada 100.000 habitantes, sendo que nos Estados Unidos mais de 1 milhão de pessoas apresentem a doença, enquanto na Europa o número de portadores chega a 2,5 milhões (KAPLAN, 2015).

No Brasil, poucos estudos analisam os aspectos epidemiológicos da DII, sendo que a maioria apenas descreve os aspectos clínicos e a frequência de admissão em hospitais em função dessa enfermidade, sem qualquer tipo de referência quanto à incidência ou prevalência na população. Um estudo de SOUZA et al. (2002) realizado

em um hospital público de Ribeirão Preto, interior de São Paulo, mostrou que a admissão em hospitais em função da DII é mais frequente para casos de DC e que ocorreu um aumento nas doenças inflamatórias intestinais de 40 para 61 casos para cada 10.000 atendimentos realizados, em um período de cinco anos. VICTORIA et al. (2009) constataram no hospital da Universidade Estadual Paulista – Botucatu –SP que a maioria dos pacientes com DII atendidos era caucasiana e morava em centros urbanos, dos quais 65% eram portadores de RCU e 25% de DC. Embora no Brasil esses números serem menores do que a taxa mundial, essa doença vem se tornando cada vez mais importante no nosso sistema de saúde pública e privada.

Apesar da DII ser objeto de pesquisa há várias décadas, a sua etiologia ainda é desconhecida e um único agente ou mecanismo isolado não parecem ser suficientes para produzir ou desencadear a doença. A interação de fatores genéticos e ambientais (dieta, fármacos, tabagismo e fatores psicológicos), em combinação com a microbiota intestinal, dispara um mecanismo que ativa células que compõem o sistema de defesa da mucosa intestinal, deste modo, sua etiologia é considerada multifatorial (SU et al., 2009). Por meio de uma resposta imune exagerada e inapropriada da mucosa à microbiota intestinal normal, a qual é facilitada por alterações na barreira epitelial intestinal e mediada principalmente por células T da mucosa, se desencadeia uma intensa síntese e liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, incluindo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, eicosanóides, fator de agregação plaquetária e inúmeras citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12. Neste sentido, está descrito um grande aumento na síntese colônica de leucotrieno B<sub>4</sub> (WALLACE, 1994), o qual devido sua capacidade quimiotática e ativadora de neutrófilos pode ser o responsável por grande parte da destruição celular e necrose que caracterizam a DII. A destruição celular e necrose, por sua vez, ocorrem devido à secreção de

mieloperoxidase e distintas proteases, especialmente das metaloproteinases, assim como da geração de radicais livres derivados do oxigênio e do nitrogênio, os quais tem sido implicado em diferentes fases do processo inflamatório (MILLER; GRISHAM, 1995; KUBES; WALLACE, 1995).

Os radicais livres desempenham um papel chave na gênese e manutenção da DII, sendo que alguns estudos comprovam a existência de alterações nos níveis oxidativos em biopsias de mucosas de cólon procedentes de pacientes com esta doença (LIH-BRODY et al., 1996). Este desequilíbrio se traduz em um incremento no estresse oxidativo acompanhado de uma diminuição nas defesas antioxidantes fisiológicas (LOGUERCIO, 1996), especialmente dos níveis de glutathione total. O ataque dos radicais livres sobre os lipídeos de membrana gera o processo de peroxidação lipídica, dando lugar a uma reação em cadeia que perpetua o ciclo de formação destes agentes agressores, ao mesmo tempo em que origina uma desestruturação da membrana celular e a consequente morte da célula (LIH-BRODY et al., 1996; LOGUERCIO, 1996).

A terapêutica atualmente utilizada para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais inclui um grande número de fármacos, dentre os quais estão os aminossalicilatos, os glicocorticóides, os imunossupressores (YAMOMOTO-FURUSHO, 2007) e a terapia biológica (MORRISON et al., 2009). Infelizmente, a terapêutica disponível não representa a cura da DII e os fármacos disponíveis ou possuem sérios efeitos colaterais, como os glicocorticóides (NAVARRO; HANAUER, 2003), e/ou são de alto custo, como por exemplo, o infliximabe (YUN; HANAUER, 2009). Tais aspectos limitam imensamente sua utilização, além de existirem pacientes que não respondem a nenhum dos fármacos existentes.

Recentemente, novos procedimentos terapêuticos têm sido propostos,

especialmente com produtos naturais com atividade antioxidante e/ou imunomoduladora e de produtos reconhecidos como prebióticos, capazes de melhorar a resposta das células colônicas ao processo inflamatório que se instala. De fato, há ainda a necessidade de estudos para a obtenção de novas estratégias terapêuticas que maximizam a eficácia dos fármacos, enquanto minimizam sua toxicidade (SCRIBANO, 2008).

A alimentação vem se tornando uma importante estratégia no tratamento da doença inflamatória intestinal e produtos alimentares com propriedades funcionais estão sendo incorporados na dieta de pacientes portadores dessa doença com o intuito de prevenir recidivas e melhorar sua qualidade de vida. Esses alimentos, definidos como funcionais, são produtos que além das características nutricionais essenciais trazem benefícios à saúde e são potenciais na prevenção e tratamento de doenças. Podem ser classificados como fibras alimentares, ácidos graxos poli-insaturados, proteínas, peptídios, aminoácidos ou cetoácidos, minerais, vitaminas e compostos antioxidantes (ANDLAUER; FURST, 2002). Dentre esses alimentos se destacam os prebióticos, os quais são definidos como ingredientes alimentares não digeríveis que, quando consumido em quantidades suficientes, seletivamente estimulam o crescimento e/ ou atividade de uma ou de um número limitado de micro-organismos no cólon, o que resulta em benefícios para a saúde (DUNCAN, 2013). Os prebióticos mais estudados são os amido-resistente, oligossacarídeos, como inulina e os fruto-oligossacarídeos, dissacarídeos, como a lactulose, e polissacarídeos componentes da parede celular vegetal, como as ligninas e pectinas (ALMEIDA et al., 2003). Com uma dieta rica em carboidratos prebióticos se aumenta a fermentação anaeróbica das bactérias colônicas e como consequência há um aumento da produção luminal de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), principalmente acetato, propionato e butirato.

Os AGCCs podem atuar de forma direta, ou indireta sobre o cólon, modificando o pH, diminuindo atividade da iNOS (óxido nítrico sintetase indutiva) e os níveis de TNF- $\alpha$  no cólon (RODRIGUEZ-CABEZAS et al., 2002). Dos AGCCs produzidos, o butirato apresenta papel central na regulação de várias atividades das células epiteliais do cólon, pois, exerce sua atividade anti-inflamatória através de vários mecanismos. Entre estes, estão a redução das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, indução da expressão de IL-10 e TGF- $\beta$ , além de reduzir a proliferação e ativação de linfócitos e, possuir um papel importante na maturação do epitélio colônico, regeneração da mucosa e indução da diferenciação celular (ALGIERI; RODRIGUEZ-NOGALES, 2014; LOOIJER-VAN LANGEN ET AL, 2009).

A microbiota intestinal está intimamente relacionada com a fisiopatologia da DII. Estudos clínicos demonstram que a composição da microbiota de pacientes portadores dessas doenças é diferente em relação a indivíduos saudáveis, sendo encontrada também uma menor diversidade bacteriana na DII, especialmente em regiões onde a inflamação está em maior atividade. Em geral, os filos *Firmicutes* e *Bacteroides* estão reduzidos no intestino desses pacientes (DERIKX et al, 2016). Uma estratégia terapêutica na DII é a manipulação da microbiota intestinal, através de alimentos que contêm prebióticos e/ou probióticos. Probióticos são definidos como micro-organismos vivos que após a ingestão em uma quantidade adequada, exercem benefícios à saúde (CHINGWARU, 2010). Essa estratégia de manipulação da microbiota intestinal através da alimentação é vista como um caminho promissor na intervenção terapêutica e profilática contra a inflamação intestinal (VILADOMIU et al, 2013).

Com base nestas informações, selecionamos as espécies *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu), para avaliar os efeitos de uma dieta enriquecida com sua polpa

no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos, devido sua composição em fibras alimentares, principalmente pectina, (VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009) e *Musa spp AAA*, para avaliar os efeitos de uma dieta enriquecida com farinha de banana nanica verde e sua associação com o probiótico *Bifidobacterium breve* no modelo de inflamação intestinal induzido por DSS em camundongos. Essa variedade de banana foi selecionada para o estudo devido a resultados prévios em nosso laboratório no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos (SCARMINIO et al., 2012).

#### Referencias bibliográficas

ABRAHAM, C. & CHO, J.H. Inflammatory Bowel Disease. **The New England Journal of Medicine**, v.361, p.2066-78, 2009.

ALGIERI, F. et al. Intestinal anti-inflammatory effects of oligosaccharides derived from lactulose in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. **Journal of agricultural and food chemistry**, vol.62, p.4285-97, 2014.

ALMEIDA, M. M. B. *et al.* Determinação de umidade, fibras, lipídios, cinzas e sílica em plantas medicinais. **BOL.CEPPA**, v. 21(2), p. 324,3 j-u3l5./0d, 2003.

ANANTHAKRISHNAN, A. N. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: a review. **Dig. Dis. Sci.**, vol. 60, p.290–298, 2015.

ANDLAUER, W.; FURST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research International**, v. 35, p. 171-176, 2002.

BAUMGART, D.C. & SANDBORN, W.J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**, Vol.369, pp.1641–57, 2007.

BOUMA, G. & STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v.3, p.521-533, 2003.

CHINGWARU, W. The Role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health. **Nutrients**, v. 2, n. 6, p. 611-625, 2010.

COLLINS, S.M. & CROITORU, K. Pathophysiology of inflammatory bowel disease: effect of inflammation on intestinal function. In: Targan SR, Shanahan F (eds) **Inflammatory bowel disease: from bench to bedside**, p. 194–209, 1994.

DERIKX, L.A.A.P. et al. Probiotics and prebiotics in ulcerative colitis. **Best Practice &**

**Research Clinical Gastroenterology**, vol.30, p.55-71, 2016.

DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J. Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. **Maturitas**, Mar 11 2013.

KAPLAN, G.G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol**, v.12, p.720-727, 2015.

KUBES, P., Wallace JL. Nitric oxide as a mediator of gastrointestinal mucosal injury? Say it ain't so. **Mediators of Inflammation**, vol.4, p.397-405, 1995.

LIH-BRODY, L., *et al.* Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v.41, p.2078-2086, 1996.

LOGUERCIO, C. *et al.* Direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental colitis in rats **Digestive Diseases and Sciences**, v. 41, p. 1204–1211, 1996.

LOOIJER-VAN LANGEN MAC, DIELEMAN LA. Prebiotics in chronic intestinal inflammation. **Inflamm Bowel Dis**, vol.15, p.454-62, 2009.

MILLER, M.J.S., Grisham B. Nitric oxide as a mediator of inflammation? You had better believe it. **Mediators of Inflammation**, vol. 4,p.387-396, 1995.

MORRISON, G. *et al.* Update in inflammatory bowel disease. **Australian Family Physician**, vol.38, 2009.

NAVARRO, F. & HANAUER, S.B. Treatment of Inflammatory Bowel Disease: Safety and Tolerability Issues. **The American Journal of Gastroenterology**, vol.98, No.12, 2003.

RODRIGUEZ-CABEZAS, M.E., *et al.* Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. **Journal of Nutrition**, vol.132, p.3263–3271, 2002.

SCARMINIO, V. Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa* spp AAA) prevents intestinal inflammation in trinitrobenzenesulfonic acid model of rats colitis. **Nutrition Research**, vol.32, p.202-209, 2012.

SCRIBANO, M.L. Adverse Events of IBD Therapies. **Inflammatory Bowel Disease**, vol.14,p.210-S211, 2008.

SINGH, V. P. *et al.* Effect of nimesulide on acetic-acid and leukotriene-induced inflammatory bowel disease in rats. **Prostaglandins & others Lipid Mediators**, v.71, p.163-175, 2003.

SOUZA, M.H.L.P. *et al.* Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudeste do Brasil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.39, n.2, 2002.

SU, L., *et al.* Targeted Epithelial Tight Junction Dysfunction Causes Immune Activation and Contributes to Development of Experimental Colitis. **Gastroenterology**, v.136, p.551–563, 2009.

VICTORIA, C.R.; SASSAKI, L.Y., NUNES, H.R.C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo state, Brazil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.46, p.20-25, 2009.

VILADOMIU, M. *et al.* Nutritional protective mechanisms against gut inflammation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, vol.24,p.929-939, 2013. vol.14,p.210-S211, 2008.

VRIESMANN L.C, DE OLIVEIRA PETKOWICZ CL. Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): Structural characterization of a pectic fraction. **Carbohydrate polymers**, vol. 9, p.77:72, 2009.

WALLACE, J.L. Eicosanoids In: Targan SR, Shanahan F (eds.). **Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside**, p.123-132,1994.

YAMAMOTO-FURUSHO, J.K. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, vol.13, p.1893-1896, 2007.

YUN, L. & HANAUER, S. Selecting appropriate anti-TNF agents in inflammatory bowel disease. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, vol.3, p.235-48, 2009.

## *Capítulo IV*

Considerações finais

Com base no exposto:

- ✓ A dieta enriquecida com polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) possui atividade anti-inflamatória intestinal no modelo de inflamação induzida por TNBS em ratos. A dieta a 5% evitou a depleção do antioxidante endógeno glutatona e a dieta a 10% impediu o aumento da atividade das enzimas mieloperoxidase e fosfatase alcalina, assim como evitou o aumento dos níveis das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6. As dietas enriquecidas, em ambas as proporções, foram capazes de manter a citoarquitetura do epitélio intestinal e a secreção de muco.
  
- ✓ A dieta enriquecida com farinha de banana nanica verde (*Musa* spp AAA) a 10% associada com o probiótico *B.breve* foi capaz de aumentar a expressão relativa colônica de ZO-1 e MUC-1, da citocina anti-inflamatória TGF- $\beta$  e de MMP-9, além de diminuir a expressão relativa, em fezes, do gênero *Clostridium*. O probiótico *B.breve* isolado foi capaz de aumentar a expressão relativa de ZO-1 e a dieta enriquecida com farinha de banana nanica verde a 10% isolada aumentou a expressão relativa colônica de MMP-9 e ICAM-1 e diminuiu a expressão relativa fecal do gênero *Clostridium*, no modelo de inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos.