



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

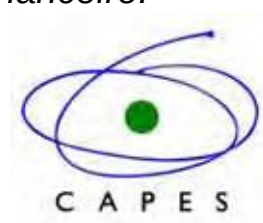
4º Prof. Adjunto - Dr. Josias Rodrigues

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.

Agradecimentos

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
Disciplinas aproveitadas do mestrado				
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 7th 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 (*Cnidocolus 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 β 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- β 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 β 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-inflammato cytokine TGF- β , 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- α , IL-1 β e IL-12. Neste sentido, está descrito um grande aumento na síntese colônica de leucotrieno B4 (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- α 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- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, indução da expressão de IL-10 e TGF- β , 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 II

Anti-inflammatory effects of a cupuassu pulp (*Theobroma grandiflorum*) enriched diet in TNBS-induced intestinal inflammation

Anti-inflammatory effects of a cupuassu pulp (*Theobroma grandiflorum*) enriched diet in TNBS-induced intestinal inflammation

Alexandre Silveira Chagas; Luiz Domingues Almeida-Junior; Tainan Freitas Salmeron Curimbaba; Ana Elisa Valencise Quaglio; Luiz Claudio Di Stasi* .

Laboratory of Phytomedicines, Pharmacology and Biotechnology (PhytoPharmaTech)
Department of Pharmacology, Institute of Biociences, Unesp-Univ. Estadual Paulista,
P.O. BOX 510,18618-970 - Botucatu, São Paulo, Brazil

**Corresponding author:* Luiz Claudio Di Stasi

Email: ldistasi@ibb.unesp.br

Phone: +55 14 3880 0216

Fax: +55 14 3811 3744

Abbreviations

ANOVA, analysis of variance; ALP, alkaline phosphatase; GSH, glutathione; IBD, inflammatory bowel disease; MPO, myeloperoxidase; SCFA, short-chain fatty acids; TNBS, trinitrobenzenesulfonic acid; CD, Crohn's disease; UC, ulcerative colitis; ROS, reactive oxygen species

Abstract

Cupuassu is a Brazilian Amazon rainforest fruit, phylogenetically close to cocoa, with excellent flavor and high agro-economic potential, its pulp is rich in polyphenols such as flavones, flavan-3-ols and proanthocyanidins, which are known to exert antioxidant and anti-inflammatory effects, including against IBD. The aim of this study is to evaluate the intestinal anti-inflammatory effects of a cupuassu pulp enriched diet in trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) model of rat colitis. Cupuassu pulp was incorporated in Wistar rat's normal diet in two different concentrations (5% and 10%) and were given *ad libitum* thirty five days before intestinal inflammatory induction. Non-colitic and TNBS-control groups (n=7) were also included. Animals were sacrificed 48 hours after the induction of the inflammatory process. Body weight, colonic weight/length and production of inflammatory and oxidative stress markers were evaluated. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Cupuassu pulp at 5% prevented the depletion of endogenous antioxidant glutathione and cupuassu pulp at 10% reduced the activity of myeloperoxidase and the levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 when compared with TNBS-control group. Cupuassu pulp enriched diet also improves mucin production. Cupuassu, at both concentrations, was able to ameliorate the alterations induced by TNBS in inflammatory and oxidative stress markers. The dietary use of this fruit constitutes an important dietary supplement and complementary medicine product to prevention and treatment of human inflammatory bowel disease.

Keywords: *Theobroma Grandiflorum*, cupuassu, Inflammatory Bowel Disease, TNBS.

1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic disease of the gastrointestinal tract and usually refers two related conditions, Ulcerative colitis and Crohn's disease, characterized by chronic and spontaneously relapsing inflammation [1]. Although the etiology of IBD remains unknown, it is believed that a variety of factors such as environmental, genetic, immunological and exacerbated immune response to intestinal microbiota play an important role in the pathogenesis of the inflammatory bowel disease [2]. In fact, intestinal microbiota modulates intestinal homeostasis and immunological functions and a lot of experimental evidences support the role of luminal bacteria in the initiation and development of the intestinal inflammatory process [3]. Several approaches are used to modulate intestinal microbiota, but particular attention has been oriented for dietary use prebiotics. Prebiotics are defined as selectively fermented ingredients that allow specific changes, in both the composition and activity in the intestinal microbiota, which confers benefits upon host well-being and health [4]. Prebiotics stimulate growth of commensal protective bacteria and therefore enhancing resistance to disease-inducing bacteria colonization and contributing to colitis improvement [5]. Prebiotics are fermented by anaerobic colonic bacteria producing short chain fatty acids (SCFAs), mainly acetate, butyrate and propionate. In colon, butyrate is the principal energy source for colonocytes and has an essential role in the maturation of colonic epithelium, regeneration of mucosa, and induction of cell differentiation [4,5]. The impact of prebiotics on the host immune system can also contribute to their beneficial effects once prebiotics modulate the production of cytokines diminishing intestinal inflammation [4].

Oxidative stress induced by the generation of reactive oxygen species (ROS) is a leading cause of a number of human chronic diseases, such as cancer, diabetes, Alzheimer's and other neurodegenerative, cardiovascular, lung, liver, kidney diseases and IBD. Antioxidant compounds, especially polyphenols from plants, counteract the harmful effects caused by ROS and therefore could prevent chronic diseases related to oxidative stress. Actions of antioxidant compounds include scavenging and neutralizing activity against free radical species, inhibiting reactive species production, regulation of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and glutathione peroxidase, counteraction of the glutathione depletion, thus preventing the damage to lipids proteins and nucleic acids [6].

Theobroma grandiflorum (Willd. ex Spreng.) K. Schum. (Malvaceae) known as cupuassu in Brazil, is a tropical fruit widely cultivated in the north the country. Its fruit pulp is highly appreciated because of its acidic taste and intense fragrance and frequently used to prepare juices, ice creams, sweets and jellies [7]. Seeds have received special attention because of their potential for being used to produce an analogue of chocolate called "cupulate" [8]. Phytochemical studies have demonstrated that cupuassu pulp contain potent antioxidant polyphenols including flavones, flavan-3-ols and proanthocyanidins, which are mainly derived from epicatechin, similar to those found in other *Theobroma* species, in particular *Theobroma cacao* [9,10]. Those flavonoids have been described to be associated with potential health benefits such as antioxidant, anticancer, anti-inflammatory activities, cardiovascular protective properties, modulation of immune response and endothelial function [11,12]. The study of cupuassu is of interest due to its phytochemical composition that combines cocoa-like flavan-3-ols and proanthocyanidins with anti-inflammatory 8-hydroxyflavones [13]. Based on this, the aim of our study was evaluate intestinal anti-inflammatory effect of

cupuassu pulp enriched diet in TNBS model of intestinal inflammation.

2. Methods and Materials

2.1. Collect and diet preparation

Fruits of cupuassu were collected, in partnership with researchers from the Universidade Federal do Pará (UFPA), in Paracuiã farm located in the Amazon rainforest city of Terra Alta / Pará-Brazil, in August 2013. After collection, fruits were washed, separation of peel, pulp and seed was made and pulp was frozen at -80° C and brought to Universidade Estadual Paulista (UNESP) in Botucatu/SP to prepare the enriched diet. Cupuassu pulp was incorporated in standard normal rodent food (Nuvilab, PR, Brazil) at two concentrations, 5% and 10%. After homogenization, water was added to produce a paste. The paste was placed in a pelletizer to produce diet pellets containing 5% or 10% cupuassu pulp and stored at refrigerator until the starts of the experiments. The ingredient composition of the diets was calculated from the major nutrients of the normal Nuvilab rodent food, taking into account the addition of 5% or 10% cupuassu pulp (Table1).

2.2. Animals

Tree-week-old male Wistar rats were obtained from ANILAB- Paulinea-SP and were housed in standard environmental conditions (21 ±2°C, 60–70% humidity) with 12 hours light/dark cycles and air filtration (3 or 4 animals/cage). Animals had free access

to water and food. Experimental protocols met the “Guidelines of Animal Experimentation” approved by the Ethics Committee for Animal Research (Protocol number 042/04-CEEA), Institute of Biosciences, UNESP - Universidade Estadual Paulista.

2.3. Induction of colitis and assessment of the inflammatory process

Rats were randomly assigned into 4 groups with 7 animals each. Intestinal inflammation was induced using the method originally described by Morris et al. (1989) [14] using 10 mg of TNBS dissolved in 0.25ml 50% ethanol(v/v). Rats from non-colitic group received 0.25 mL of saline (NaCl 0.9%, pH 7.0) and normal diet (Nuvilab, PR, Brazil) in all experiment. The TNBS-control group received normal diet for 35 days prior colitis induction and 2 days thereafter. Two colitic groups received 5% or 10% enriched-diet with cupuassu pulps in the same conditions of the TNBS-control group. Animals from all groups were killed 2 days after colitis induction.

Animal body weights, occurrence of diarrhea, and total food intake for each group were analyzed daily. Once the rats were killed, the colon was removed aseptically and placed on an ice-cold plate and longitudinally opened.

After, the colonic segment was cleaned of fat and mesentery and blotted on filter paper; each specimen was weighed and its length measured. Colon was longitudinally opened and lesion was measured by its extension and assigned a macroscopic score of 0-10 by two observers unaware of the treatment according to the criteria described by Bell et al. (1995) [15]. Afterwards, colon was divided into different longitudinal pieces for the biochemical assays.

2.4. Biochemical analysis in colon samples

MPO activity was measured according to the technique previously described by Krawisz; Sharon; Stenson (1984) [16]. Samples were suspended in 1 ml of 50mM phosphate buffer incorporating 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (pH 6.0) and minced with scissors for 15 s on an ice-cold plate. The resultant suspension was subsequently diluted to a final 1:20 w/v ratio, homogenised for 1 min with an automatic Heidolphhomogeniser, sonicated for 10 s and subjected to three freeze-thaw cycles. The homogenates were then centrifuged at 7000g and 4° C for 10 min, and the supernatants were assayed for MPO activity. The results are expressed as MPO units per g of wet tissue. Total GSH content was quantified with the recycling assay (Anderson, 1985) [17]. Samples were thawed, minced, diluted to a concentration of 1:20 (w/v) in ice-cold 5% (w/v) trichloroacetic acid and homogenized. The homogenates were centrifuged at 2000g for 10 min at 4° C, the supernatants were collected and centrifuged at 9000g for 5 min at 4° C and those supernatants were used to quantify glutathione content. The results are expressed as nmol per g of wet tissue. ALP activity was measured spectrophotometrically using disodium nitrophenyl phosphate (5.5 mM) as the substrate in 50 mM glycine buffer containing 0.5 mM MgCl₂ pH 10.5 (Bessey; Lowry; Brock, 1946; Smith; Harris; Peters, 1984) [18,19].

Colonic samples for cytokines determinations were weighed, homogenized, minced on an ice-cold plate and resuspended in a centrifugation tube containing 10 mM/L phosphate buffered saline pH 7.4 (1:5 w/v). The tubes were placed in a shaker submerged in a 37°C water bath for 20 minutes and then centrifuged at 9000 x g for 30 s at 4°C. The supernatants were frozen at -80°C until assayed. The IL-1 β and IL-6 levels were quantified by a DuoSet ELISA Kit to measure the concentration of the natural and

recombinant rat enzyme according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA). The results were expressed as pg per ml.

2.5. Preparation of fecal samples and gas chromatography analysis

The fecal samples were collected after death of animals and stored in plastic tube at -80°C. The extraction process was based on the work Garcia-Villalba [20] with modifications. Feces were weighed and frozen at -80°C immediately after collection. Once thawed, feces were suspended in 1ml of phosphoric acid 0,5% per 100mg of sample, were homogenized with vortex for about 1 min and centrifuged for 10min at 17950 x G. Each milliliter of water supernatant was extracted with 1ml of ethyl acetate for 1 min and centrifuged for 10min at 17950 x G. Prior to analysis, a 1ml volume of the organic phase was transferred into a tube and octanoic acid added as internal standard (IS) at a final concentration of 750µg/ml. The IS was used to correct for injection variability between samples and minor changes in the instrument response. Three independent replicate extractions were performed per sample with two injections each.

Chromatographic analysis was carried out using a GC-MS Thermo Scientific, model FOCUS equipped with an automatic liquid sampler (Thermo - triplus DUO), and coupled to a Thermo – ISQ 230ST mass detector. The GC was fitted with a high polarity, polyethylene-glycol fused silica capillary TG-WASMS (30m, 0.25mm id, 0.25m film thickness) and helium was used as the carrier gas. Injection was made in split mode with an injection volume of 1µl and split flow 300ml/min. The injector temperature was 250°C. A glass liner with a glass wool plug at the lower end of the liner was used to avoid the contamination of the GC column with non-volatile fecal

material. Every ten fecal samples injected a blank sample with ethyl acetate was inserted to check for memory effects. The column temperature was initially 80°C, then increased to 120°C at 50°C/min, to 160°C at 70°C/min and kept at this temperature for 50 sec, to 180°C at 70°C/min and kept at this temperature for 1 min, and finally to 210°C at 70°C/min and kept at this temperature for 1 min. Solvent delay was 3.5 min. The detector was operated in electron impact ionization mode (electron energy 70 eV), scanning the 30-250 *m/z* range. Identification of the SCFAs was based on the retention time of standard compounds and with the assistance of the NIST 08 and NIST online libraries. The peaks were quantified as the relative abundance of the total ionic count with respect to the internal standard. The concentration (mg/ml) of each SCFA was calculated using the linear regression equations ($R^2 \geq 0.99$) from the corresponding standard curves obtained with 12 different concentrations.

2.6. Histological Analysis

Representative whole of colon was taken from a region 0.5 cm above the inflamed region. Samples were fixed in ALFAC solution (80% alcohol, acetic acid and formaldehyde) for 24 h at 4 °C. Then the samples were routinely processed for embedding in paraplast, cut into 7 mm thick sections and put into histological slides and it was stained with Hematoxylin–Eosin (HE).

For PAS/Alcian Blue analysis was used the protocol previously described by Linden; Florin; Mcguckin (2008) [21]. De-waxed sections were immersed in 100% ethanol for 10 min, rinsed in water for 10 min, immersed in 3% acetic acid for 2 min and stained in 1% Alcian Blue 8GX in 3% acetic acid (pH 2.5) for 2.5 h. Nonspecific stain was removed with 3% acetic acid and rinsed in water for 10 min. The slides were

then oxidized in 1% periodic acid in water at room temperature for 10 min, washed in water for 5 min, immersed in Schiff's reagent for 10 min, rinsed in water for 5 min and then three times in 0.5% sodium metabisulphite before a final wash in water. To reveal O-acetylated oligosaccharides sections were first treated with 0.1 M KOH for 30 min and then 1 mM periodic acid prior to the Schiff reagent.

2.7. Statistics

Parametric data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M., and the differences between means were tested for statistical significance using one-way analysis of variance (ANOVA). Nonparametric data (score) are expressed as the median (range) and were analyzed with the Kruskal-Wallis test. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$. Differences between proportions were analyzed with the χ^2 test.

3. Results

Intracolonic administration of TNBS resulted in an inflammation after 48h with a severe necrosis of the colonic mucosa, bowel wall thickening enhancing weight/length ratio, hyperemia, diarrhea and adhesions to adjacent organs (Table 2). Treatment with cupuassu pulp both in 5% and 10%, when compared with TNBS-control group was not capable to alter none of these parameters. No statistical differences were observed in food consumption or weight gain between the experimental groups that received the cupuassu pulp enriched diet and those that received the normal diet (data not shown).

Biochemically, the colonic damage was characterized by a reduction in colonic

GSH level, increased MPO and ALP activities and IL-1 β and IL-6 levels when compared with non-colitic animals (Figure 1). Effects of enriched diet with cupuassu pulp at 10% was evidenced by a significant reduction of MPO and ALP activities, accompanied by significant reduction in pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 colonic levels, whereas cupuassu pulp at 5% modulated only total glutathione levels when compared with the TNBS-control group (Figure 1).

Acetate, propionate and butyrate concentrations were reduced in animals with intestinal damage induced by TNBS when compared with non-colitic groups, while no difference was observed on the valerate concentration (Figure 2). Besides Cupuassu pulp enriched diet at 10% reduced concentration of acetate when compared with TNBS-control groups no effects were observed on the butyrate, propionate and valerate concentrations (Figure 2).

Microscopic analysis showed that TNBS disrupt intestinal cytoarchitecture, producing notable edema in the submucosa layer with extensive ulcerations and inflammatory cells infiltrate. Cupuassu pulp enriched diet at 5% and 10% recovered the mucosa, reducing ulceration, edema and inflammatory cells (Figure 3). In addition, TNBS produced mucin depletion in the mucosa and cell surface represented by a minor blue staining. In cupuassu at 5%, the edema was reduced; the goblet cells were replenished and there was a thick blue layer in the cell surface representing the membrane-bond mucin. Cupuassu at 10% showed mild edema with intermediate mucin production in goblet cells with no membrane-bond mucin (Figure 4).

4. Discussion

The present study was designed to evaluate the dietary intervention using

cupuassu pulp as a potential dietary product because this fruit is rich in pectin and antioxidants polyphenols [9]. Enriched diet containing 10% of cupuassu pulp prevented the intestinal inflammatory process induced by TNBS. This effect was evidenced by reduced MPO and ALP activities. Although MPO is considered to be a marker of neutrophil infiltration and its measurement have been used to detect intestinal inflammatory process, this enzyme also generates reactive intermediates, such as hypochlorous acid, leading to oxidative damage of lipids and proteins [22]. Thus MPO is responsible for the reduction in the antioxidant defenses of intestinal epithelia, such as glutathione, an endogenous antioxidant peptide that is reduced in the course of the intestinal inflammatory process [23]. Associated with that, alkaline phosphatase is a sensitive biochemical marker of experimental intestinal inflammation [24].

Experimental evidences suggest that after disintegration of cell membrane occur release of alkaline phosphatase as direct consequence of lipid peroxidation [25], indicating that inhibitory action on the alkaline phosphatase activity can be interpreted, in part, as an antioxidant properties too. Based on that, the decrease in MPO activity promoted by cupuassu pulp at 10% can be considered both anti-inflammatory and antioxidant intestinal activities.

In addition, the causative role of oxidative stress in the IBD pathophysiology has been supported by described protective effects promoted by different antioxidative compounds, including flavonoids, coumarins and other antioxidative compounds [26]. Phytochemical studies have demonstrated that cupuassu pulp and seeds contain potent antioxidant polyphenols like flavones and proanthocyanidins [9]. This way, it is possible that presence of antioxidant compounds in enriched diet with cupuassu pulp at 10% contribute with its antioxidant properties with simultaneous intestinal anti-inflammatory activity.

Associated with that, we identified that enriched diet with cupuassu pulp reduced IL-1 β and IL-6 colonic levels. Intestinal inflammatory process is characterized by imbalance between pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IFN- γ , and anti-inflammatory cytokines such as IL-10, IL-4 and TGF- β . Analysis of the inflamed mucosa from patients with UC and CD revealed an increased expression of pro-inflammatory cytokines and relatively less abundant immunoregulatory cytokines and this imbalance seen to be the central mechanism of modulation and mediation of IBD in response to exposure to various pathogens in the gut [27]. The intestinal anti-inflammatory activity of cupuassu pulp could be related to immunomodulatory activities, once evidences shown that pectin, a major polysaccharide constituent in cupuassu pulp, can modulate the immune system, contributing to the development of cellular and humoral immunity [28].

Finally, we attempt to demonstrate that cupuassu pulp produced intestinal anti-inflammatory activity by prebiotic properties, using for this an evaluation of the SCFAs production in feces. Prebiotics acts like growth factor to commensal microbiota, which inhibits the adherence and invasion of pathogens in the colonic epithelia, altering the colonic pH, enhancing the barrier function, improving mucus and SCFAs production, and increasing cytokine release [29]. In fact, our results demonstrated an improvement in mucus production, however no effects were observed on the SCFAs production. Although cupuassu pulp is rich in pectin, considered a non-digestible nutrient but fermentable product potentially useful as prebiotics, our results demonstrated that cupuassu pulp was unable to improve SCFAs production in colitic animals. This way, differently we expected, cupuassu was not a prebiotic agent and its protective effects as intestinal anti-inflammatory product was related to its ability to modulate oxidative stress and immune response. Thereby, the use of cupuassu pulp may constitute an

important dietary supplement product in the prevention and treatment of human IBD even without act as prebiotic supplementation.

5. Acknowledgements

This work was supported by CNPq (National Council for Scientific and Technological Development)–Brazilian Ministry of Science and Technology (Research Productivity Fellowship). The authors gratefully acknowledge A.M. Herculano for technical support in the collect of cupuassu fruits.

6. References

- [1] Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009; 361:2066-78.
- [2] Orel R, Kamhi Trop T. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology* 2014;20:11505-24.
- [3] Saleh M, Elson CO. Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota dialog. *Immunity* 2011;34:293-302.
- [4] Algieri F, Rodriguez-Nogales A, Garrido-Mesa N, Vezza T, Garrido-Mesa J, Utrilla MP, 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* 2014;62:4285-97.
- [5] Looijer-van Langen MAC, Dieleman LA. Prebiotics in chronic intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:454-62.
- [6] Finley JW, Kong A, Hintze KJ, Jeffery EH, Ji LL, Lei ZG.. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 2011; 59: 6837–6846
- [7] Barros HRdM, García-Villalba R, Tomás-Barberán FA, Genovese MI. Evaluation of the distribution and metabolism of polyphenols derived from cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) in mice gastrointestinal tract by UPLC-ESI-QTOF. *Journal of Functional Foods* 2016;22:477-89.
- [8] Vriesmann LC, de Oliveira Petkowicz CL. Polysaccharides from the pulp of

- cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): Structural characterization of a pectic fraction. Carbohydrate polymers 2009;77:72-9.
- [9] Pugliese AG, Tomas-Barberan FA, Truchado P, Genovese MI. Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) pulp and seeds. Journal of agricultural and food chemistry 2013;61:2720-8.
- [10] Yang, H.; Protiva, P.; Cui, B.; MA, C.; Baggett, S.; Hequet, V.; Mori, S.; Weinstein, I. B.; Kennelly, E. J. New bioactive polyphenols from *Theobroma grandiflorum* (“cupuaçu”). J. Nat. Prod. 2003, 66, 1501–1504.
- [11] Steinberg, F. M.; Bearden, M. M.; Keen, C. L. Cocoa and chocolate flavonoids: implication for cardiovascular health. J. Am. Diet. Assoc. 2003, 103, 215–223.
- [12] Jimenez, R.; Duarte, J.; Perez-Vizcaino, F. Epicatechin: Endothelial Function and Blood Pressure. J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 8823–8830.
- [13] Barberán, F. A. T.; Máñez, S.; Villar, A. Identification of antiinflammatory agents from *Sideritis* species growing in Spain. J. Nat. Prod. 1987, 50, 313–314.
- [14] Morris GP, Beck PL, Herridge W, Depew W, Szcwczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. Gastroenterology 1989;96:795-803.
- [15] Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. Am J Physiol Gastroint Liver Physiol 1995;268:G622-30.
- [16] Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity: assessment of inflammation in the rat and hamster model. Gastroenterology 1984; 87:1344-50.
- [17] Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Methods Enzymol 1985;113:548-55.
- [18] Bessey OA, Lowry OH, Brook MJ. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. J BiolChem 1946;164:321-9.
- [19] Smith GP, Harris H, Peters TJ. Studies of the biochemical and immunological properties of human neutrophil alkaline phosphatase with comparison to the established alkaline phosphatase isoenzymes. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 1984;142:221-30.
- [20] Garcia-Villalba R, Gimenez-Bastida JA, Garcia-Conesa MT, Tomas-Barberan FA, Carlos Espin J, Larrosa M.. Alternative method for gas chromatography-mass spectrometry analysis of short-chain fatty acids in faecal samples. Journal of Separation Science 2012; 35:1906-1913.
- [21] Linden SK, Florin TH, McGuckin MA. Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. PloS one 2008;3:3952.
- [22] Karakas M, Koenig W. Myeloperoxidase production by macrophage and risk of atherosclerosis. Current atherosclerosis reports 2012;14:277-83.
- [23] Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. Free Radic Biol Med 2002;33:311-22.
- [24] Sánchez De Medina F, Martínez-Augustín O, González R, Ballester I, Nieto A, Gálvez, J, Zarzuelo A. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. Bio-chemical Pharmacology 2004;68:2317–2326.
- [25] Dalaklioglu, S, Genc, GE, Aksoy, NH, Akcıt, F, Gumuslu, S.. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid

peroxidation. Hum. Exp. Toxicol 2013.

[26] Witaicenis A, Seito LN, da Silveira Chagas A, de Almeida LD, Jr., Luchini AC, Rodrigues-Orsi P, et al. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 2014;21:240-6.

[27] Hur SJ, Kang SH, Jung HS, Kim SC, Jeon HS, Kim IH, et al. Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. *Nutr Res* 2012;32:801-16.

[28] Voragen AGJ, Coenen G-J, Verhoef RP, Schols HA. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry* 2009;20:263-75.

[29] Choque Delgado GT, Tamashiro WMdSC, Junior MRM, Moreno YMF, Pastore GM. The putative effects of prebiotics as immunomodulatory agents. *Food Research International* 2011;44:3167-73.

Table 1. Ingredient composition of the diets fed to rats (g/100g)

Ingredients	Control diet	5% Cupuassu diet	10% Cupuassu diet
Protein mix	22.0	20.9	19.8
Mineral mix ^a	10.0	9.5	9
Fiber	8.0	7.6	7.2
Fat	4,5	4.2	4.0
Cupuassu pulp ^c	-	5	10

^aMineral mixture provided the following amounts (in milligrams per kilogram): Mn, 60.0; I, 2.0; Co, 1.5; Fe, 50.0; Zn, 60.0; Cu, 10.0, Se, 0.05.

^b Vitamin mixture provided the following amounts (in milligrams per kilogram per diet): vitamin A (25 200 UI); vitamin D3 (2.100 UI); vitamin E (60 mg); vitamin K (12.5 mg); vitamin B12 (60 µg); vitamin B6 (12 mg); folic acid (6 mg); choline (1100 mg); biotin (0.26 mg); niacin (60 mg); thiamine (11 mg); and pantothenic acid (112 mg).

^c Cupuassu fruit pulp (*Theobroma grandiflorum*) containing total dietary fiber (13.7%-14.9%), protein (7.8%-9.8%), lipids (10.5%-14.9%) (Rogez, Buxant et al. 2004)

Table 2. Effects of a enriched diet with cupuassu pulp on macroscopic parameters in TNBS-induced intestinal inflammation

	Score ^a (0-10)	Extension of Lesion ^b (cm)	Weight/length ratio ^b (mg/cm)	Adherence (%)	Diarrhea (%)
Non-colic	0*	0*	90.5±2.6*	0*	0*
TNBS-control	9.0 (7-10)	4.84±0.34	173±5.36	100	80
Cupuassu 5%	8.0 (4-10)	3.89±0.64	160±8.82	100	75
Cupuassu 10%	9.0 (7-10)	4.03±0.44	169±10.2	75	50

^aScore data are expressed as the median (range) and analyzed by Kruskal Wallis test followed by Dunn.^b Extension of lesion and colonic weight data are expressed as the means ± SEM and analyzed by ANOVA followed by Dunnet test.^c Adherence and Diarrhea are expressed in percentage and analyzed by X² test. *p≤0.05 vs TNBS control group.

Figure 1. Effects of a enriched diet with cupuassu pulp on biochemical parameters in TNBS-induced intestinal inflammation. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$.

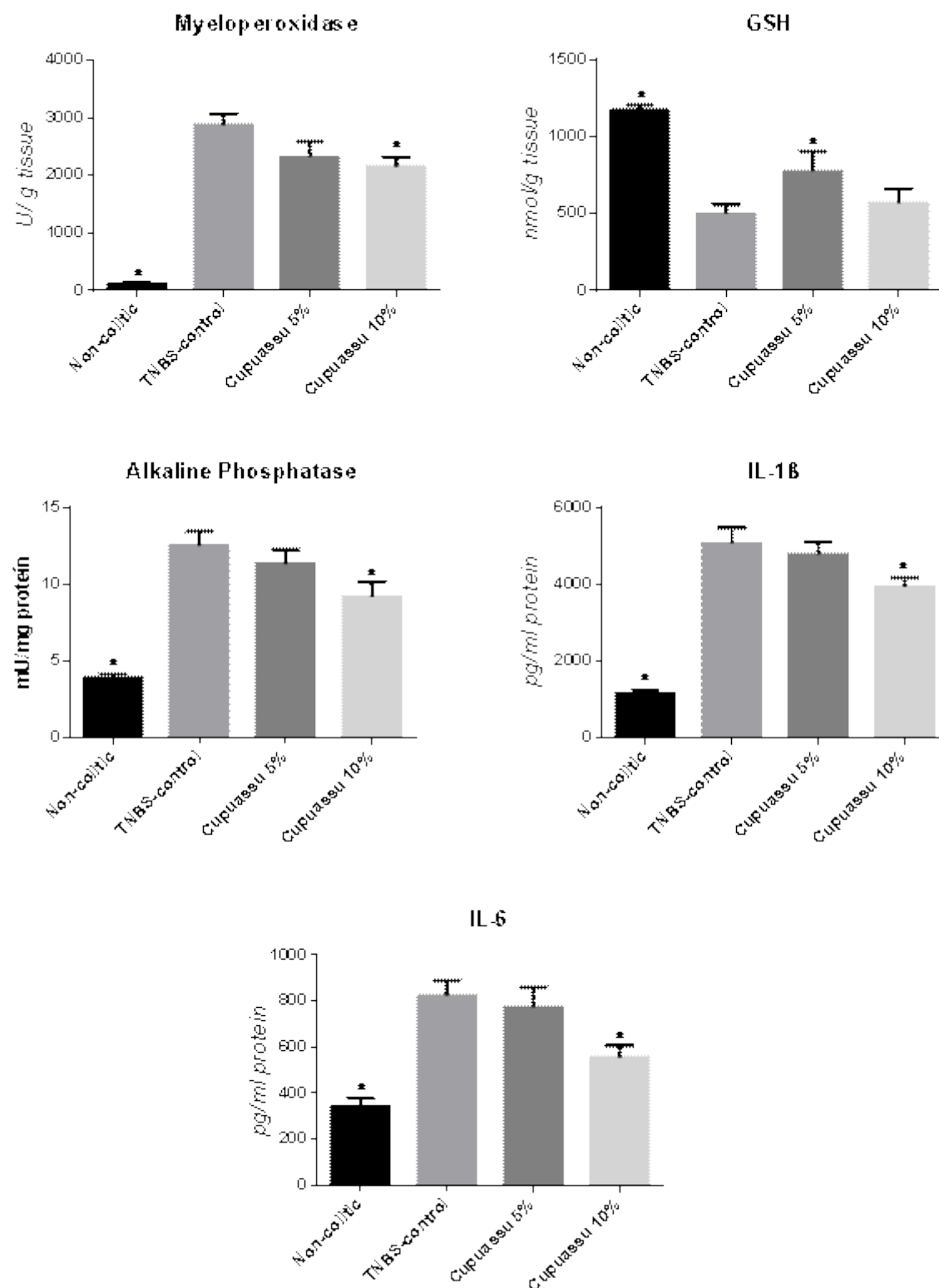


Figure 2. Concentration (mg/ml wet faeces) on the SCFAs in rat faecal samples. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. * $p \leq 0.05$

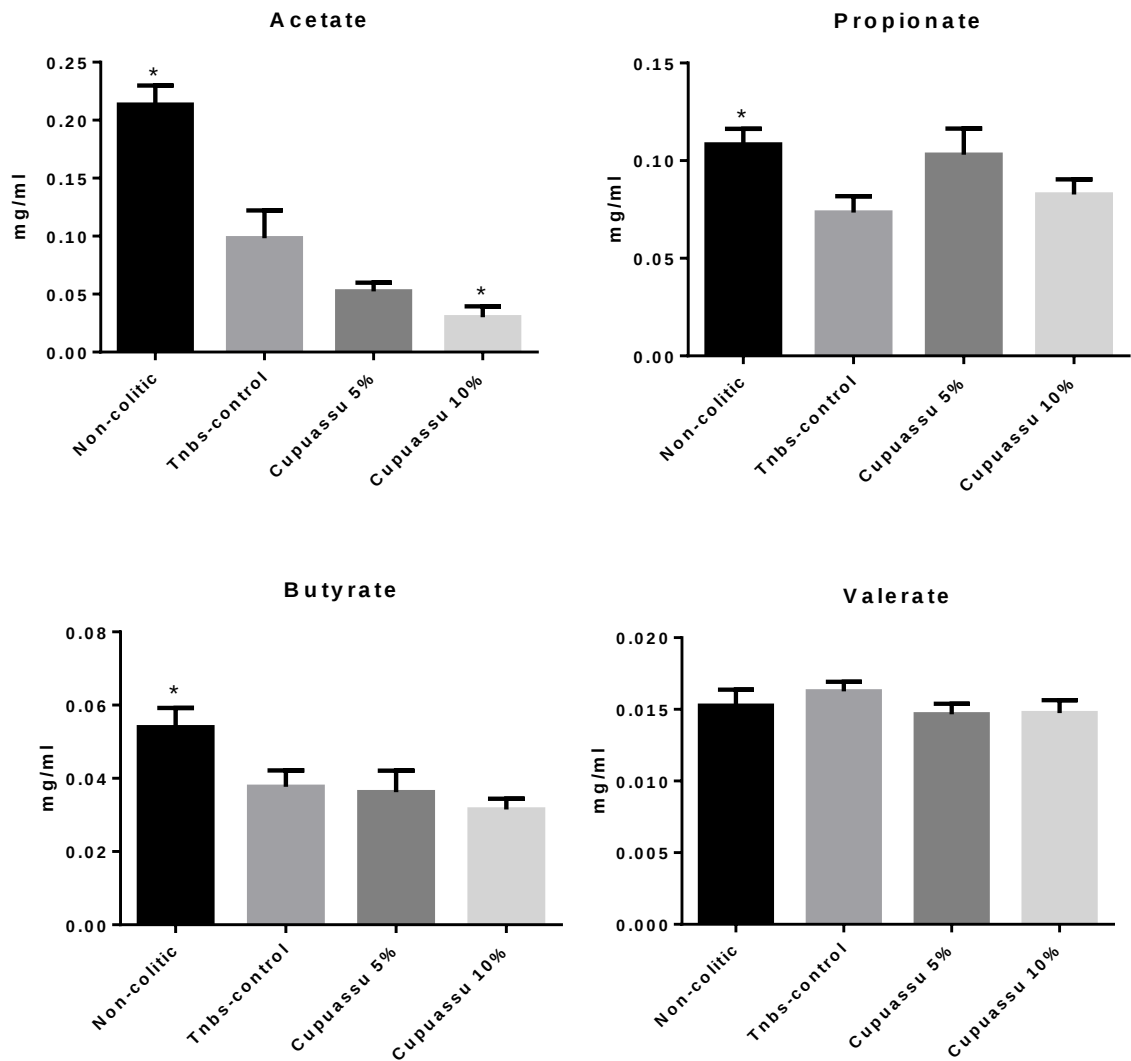
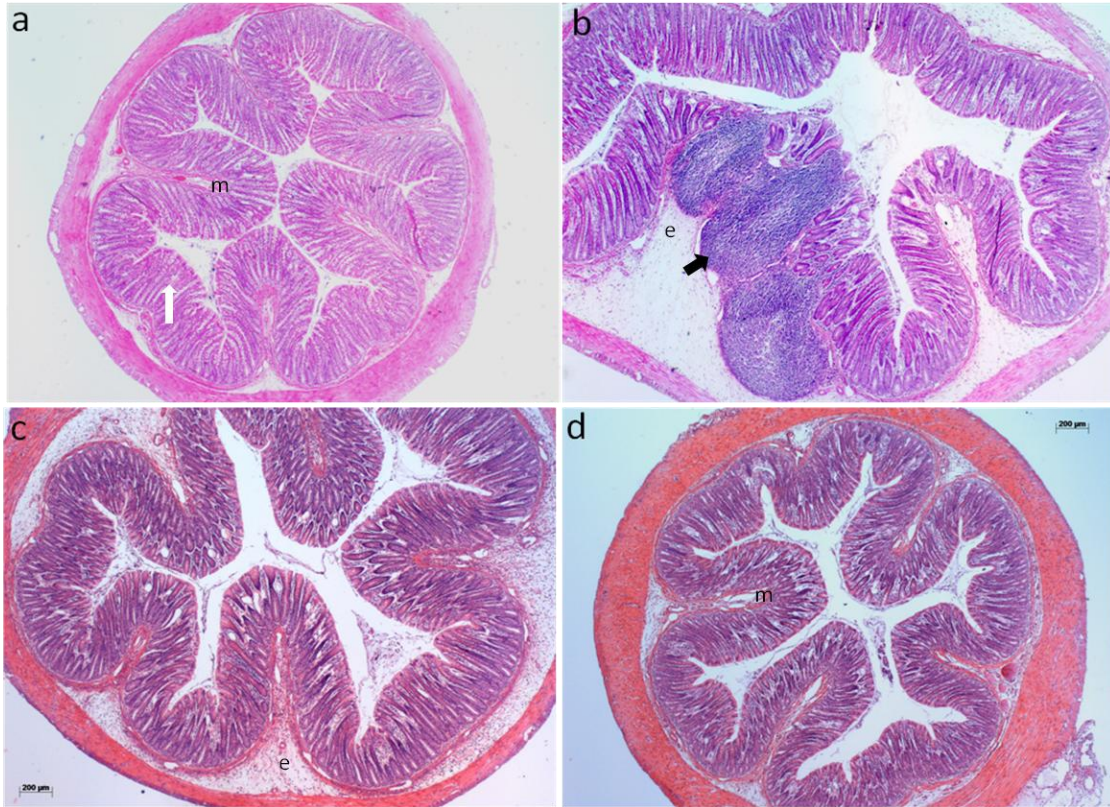
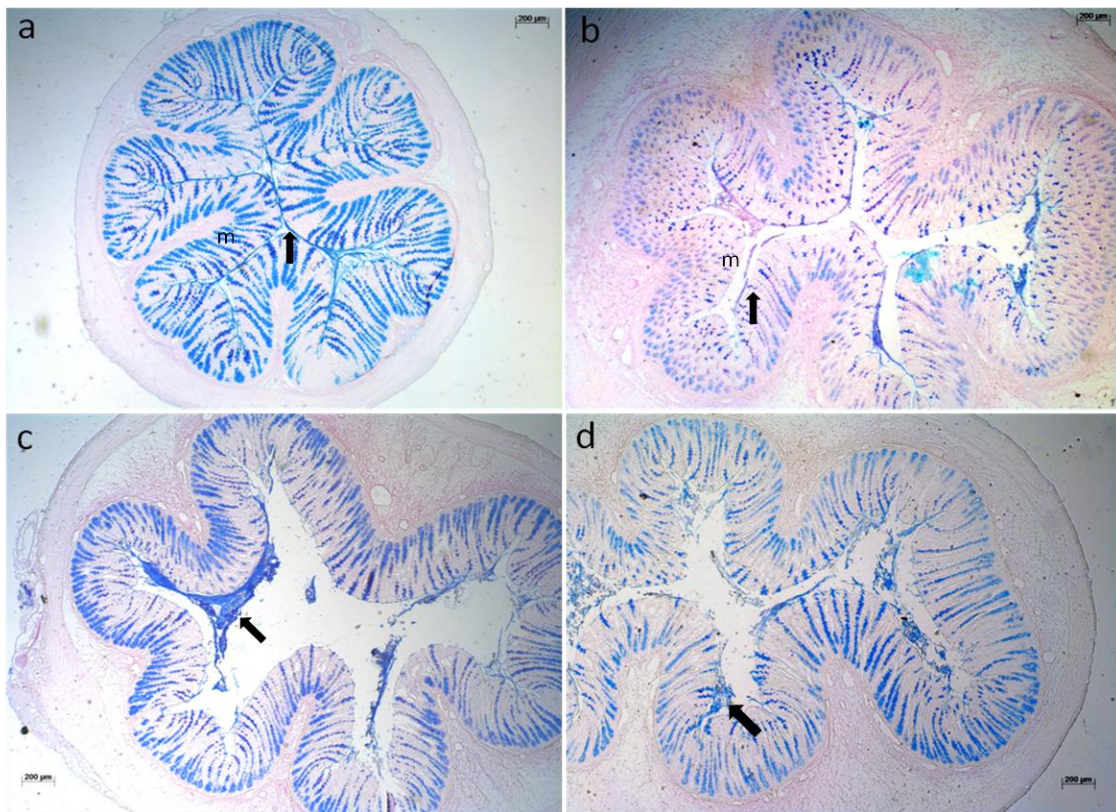


Figure 3. Histological sections of colonic tissue stained with hematoxylin and eosin showing the effects of enriched diet with cupuassu pulp in TNBS-induced intestinal inflammation



Photomicrographies of colon samples (2,5x); Animals of non-colitic group (a) presented numerous straight tubular glands with a lot numbers of goblet cells (white arrow) and lumen epithelium in the mucosa (m) was intact with typical morphology. Differently, TNBS-control group (b) showed alteration in the intestinal cytoarchitecture, notable edema (e) in the submucosa layer with extensive ulcerations (black arrow) and inflammatory cells infiltrate. Cupuassu at 5% (c) and 10% (d) presented no ulceration and edema (e) was reduced, the epithelium was intact (m) and inflammatory cells were partially reduced.

Figure 4. Histological sections of colonic tissue stained with PAS/Alcian blue showing the effects of enriched diet with cupuassu pulp in TNBS-induced intestinal inflammation



Photomicrographies of colon samples (2,5x); non-colitic group (a) presented a blue staining in the mucosa (m) indicating the mucins in goblet cells, there is also a thin blue layer in the membrane representing the membrane-bond mucin (black arrow). TNBS-control group (b) showed mucin depletion in the mucosa (m) and cell surface (black arrow) and a minor blue staining. In cupuassu at 5% (c) there is minor edema, the goblet cells are replenished and presented a thick blue layer in the cell surface representing the membrane-bond mucin (black arrow). Cupuassu at 10% (d) showed mild edema with intermediate mucin production in goblet cells with no membrane-bond mucin (black arrow).

Capítulo III

Avaliação dos efeitos da monoterapia e do tratamento combinado do probiótico *Bifidobacterium breve* com a farinha de banana verde (*Musa* spp AAA) na inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos

Avaliação dos efeitos da monoterapia e do tratamento combinado do probiótico *Bifidobacterium breve* com a farinha de banana verde (*Musa* spp AAA) na inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos

1. Introdução

A banana é uma fruta consumida em todo mundo, existem muitas variedades de banana, as quais são pertencentes ao gênero *Musa* (família Musaceae). É a quarta cultura mais importante nos países tropicais, com uma produção mundial de cerca de 100 toneladas anuais (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007). Frutos de banana nanica verde (*Musa* spp AAA) são ricos em grânulos de amido, contendo entre 73,6% e 79,4%, e da quantidade total de amido (14%), 47,3% a 54,2% é considerado como amido resistente (DA MOTTA et al., 2000; HETTIARATCHI et al., 2011). O amido resistente é um polissacarídeo não digerível usado como fibra alimentar, essas fibras são resistentes à digestão no intestino delgado e são usadas pela microbiota intestinal para a fermentação anaeróbica, produzindo assim ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) (DA MOTTA et al., 2000; SIMMONDS; SHEPHERD, 1995). Por ser rica em amido resistente, a banana nanica verde pode ser considerada um prebiótico. Prebióticos são definidos como ingredientes alimentares não digeríveis que, quando consumido em quantidades suficientes, seletivamente estimulam o crescimento e/ou atividade de um ou de um número limitado de micro-organismos no cólon, o que resulta em benefícios para a saúde (DUNCAN, 2013). Está comprovado que os prebióticos auxiliam na manutenção da remissão dos sintomas na retocolite ulcerativa em humanos, devido ao fato de aumentarem a produção de AGCCs pela microbiota intestinal, os quais são importantes fatores protetores da homeostase do epitélio colônico (GÁLVEZ

et al, 2005).

Probióticos são definidos como micro-organismos vivos que conferem benefícios para a saúde quando ingeridos em quantidades adequadas (GHOURI et al, 2014). Funcionam através de vários mecanismos, incluindo a alteração da composição da microbiota intestinal, imunomodulação e melhora da função da barreira intestinal (MALLON et al, 2007). Os probióticos podem alterar a composição da microbiota intestinal por bloquear sítios de adesão bacteriana, por competição de nutrientes e por efeitos antimicrobianos, através da produção de AGCCs, os quais diminuem o pH colônico inibindo assim o crescimento de bactérias patogênicas (JONKERS et al, 2012; MALLON et al, 2007; OREL; KAMHI TROP, 2014). O butirato, que é o principal AGCC produzido pela fermentação anaeróbica, fornece nutrientes ao epitélio e afeta positivamente a função da barreira intestinal, aumenta a secreção de mucina e melhora a função das *tight-junctions* (OREL; KAMHI TROP, 2014). Além disso, os probióticos podem afetar o sistema imune via alguns mecanismos, como alteração na produção de citocinas e indução da atividade das células T regulatórias. Estes produtos podem ter impacto também na sobrevivência e crescimento das células epiteliais e inibir a apoptose (BELLAVIA et al, 2013). Todos esses mecanismos podem neutralizar a resposta imune colônica exacerbada e inapropriada, que resulta na inflamação intestinal. Embora se desconheça se a alteração da microbiota intestinal é uma causa ou consequência da inflamação intestinal, vários probióticos estão sendo estudados no tratamento e/ou prevenção de recidivas na DII. Os gêneros mais estudados são os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, isolados ou em combinação com outros probióticos ou com prebióticos; os chamados simbióticos (OREL; KAMHI TROP, 2014).

Com isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos de uma dieta enriquecida com farinha de banana verde a 10%, o tratamento com o probiótico

Bifidobacterium breve na concentração de 5×10^8 UFC/ml, assim como a associação da farinha de banana verde com o probiótico no modelo de inflamação intestinal induzido por DSS em camundongos C57BL/6J.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta e processamento do material vegetal

Os frutos verdes de banana nanica foram coletados em uma fazenda de cultivo orgânico em Botucatu/SP em 2013. A identificação taxonômica foi feita no herbário Irina Felanova Gemtchjnicov (Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu) onde um voucher da espécie foi depositado. Após a coleta os frutos foram lavados, cortados transversalmente e secos à 50 ° C por 72 horas em uma estufa de ar circulante. Após secagem os frutos de banana nanica verde foram triturados em um liquidificador industrial obtendo-se assim uma farinha. Essa farinha foi enviada para a Faculdade de Farmácia da Universidade de Granada-Espanha para avaliação dos potenciais efeitos benéficos de uma dieta enriquecida com *Musa* spp AAA na inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos C57BL/6J.

2.2. Confecção dos pellets da dieta enriquecida

O preparo da dieta enriquecida com farinha de banana nanica verde à 10% para o tratamento dos animais foi feita a cada 15 dias. A preparação da dieta foi realizada em Granada-Espanha em parceria com a empresa de laticínios PULEVA FOOD SL[®]. Após a pelletização os pellets foram secos em uma estufa de ar circulante à 50° C durante 24 horas e foram armazenados em um recipiente hermeticamente fechado a fim de se evitar contaminação por micro-organismos.

2.3. Animais

Camundongos machos da cepa C57BL/6J de 20 a 22 g de peso, oriundos do biotério Janvier (St Berthevin Cedex, França), foram usados para os testes de atividade anti-inflamatória intestinal da farinha de banana nanica verde. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Granada-Espanha, durante cinco dias antes do início dos experimentos. Este biotério possui uma temperatura ambiente controlada de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e um ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os camundongos foram alojados em caixas, separadas por grupo, com no máximo doze animais por caixa e alimentados com ração padrão Panlab[®] A04 diet, (Panlab S.A., Barcelona, Espanha) e água corrente *ad libitum*. O estudo foi realizado de acordo com o protocolo experimental aprovado pela comissão de ética em experimentação animal sob protocolo CEEA 2010-286) da Universidade de Granada.

2.4. Delineamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais (n=12):

Animais saudáveis: Alimentados com ração padrão Panlab[®]

Animais com inflamação intestinal:

- Controle-DSS: Alimentados com ração padrão Panlab[®]
- Nanica 10%: Animais alimentados com ração padrão Panlab[®] enriquecida com farinha de banana nanica verde à 10%
- Nanica 10%+*Bifidobacterium breve*: Animais alimentados com ração padrão Panlab[®] enriquecida com farinha de banana nanica verde à 10%+ *Bifidobacterium breve* na concentração de 5×10^8 UFC/ml

- *Bifidobacterium breve*: Animais alimentados com ração padrão Panlab® + *Bifidobacterium breve* na concentração de 5×10^8 UFC/ml

Os animais foram alimentados com a dieta enriquecida de farinha de banana verde à 10%, assim como sua associação com o probiótico *Bifidobacterium breve* (via oral; gavagem) e também somente com o probiótico por 30 dias antes da indução do processo inflamatório intestinal pelo DSS e durante 5 dias durante a indução. O DSS foi administrado na água de bebida dos animais a 2,5% por cinco dias e o índice de atividade da doença (DAI) foi verificado todos os dias a partir do primeiro dia de DSS. Esse índice leva em conta a perda de peso dos animais, consistência das fezes e presença de sangue nas fezes. O DSS foi retirado depois do quinto dia e os tratamentos continuaram por mais dois dias. Como padrão de comparação foi utilizado o grupo controle-DSS (com inflamação intestinal e sem tratamento farmacológico) e o grupo Branco (saudável e sem tratamento farmacológico).

2.5. Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal *in vivo*

2.5.1. Análise clínica dos animais e macroscópica da lesão

Durante o desenvolvimento do experimento, os animais foram avaliados em diferentes parâmetros de caráter geral tais como: consumo de alimento e peso corporal. Ao final do período de tratamento e após a indução do processo inflamatório os animais foram mortos, os cólons foram extraídos e analisados quanto aos prejuízos intestinais considerando-se parâmetros macroscópicos e bioquímicos. Na análise macroscópica foram avaliados peso e comprimento do cólon, existência de aderências entre o intestino e órgãos adjacentes e DAI (Tabela 1)

2.5.2. Expressão relativa de diferentes genes em amostras colônicas e fecais

Foram analisados os genes IL-10, IL-1 β , IL-17, IL-6, TGF- β , TNF- α , MUC-1,

MUC-2, MUC-3, I-CAM, MCP-1, MMP-9, I-NOS, Occludina e ZO-1 por *real-time* RT-qPCR. Foi extraído o RNA total de amostras colônicas por Trizol[®] (Ambion, Austin, TX, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. Todas as amostras de RNA foram quantificadas com o espectrofotômetro NanoDrop[™] (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) e 3µg de RNA foram submetidos a reação de transcrição reversa utilizando *primers* oligo(dT) (Promega, Madison, WI, EUA). A amplificação e detecção do c-DNA foram realizadas em placas de 48 poços no equipamento Eco[™] Real-Time PCR System (Illumina, CA, EUA) com 20ng de c-DNA com o sistema de detecção KAPA SYBR[®] FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Inc., Wilmington, MA, EUA) e *primers* e temperatura de anelamento específicos (Tabela 2). Para normalizar a expressão do m-RNA, a expressão do gene referência GAPDH foi determinada. Assim a expressão relativa de cada gene foi feita pelo método do $\Delta\Delta Ct$.

Foi analisada a expressão relativa gênero-específico em amostras de fezes frescas os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* e *Bacteróides*. As amostras foram diluídas na proporção de 1/10 (p/v) em PBS. 2mL dessa diluição foram utilizados para a extração do DNA bacteriano utilizando o kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as especificações do fabricante. O DNA foi então adicionado em 20µL do *buffer* AE (fornecido no kit), e o DNA purificado foi armazenado à -20°C. *Primers* gênero-específicos (Tabela 2) foram utilizados para a realização da *real-time* RT-qPCR, como descrito acima.

3. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças entre as médias foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida por teste de significância de Dunnet. Dados não paramétricos (DAI) foram expressos

como mediana e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

4. Resultados

A administração via oral de DSS dissolvido em água a 2,5% por cinco dias aos camundongos C57BL/6J resultou em um progressivo aumento no valor do DAI (Figura 1) em relação aos animais saudáveis, isso ocorreu devido a perda de peso dos animais, presença de sangue nas fezes e diarreia. Os tratamentos com a dieta enriquecida com farinha de banana nanica verde a 10%, a associação da farinha de banana verde com o probiótico *B.breve* e o probiótico isolado não foram capazes de prevenir as alterações causadas pelo DSS comparados aos animais do grupo controle-DSS. Além disso, o DSS promoveu o aumento da relação peso/comprimento do cólon quando comparados aos animais saudáveis (Figura 2). Os tratamentos com a farinha de banana nanica verde a 10% assim como sua associação com o probiótico *B.breve* foram capazes de evitar o aumento da relação peso/comprimento do cólon em relação ao grupo controle-DSS (Figura 2), no entanto o tratamento isolado com *B.breve* não foi capaz de evitar essa alteração causada pelo DSS.

A administração do DSS não alterou a expressão relativa dos genes analisados (dados não apresentados), exceto do gene que codifica a proteína MUC-2 em amostra de cólon, em relação aos animais do grupo saudável (Figura 3). O tratamento com a dieta enriquecida com farinha de banana nanica verde a 10% foi capaz de aumentar nas amostras colônicas a expressão relativa do gene que codifica a quimiocina I-CAM-1 e da enzima proteolítica MMP-9 e diminuir a expressão relativa do gênero *Clostridium* em amostras de fezes frescas. A associação da dieta enriquecida com farinha de banana nanica verde a 10% com o probiótico *B.breve* na concentração de 5×10^8 UFC/ml foi

capaz de diminuir a expressão relativa do gênero *Clostridium* em amostras de fezes frescas, aumentar a expressão relativa da enzima proteolítica MMP-9, da proteína MUC-1, da proteína ZO-1 e da citocina TGF- β em amostras de cólon. O tratamento com o probiótico *B.breve* na concentração de 5×10^8 UFC/ml aumentou a expressão relativa da proteína ZO-1. Os tratamentos sempre foram comparados com o grupo controle-DSS (Figura 4).

5. Discussão

Embora a etiologia da DII não é completamente elucidada, sabe-se que a microbiota desempenha um importante papel na sua patogênese. No entanto, nenhum micro-organismo específico está claramente envolvido como um agente causativo dessas doenças, e provavelmente, a inflamação intestinal se inicia e se estabelece através de uma resposta imune exagerada e inapropriada, em indivíduos geneticamente susceptíveis, contra a microbiota intestinal e/ou outros agentes presentes no lúmen intestinal, associado com uma perda de função da barreira epitelial (ABRAHAM; CHO, 2009; SARTOR, 2004; SOKOL et al., 2008; SOKOL, 2009). Desta forma, estratégias terapêuticas que restabeleçam a composição e função normal da microbiota intestinal, assim como possuam efeitos protetores no epitélio intestinal, evitando a quebra da barreira intestinal e aumentando ou mantendo a produção de muco pelas células caliciformes, são importantes metas no tratamento e prevenção de recidivas na DII. A manipulação da composição e função da microbiota intestinal através do uso de prebióticos e probióticos está sendo explorada como um caminho promissor na intervenção terapêutica e profilática contra a inflamação intestinal (GARRIDO-MESA, 2011). Os prebióticos atuam como fonte de polissacarídeos, como por exemplo, o amido resistente. Esses polissacarídeos são fermentados por bactérias anaeróbicas do intestino,

produzindo assim AGCCs, os quais atuam localmente como agentes anti-inflamatórios e imunomoduladores (VILADOMIU et al, 2013). Por outro lado, a presença de bactérias consideradas benéficas, os probióticos, como por exemplo, a *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *L. plantarum*, e *Streptococcus salivarius* spp. e *S. thermophilus*, podem recuperar a função fisiológica e a integridade da barreira epitelial do colônica, assim como reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a integridade das *tight junctions* entre as células epiteliais (MADSEN et al., 2001).

A mucosa intestinal é composta por células epiteliais e células produtoras de muco que estabelecem uma barreira e protegem a lâmina própria de potenciais patógenos presentes no lúmen intestinal, sendo também responsável pela absorção de nutrientes e secreção de resíduos (DOROFEYEV et al, 2013). Alterações na barreira intestinal geram um aumento na permeabilidade a bactérias, fragmentos bacterianos e toxinas, podendo desenvolver uma resposta imune exacerbada a esses patógenos, desencadeando a inflamação intestinal (DOROFEYEV et al., 2013; LONGMAN et al., 2006). O pré-tratamento com a dieta enriquecida com farinha de banana nanica verde a 10% combinado com o probiótico *Bifidobacterium breve* protegeu a integridade da barreira epitelial, evidenciado pelo aumento da expressão relativa de proteína transmembrana pertencente às *tight-junctions zona occludens-1* (ZO-1) e pelo aumento da expressão relativa de MUC-1, que junto com as glicoproteínas MUC-2 e MUC-3, são constituintes primários da camada de muco intestinal (DOROFEYEV et al., 2013). No entanto, não foram observadas alterações na expressão relativa de MUC-2 e MUC-3. Também foi observado um aumento na expressão relativa da citocina anti-inflamatória TGF- β em amostras colônicas. O pré-tratamento isolado com o probiótico *B.breve* na concentração de 5×10^8 UFC/ml também aumentou a expressão relativa da ZO-1, porém não foram

encontradas diferenças significativas em relação à expressão relativa de MUC-1, MUC-2 e MUC-3.

A inflamação intestinal é caracterizada pela infiltração leucocitária na mucosa que contribui no desenvolvimento e perpetuação da resposta inflamatória (MURPHY; MELGAR, 2012). Quimiocinas como MCP-1 e a molécula de adesão ICAM-1 são importantes fatores na migração e infiltração de células do sistema imune para o local da inflamação e contribuem ao processo de dano tecidual e exacerbação da inflamação intestinal (BERNDT; KAO, 2007). A monoterapia com a dieta enriquecida com farinha de banana nanica verde a 10% aumentou a expressão relativa de ICAM-1 comparado ao grupo controle-DSS, no entanto não foi observado diferença estatística em relação a expressão relativa da quimiocina atraente específica de monócitos MCP-1. ICAM-1 é importante no estabelecimento de interações célula-célula e para facilitar a migração endotelial leucocitária, contribuindo assim para o desenvolvimento da lesão tecidual em doenças inflamatórias, como a DII (ABDELBAQI et al., 2006). Esses resultados corroboram com a tendência de aumento do DAI (Figura 1) pela dieta enriquecida com a farinha de banana verde a 10% em relação aos animais do grupo controle-DSS, evidenciando um agravamento da inflamação intestinal com o uso exclusivo desta dieta. Por outro lado, a dieta combinada com *B. breve* não afetou este parâmetro.

As enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases (MMPs), estão envolvidas na degradação e reconstituição da matrix extracelular tanto em processos fisiológicos como patológicos. O aumento da expressão relativa das MMPs está associado com o dano tecidual na DII, e existe uma relação dessas enzimas com citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α (MEIJER et al., 2007; NAITO; YOSHIKAWA, 2005). A monoterapia com a dieta enriquecida com farinha de banana verde a 10%,

assim como sua associação com o probiótico *B.breve* aumentaram a expressão relativa colônica da MMP-9 em relação ao grupo controle-DSS.

Por outro lado, a monoterapia com a dieta enriquecida com farinha de banana verde a 10%, assim como sua associação com o probiótico *B.breve* diminuíram a expressão relativa, em amostras fecais, do gênero *Clostridium*, que é considerado uma bactéria patogênica em potencial. Os outros gêneros analisados em amostras fecais não foram alterados por nenhum dos tratamentos.

Com base nos resultados encontrados no modelo de inflamação intestinal induzido por DSS em camundongos C57BL/6J, foi observado que o DSS diminuiu a expressão relativa de MUC-2, em relação ao grupo saudável, sem afetar positiva ou negativamente os outros genes analisados. A monoterapia com a farinha de banana nanica verde a 10%, assim como sua associação com o probiótico *B.breve* e a monoterapia com *B.breve* não interferiram na expressão gênica de MUC2. Por outro lado, a dieta enriquecida com farinha de banana verde a 10% associada com o probiótico *B.breve* protegeu a mucosa colônica evitando a redução da expressão relativa de ZO-1 e MUC-1 induzidas pelo DSS, aumentando a expressão relativa de TGF- β e reduzindo a expressão relativa em amostras fecais das bactérias do gênero *Clostridium*. Por outro lado, a monoterapia com a dieta enriquecida com farinha de banana nanica verde a 10% agravou a inflamação intestinal causada pelo DSS, como demonstrado pelos valores do DAI e o aumento da expressão relativa de ICAM-1 e MMP-9, resultados contraditórios com aqueles produzidos em nosso laboratório pela dieta enriquecida com farinha de banana nanica verde no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos (SCARMÍNIO ET AL., 2012).

6. Referências bibliográficas

ABDELBAQI, M. et al. Regulation of dextran sodium sulfate induced colitis by leukocyte beta-2 integrins. **Laboratory Investigation**, vol. 86, p.380–390, 2006.

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

BELLAVIA, M., et al. Gut microbiota imbalance and chaperoning system malfunction are central to ulcerative colitis pathogenesis and can be counteracted with specifically designed probiotics: a working hypothesis. **Med Microbiol Immunol**, vol. 202, p.393-406, 2013.

BERNDT, B.E; KAO, J.Y. The role of dendritic cells in the development of acute dextran sulfate sodium colitis. **Journal of Immunology**, vol. 179, p.6255–6262, 2007.

DA MOTTA, R.V., et al. Composition and functional properties of banana flour from different varieties. **Starch-Starke**, vol. 8, p.52-63, 2000.

DOROFEYEV, A.E. et al. Mucosal barrier in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Gastroenterology Research and Practice**, p.431, 2013.

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

GÁLVEZ, J., et al. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. **Mol Nutr Food Res**, vol. 49, p.601-608, 2005.

GARRIDO-MESA, J., et al. A new therapeutic association to manage relapsing experimental colitis: Doxycycline plus *Saccharomyces boulardii*. **Pharmacological Research**, vol. 97, p.48-63, 2015.

GHOURI, Y.A., et al. Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease. **Clin Exp Gastroenterol**, vol. 7, p.473-487, 2014.

HESLOP-HARRISON, J.S; SCHWARZACHER, T. Domestication, genomics and the future for banana. **Ann Bot**, vol.100, p.1073-84, 2007.

HETTIARATCHI, U.P., et al. Ekanayake S, Welihinda J. Chemical composition and glycemic responses to banana varieties. **Int J Food Sci Nutr**, vol. 62, p.307-309, 2011.

JONKERS, D., et al. Probiotics in the management of inflammatory bowel disease: a systematic review of intervention studies in adult patients. **Drugs**, vol. 72, p.803-823, 2012.

LONGMAN, R.J. et al. Alterations in the composition of the supramucosal defense barrier in relation to disease severity of ulcerative colitis. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, vol. 54, p.1335–1348, 2006.

MADSEN, K. *et al.* Probiotic Bacteria Enhance Murine and Human Intestinal Epithelial Barrier Function. **Gastroenterology**, vol.121, p.580–591, 2001.

MALLON, P., *et al.* Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. **Cochrane Database Syst Rev**, 2007.

MEIJER, M.J.W. *et al.* Increased mucosal matrix metalloproteinase-1, -2, -3 and -9 activity in patients with inflammatory bowel disease and the relation with Crohn's disease phenotype. **Digestive and Liver Disease**, vol. 39, p.733–739, 2007.

MURPHY, C.T. *et al.* Shining a light on intestinal traffic Clinical and Developmental **Immunology**, vol. 157, p.808, 2012.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease. **Molecular Aspects of Medicine**, vol. 26, p.379–390, 2005.

OREL, R.; KAMHI TROP, T. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, vol. 20, p.11505–24, 2014.

SARTOR, R.B. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. **Gastroenterology**, vol, 126, p.1620–33. 2004.

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.

SIMMONDS, N. W., SHEPHERD, K. Taxonomy and origins of cultivated bananas. **Bot J Linn Soc**, vol. 55, p.302-312, 1995.

SOKOL, H. Analysis of bacterial communities of IBD patients: what has it revealed? **Inflamm Bowel Dis**. vol. 14, p.858–67, 2008.

SOKOL, H., *et al.* Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. **Inflamm Bowel Dis**, vol. 15, p.1183–9, 2009.

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

7. Tabelas e figuras

ESCORE	PERDA DE PESO	CONSISTÊNCIA FEZES	SANGRAMENTO RETAL
0	Nenhuma	Normal	Normal
1	1-5%	Fezes pastosas	Sangramento intenso
2	5-10%		
3	10-20%		
4	>20%	Diarreia	

Tabela 1: Escore do índice de atividade da doença (DAI). O valor do DAI é uma combinação dos escores da perda de peso, consistência das fezes e do sangramento retal dividido por 3. Adaptado de Cooper et al, 1993.

Tabela 2: Sequencia dos *primers* utilizados na *real-time* RT-qPCR

Gene	Sequencia	Temperatura de Anelamento (°C)
ZO-1	F GGGGCCTACACTGATCAAGA R TGGAGATGAGGCTTCTGCT	56
I-CAM-1	F CAGTCCGCTGTGCTTTGAGA R CGGAAACGAATACACGGTGAT	60
MMP-9	F TGGGGGGCAACTCGGC R GGAATGATCTAAGCCCAG	60
MUC-1	F GCAGTCCTCAGTGGCACCTC R CACCGTGGGGCTACTGGAGAG	60
MUC-2	F GATAGGTGGCAGACAGGAGA R GCTGACGAGTGTTGGTGAATG	60
MUC-3	F CGTGGTCAACTGCGAGAATGG R CGGCTCTATCTCTACGCTCTC	60

Occludina	F ACGGACCCTGACCACTATGA R TCAGCAGCAGCCATGTACTC	56
IL-1 β	F TGATGAGAATGACCTCTTCT R CTTCTTCAAAGATGAAGGAAA	56
IL-6	F TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC R TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC	60
IL-17	F CCTGGGTGAGCCGACAGAAGC R CCACTCCTGGAACCTAAGCAC	60
IL-10	F TCCTTAATGCAGGACTTTAAGGG R GGTCTTGGAGCTTATTAATAAT	56
MCP-1	F CAGCTGGGGACAGAATGGGG R GAGCTCTCTGGTACTCTTTTG	60
I-NOS	F GTTGAAGACTGAGACTCTGG R GACTAGGCTACTCCGTGGA	56
TGF- β	F CATCGATGAGCTGATGCAGT R CAGATAGCCCATCACCTGT	60
TLR-4	F TGCCGGCACCCTGAGGACTAC R GGGCTGCCACGAGGAACA	56
TNF- α	F AACTAGTGGTGCCAGCCGAT R CTTACAGAGCAATGACTCC	56
GAPDH	F CCATCACCATCTTCCAGGAG R CTGCTTCACCACCTTCTTG	60
Bacteroides	F ATAGCCTTTCGAAAGRAAGAT R CCAGTATCAACTGCAATTTTA	50
Clostridium	F AAATGACGGTACCTGACTAA R CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	50

Bifidobacterium	F CTCCTGGAAACGGGTGG	50
	R GGTGTTCTTCCCGATATCTACA	
Lactobacillus	F GGAAACAGATGCTAATACCG	61
	R CACCGCTACACATGGAG	

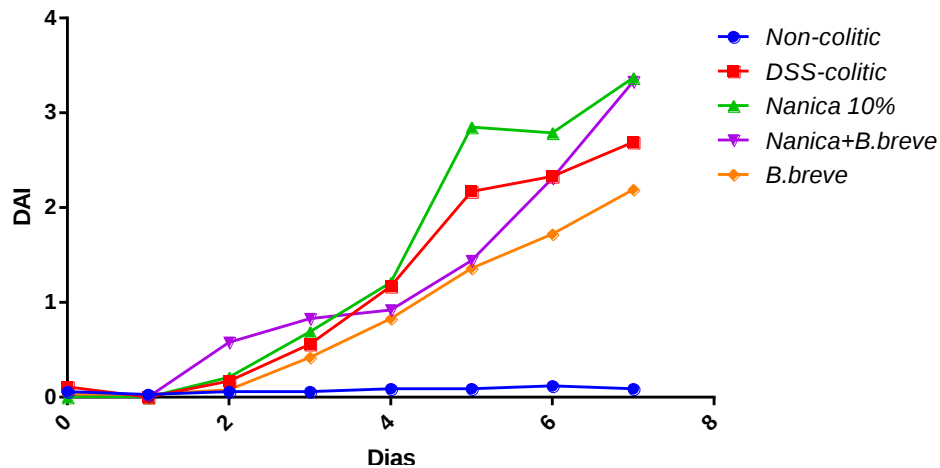


Figura 1: Efeitos do tratamento com farinha de banana nanica verde à 10%, da sua associação com o probiótico *B.breve* e do probiótico isolado no índice de atividade da doença (DAI).

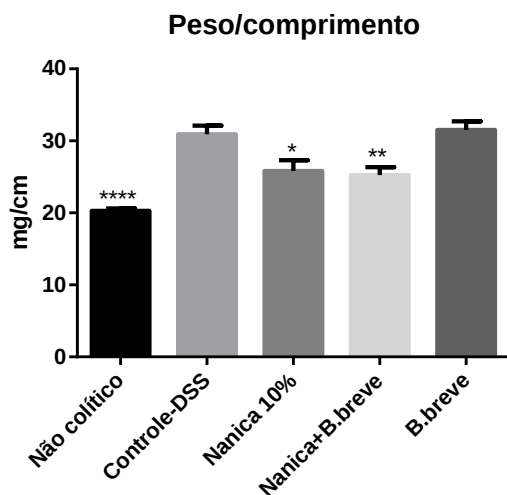


Figura 2: Efeitos do tratamento com farinha de banana nanica verde à 10%, da sua associação com o probiótico *B.breve* e do probiótico isolado na relação peso/comprimento do cólon. Dados são expressos como média $\pm$ E.P.M, comparados ao grupo controle-DSS. * $p \leq 0.05$.

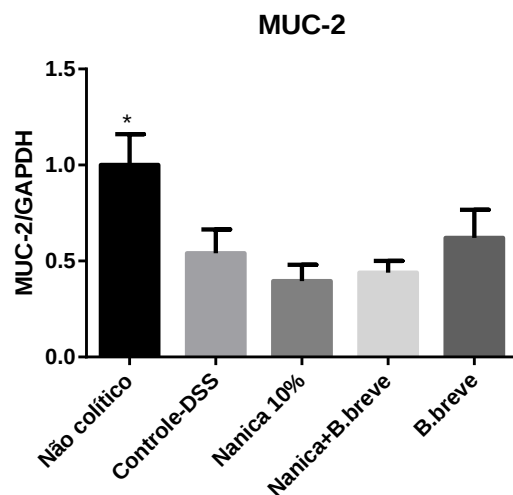


Figura 3: Efeitos do DSS na expressão relativa de MUC-2 no modelo de inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos C57BL/6J. Dados são expressos como média $\pm$ E.P.M, comparados ao grupo controle-DSS. * $p \leq 0.05$.

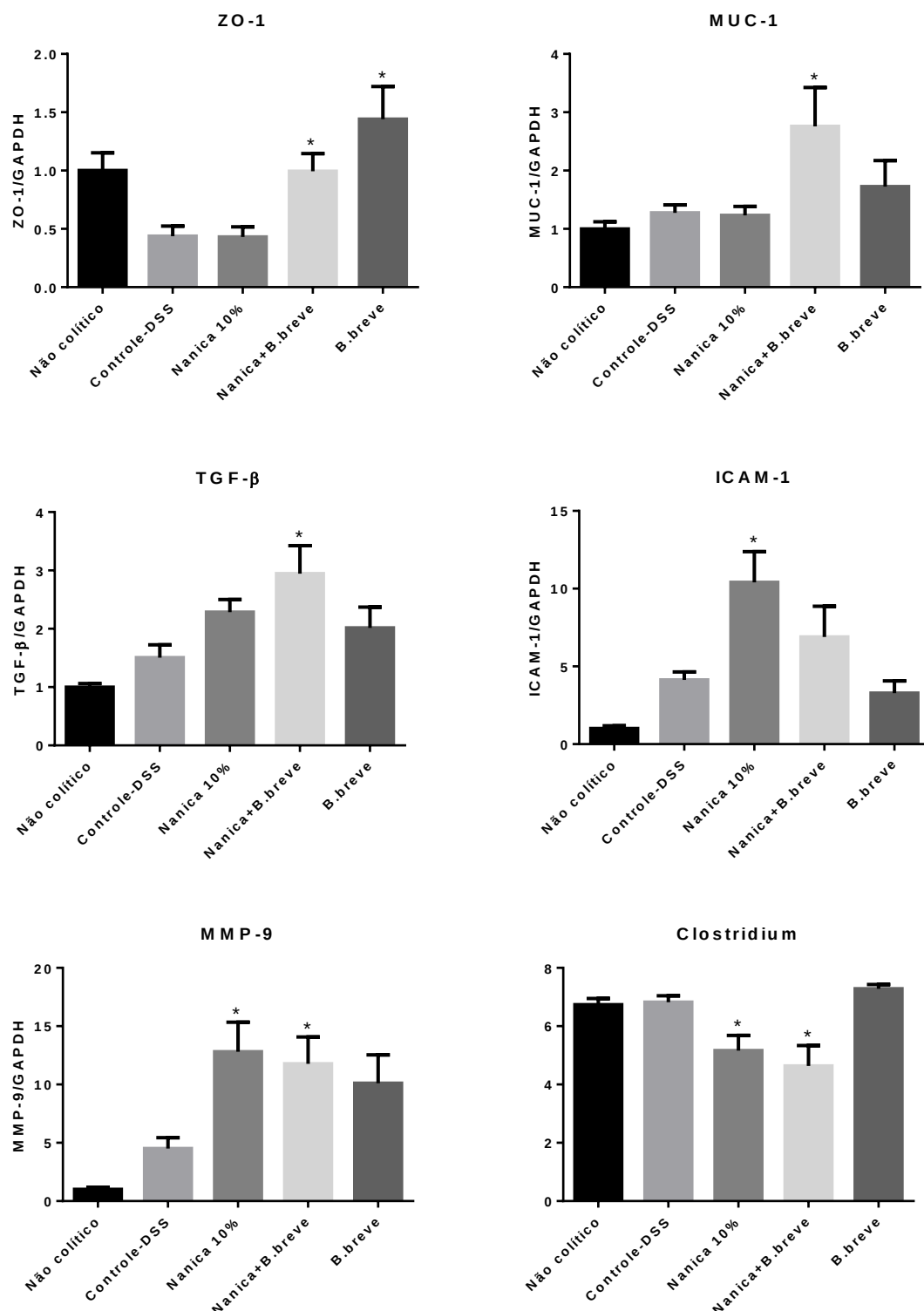


Figura 4: Efeitos do tratamento com farinha de banana nanica verde à 10%, da sua associação com o probiótico *B.breve* e do probiótico isolado na expressão relativa de diferentes genes no modelo de inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos C57BL/6J. Dados são expressos como média ± E.P.M, comparados ao grupo controle-DSS. * $p \leq 0.05$.

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 β 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- β 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.