



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THANISE PITELLI PAROSCHI

**EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE SULFASSALAZINA ISOLADA
OU ASSOCIADA À LACTOBACILLUS PLANTARUM (LP-
115) E/OU ÁCIDOS GRAXOS N-3 NA COLITE
EXPERIMENTAL**

THANISE PITELLI PAROSCHI

**EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE SULFASSALAZINA ISOLADA
OU ASSOCIADA À LACTOBACILLUS PLANTARUM (LP-
115) E/OU ÁCIDOS GRAXOS N-3 NA COLITE
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lucia Helena da Silva Miglioranza

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Andréa Name Colado Simão

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P257e Paroschi, Thanise Pitelli.

Efeito da utilização de sulfassalazina isolada ou associada à *Lactobacillus plantarum* (LP-115) e/ou ácidos graxos N-3 na colite experimental / Thanise Pitelli Paroschi. – Londrina, 2014.
78 f. : il.

Orientador: Lúcia Helena da Silva Miglioranza.

Coorientador: Andréa Name Colado Simão.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Probióticos – Teses. 2. Intestinos – Doenças inflamatórias – Teses. 3. Rato como animal de laboratório – Teses. 4. Nutrição – Pesquisa – Teses. 5. *Lactobacillus plantarum* – Teses. 6. Stress oxidativo – Teses. I. Miglioranza, Lúcia Helena da Silva. II. Simão, Andréa Name Colado. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 664:637.1

THANISE PITELLI PAROSCHI

**EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE SULFASSALAZINA ISOLADA OU
ASSOCIADA À LACTOBACILLUS PLANTARUM (LP-115) E/OU
ÁCIDOS GRAXOS N-3 NA COLITE EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Helena da Silva
Miglioranza
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Isaias Dichi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. José Wander Breganó
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra Ana Flávia de Oliveira
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Profa. Dra. Suely Mayumi Obara Doi
Universidade Estadual de Londrina- UEL

Londrina, 01 de setembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a minha orientadora Dra. Lucia Miglioranza, não só pela orientação durante o período de mestrado, mas por todas as palavras de apoio em momentos felizes e tristes destes dois anos. À minha co-orientadora Dra. Andrea Name, que é, para mim, um exemplo de mulher batalhadora e inteligente. Ao Dr. Isaias Dichi que desde o começo depositou confiança no meu trabalho e foi o principal responsável pela realização deste sonho. Ao Dr. José Wander Breganó que também foi meu orientador, me apoiou em toda a realização do experimento, me ajudando até em domingos e feriados e sua querida esposa Regina, que também nos auxiliou muito. Agradeço imensamente a todos vocês, por me deixarem trabalhar nesse grupo maravilhoso, mesmo com toda minha insegurança e falta de tempo.

Agradeço também às Dras. Clísia Carreira e Suely Doi pela contribuição na minha qualificação. E a todos os professores e equipe do Departamento de Ciência de Alimentos (DCTA) pelos conhecimentos e experiências compartilhadas, em especial à sempre disposta Sandra Rezende, que foram responsáveis pela minha formação e aprendizagem.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Aos meus colegas de turma, que tão pouco se tornaram os “Mestrandos Gente Boa (MGBs)” como costumamos nos chamar, Bruna, Marcela, Melina, Naiara, Nathalia, Rodolfo, Suzana e Leniza, que estiveram comigo durante estes dois anos e principalmente a Fernanda, que se tornou uma irmã de orientadora, que me mostrou o quanto é digno de admiração ter um coração bom. Além disso, agradeço minhas amigas cultivadas desde a época do colegial e também as amigas da faculdade pela constante amizade, compreensão e companheirismo.

Gostaria de agradecer às pessoas que me ajudaram durante a realização desse projeto, seja nas análises, no experimento e no compartilhamento do conhecimento, principalmente ao Jorge Sales, Naiara Mari, Sayonara Rangel, Lorraine Sales e Fabíola Barreto. E principalmente ao Rafael Goulart, que se dedicou muito mais a este projeto do que um simples aluno de iniciação científica, agradeço pela ajuda na gavagem diária, aos encontros na biblioteca para estudo e

também pelas palavras de apoio, admiro a sua dedicação e inteligência. Aos técnicos Izaltino Farias e José e ao veterinário Donizete Belitardo, do Biotério do CCS/ UEL, que auxiliaram na manipulação dos animais durante os experimentos. Ao técnico Luciano da Silveira pelo apoio na realização das dosagens bioquímicas. A minha amiga Flavia Troncon Rosa, que me incentivou e me deu todo o apoio nessa finalização.

E acima de tudo, gostaria de agradecer às pessoas mais importantes da minha vida, sem elas eu não seria nem metade da pessoa que sou, minha mamita, Gina e minha irmã Thaiane que sempre me apoiam e fazem o possível e o impossível para me fazer feliz. São minhas primeiras melhores amigas e as pessoas pelo qual possuo um amor incondicional.

E ao anjinho Wilsinho, que foi meu verdadeiro pai. Ele que, se foi logo que entrei no mestrado, deixando um vazio enorme no coração. Mas, em todas as vezes que quis desistir dessa batalha, me fez lembrar do enorme sorriso que abriu quando veio a aprovação no mestrado. A realização desse sonho também é sua, meu anjinho no céu, porque você sempre foi o maior incentivador e sei que está me abençoando e me guiando. Saudades eternas!

E acima de tudo à Deus, meu papai do céu, pois sei que tudo o que desejo está se tornando realidade pois Ele está preparando e cuidando como sempre fez minha vida inteira!

Enfim, aos meus familiares e a todos que participaram dessa trajetória...

Meu MUITO OBRIGADA!

Bíblia sagrada

*E o Senhor respondeu assim: “Escreve esta visão, grava-a em tabuinhas, para que possa ser lida facilmente; porque há ainda uma visão para um termo fixado, ela se aproxima rapidamente de seu termo e não falhará. Mas **se tardar, espere-a, porque ela se realizará com toda certeza e não falhará**”. Amém.*

Habacuc 2:2-3

PAROSCHI, Thanise Pitelli; SIMÃO, Andréa Name Colado; MIGLIORANZA, Lucia Helena da Silva. **Efeito da utilização de sulfassalazina isolada ou associada à *Lactobacillus plantarum* (Lp-115) e/ou ácidos graxos n-3 na colite experimental.** 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A Retocolite Ulcerativa Inespecífica (RCUI) é um processo crônico, de etiologia desconhecida que acomete o trato gastrointestinal, principalmente na mucosa do cólon. Sua incidência vem aumentando mundialmente e estudos demonstram a participação de aspectos inflamatórios e de estresse oxidativos. A prevenção e o tratamento com nutrientes imunomoduladores é uma modalidade terapêutica que apresenta perspectivas interessantes e promissoras. Na RCUI existe uma alteração na microbiota bacteriana normal e aumento de patógeno, assim a utilização de probióticos tem resultado no prolongamento da fase de remissão. Além disso, a utilização de ácidos graxos poliinsaturados n-3, presentes no óleo de peixe, apresenta resultados favoráveis na diminuição dos sintomas e a no uso de corticoesteróides, promovendo melhora colônica, histológica e endoscópica. Assim, objetivou-se avaliar o efeito prévio da associação de ácidos graxos n-3, *Lactobacillus plantarum* (Lp-115) e sulfassalazina, sobre o estresse oxidativo e o processo inflamatório da RCUI induzida com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em 50 ratos Wistar machos. Para isso, os animais foram divididos em cinco grupos que sofreram indução da colite no 14º dia após o início do tratamento, sendo o Grupo A denominado de controle, Grupo B recebeu a administração de sulfassalazina diariamente, o Grupo C, D e E recebeu, além da sulfassalazina, *Lactobacillus plantarum*, óleo de peixe e a associação destes, respectivamente. Todos os grupos foram alimentados com água e ração *ad libitum* e as condições ambientais foram controladas. Obtiveram-se amostras de sangue e tecido para a realização dos testes de estresse oxidativo (produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), capacidade antioxidante total (TRAP) e hidroperóxidos lipídicos) e marcadores da resposta inflamatória (mieloperoxidase, fosfatase alcalina, Gama-GT, albumina e proteínas totais). Os dados foram submetidos à análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis com post teste de Dunn, adotou-se $p < 0,05$. Observou-se que no Grupo C e Grupo D houve a diminuição da atividade de mieloperoxidase no tecido quando comparada ao Grupo A. Ao comparar o Grupo B *versus* os tratamentos auxiliares pode-se observar que diminuição da atividade de mieloperoxidase ao administrar o n-3. Sobre o estresse oxidativo, a diferença está relacionada à AOPP, com diminuição significativa no Grupo B e no Grupo E em comparação ao Grupo A, no entanto, estes não foram diferentes entre si. Conclui-se que a diminuição da atividade da mieloperoxidase foi um efeito benéfico promovido pelo consumo de n-3, porém ao avaliar o estresse oxidativo, os tratamentos complementares não representaram melhora quando comparado ao tratamento com sulfassalazina. Possivelmente, devido à grave lesão causada para indução da colite o período de intervenção não foi suficiente para que o tratamento complementar promovesse efeitos significativos sobre outros parâmetros.

Palavras-chave: Doença inflamatória intestinal. Probióticos. Terapia nutricional. Estresse oxidativo. Aspectos inflamatórios.

PAROSCHI, Thanise Pitelli; SIMÃO, Andréa Name Colado; MIGLIORANZA, Lucia Helena da Silva. **Effect of sulfasalazine alone or combined with *Lactobacillus plantarum* (Lp-115) and/or n-3 fatty acids in experimental colitis.** 2014. 71 p. Dissertation (Master in Food Sciences) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The Ulcerative Colitis (UC) is a chronic inflammatory disease with unknown etiology that affects the gastrointestinal tract, specially the colonic mucosa. The incidence worldwide is increasing, and studies have shown the association of inflammation and oxidative stress on UC occurrence. Besides that, this disease is accompanied by an alteration in normal bacterial flora and the increase of specific pathogenic microorganisms. Thus, the use of immunomodulatory nutrients and probiotics has resulted in prolongation of the remission phase and considered promising strategies for prevention and treatment of UC. The use of long chain n-3 fatty acids from fish oil has shown favorable results in UC decreasing symptoms, corticosteroids use, and improving colonic histology and endoscopy. This study aimed to evaluate the previous effect of n-3 fatty acids from fish oil and/or the probiotic *Lactobacillus plantarum* (Lp-115), combined with sulfasalazine, on oxidative stress and inflammatory markers on trinitro-benzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in male Wistar rats. All animals suffered induction of colitis and then were divided into five groups: control group (A), daily administration of sulfasalazine group (B), daily administration of sulfasalazine plus *Lactobacillus plantarum* fermented milk group (C), daily administration of sulfasalazine plus n-3 fatty acids (D), and daily administration of sulfasalazine plus a combination of n-3 fatty acids and fermented milk group (E). All groups were fed water and food ad libitum and environmental conditions were controlled. On the 14th day of treatment, the animals suffered induction of colitis. Blood and tissue samples were collected to determination of oxidative stress (Advanced Oxidation Protein Products - AOPP, Total Antioxidant Capacity - TAC and Lipid peroxidation) and inflammatory markers (Myeloperoxidase - MPO, Alkaline Phosphatase, Gamma-GT, Albumin and Total Protein). A Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test was applied to determine differences between groups. The level of significance was set at 5 % ($p < 0.05$). Results showed that groups C and D presented reduced tissue levels of myeloperoxidase compared to control group. Comparing to Group B, only group D reduced myeloperoxidase activity. Concerning oxidative stress, differences on levels of AOPP were found between groups B and E compared with group A, with a significant reduction. Groups B and E presented similar results. According to the present study it is possible to conclude that the reduction of myeloperoxidase activity was the main beneficial effect of the use of n-3 fatty acids combined to sulfasalazine to treat UC. Regarding oxidative stress, additional treatments did not improve any markers compared to sulfasalazine. It is suggested that the intervention period was not enough to demonstrate significant effects of the adjuvant treatments on reducing inflammation and oxidative stress in colitis-induced rats, possible due to the severe damage caused by the induction with TNBS.

Keywords: Inflammatory bowel disease. Probiotics. Nutritional therapy. Oxidative stress. Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-ASA	Ácido 5-aminossalicílico
AA	Ácido araquidônico
Ácidos graxos n-3	Ácidos graxos ômega-3
ALA	Ácido α -linolênico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOPP	Produtos avançados de oxidação proteica
CP	Controle positivo
DC	Doença de Crohn
DHA	Ácido docosahexaenóico
DII	Doenças inflamatórias intestinais
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Ácido eicosapentaenoico
Gama-GT	Gama-Glutamil Transferase
GLA	Ácido γ -linolênico
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MPO	Mieloperoxidase
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
PBS	Tampão fosfato salino
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
QM	Quimiluminescência induzida por t-Butil hidroperóxido
RCUI	Retocolite Ulcerativa Inespecífica
TNBS	Ácido trinitro-benzeno sulfônico
TRAP	Capacidade antioxidante total

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Local de acometimento da RCUI	17
Figura 2 -	Local de acometimento da DC	18
Figura 3 -	Diagnóstico da RCUI.....	20
Figura 4 -	Reações dos probióticos sobre a microbiota intestinal	25
Figura 5 -	Principais mecanismos de atuação dos probióticos.....	29
Figura 6 -	Estrutura dos ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6	32
Figura 7 -	Biossíntese de ácidos graxos n-3	33
Figura 8 -	Efeitos biológicos dos ácidos graxos n-6 e n-3	35
Figura 9 -	Teste de difusão para avaliar atividade antagônica de microrganismos.....	38
Figura 10 -	Divisão das etapas ocorridas no período experimental.....	39
Figura 11 -	Marcação realizada nos animais.....	40
Figura 12 -	Esquema da pesquisa experimental	41
Figura 13 -	Indução da colite por meio de instilação intracolônica	42
Figura 14 -	Animal na posição de Trendelenburg.....	42
Figura 15 -	Esquema de produção do leite fermentado com <i>L. plantarum</i> (LP-115)	45
Figura 16 -	Atividade antagônica de <i>L. plantarum</i> , <i>S. enteritidis</i> e <i>E. coli</i> pelo método de difusão.....	53
Figura 17 -	Atividade antagônica de <i>E. coli</i> e <i>L. plantarum</i> pelo método de difusão	54
Figura 18 -	Atividade antagônica de <i>S. enteritidis</i> e <i>L. plantarum</i> pelo método de difusão.....	54
Figura 19 -	Fotografia da lesão colônica no momento da eutanásia	56

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 -	Principais diferenças entre RCUI e Doença de Crohn	18
Tabela 2 -	Microrganismos com propriedades de probióticos	26
Tabela 3 -	Concentração de n-3 em pescados e frutos do mar	34
Tabela 4 -	Alimento fonte, componente-chave, benefícios potenciais à saúde, evidências científicas e referências	35
Tabela 5 –	Critérios para escore macroscópico da lesão colônica	51
Tabela 6 -	Resultado da análise estatística dos parâmetros do modelo experimental e do escore macroscópico da lesão colônica	55
Tabela 7 -	Resultado da análise estatística dos parâmetros inflamatórios.....	57
Tabela 8 -	Resultado da análise estatística dos parâmetros de estresse oxidativo	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1.	Doença Inflamatória Intestinal (DII).....	16
3.2	Retocolite Ulcerativa Inespecífica (RCUI)	19
3.2.1	Tratamento medicamentoso na RCUI	21
3.2.2	Terapia nutricional na RCUI	23
3.3	Probióticos	24
3.3.1	Aplicação dos probióticos	27
3.3.2	Mecanismo de ação dos probióticos	28
3.3.3	Terapia nutricional na RCUI com probióticos	30
3.4	Ácidos Graxos n-3.....	31
3.4.1	Biossíntese.....	33
3.4.2	Alimentos fonte	34
3.4.3	Terapia nutricional na RCUI com ácidos graxos n-3	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Atividade Antagônica de <i>Lactobacillus Plantarum</i> versus <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella enteritidis</i>	37
4.2	Modelo Experimental e Indução da Colite nos Animais	39
4.3	Intervenções Terapêuticas	43
4.4	Preparo do leite fermentado com <i>Lactobacillus plantarum</i> (Lp- 115).....	44
4.4.1	Análises microbiológicas do leite fermentado	45
4.5	Exames Hematológicos e Bioquímicos	46
4.5.1	Medida do TRAP	47
4.5.2	Medida de QM.....	48
4.5.3	Medida de AOPP	49
4.5.4	Preparação das amostras de tecido para MPO	50

4.5.5	Medida de fosfatase alcalina, gama-GT, albumina e proteínas totais	50
4.5.6	Medida de proteínas totais do tecido	51
4.6	Critério para Avaliação e Escore Macroscópico da Lesão Colônica	51
4.7	Análises Estatísticas	52
5	RESULTADOS	53
5.1	Atividade Antagônica de <i>Lactobacillus plantarum</i> versus <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella enteritidis</i>	53
5.2	Avaliação do Modelo Experimental e da Indução da Colite nos Animais	55
5.3	Análises Microbiológicas do Leite Fermentado com <i>L. plantarum</i> (Lp-115)	56
5.4	Aspectos Inflamatórios após Intervenções Terapêuticas na Colite Experimental	56
5.5	Estresse Oxidativo após Intervenções Terapêuticas na Colite Experimental	57
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	67
	REFERENCIAS	68
	ANEXOS	77
	ANEXO I – CARTA DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA	78

1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) correspondem a qualquer processo inflamatório (crônico ou agudo) que envolve o trato gastrointestinal e dentre as principais formas tem-se: Doença de Crohn (DC) e RCUI. Estas, apesar de serem doenças distintas, compartilham de aspectos clínicos semelhantes, como diarreia, dor abdominal e sangramento retal e se caracterizam por períodos de remissão e exacerbação (DE SOUZA; BELASCO; AGUILAR-NASCIMENTO, 2008). Além disso, compartilham aspectos epidemiológicos, pois podem ocorrer em todas as pessoas, independente do sexo, raça e classe social e atingem, em sua maioria, pessoas jovens (DE SOUZA; BELASCO; AGUILAR-NASCIMENTO, 2008).

A distinção entre a DC e a RCUI é realizada por meio de colonoscopia, no qual a principal diferença é que a primeira caracteriza-se por uma inflamação crônica de uma ou mais partes do tubo digestivo, podendo acometer desde a boca ao ânus e a RCUI é uma inflamação da mucosa do cólon (FLORA; DICHI, 2006).

O tratamento da doença vai depender da gravidade, da extensão e do local envolvido, porém a forma convencional compreende o uso do ácido 5-aminosalicílico e de corticosteróides (CATAPANI, 2009).

O tratamento e a prevenção de doenças inflamatórias intestinais com nutrientes imunomoduladores é uma modalidade terapêutica com perspectivas promissoras, pois estes nutrientes modulam a resposta imunológica da inflamação, mantêm a integridade da mucosa intestinal e melhoram o estado clínico e nutricional dos pacientes. Um esquema terapêutico adequado deve incluir nutrientes com objetivo de fornecer calorias, reduzir a indução do estímulo antigênico, regular a resposta inflamatória e imunológica e estimular o trofismo da mucosa, como é o caso dos probióticos e dos ácidos graxos poli-insaturados n-3 derivados de óleos de peixe (BURGOS et al, 2008; DICHI e BURINI, 1996).

Os probióticos são alimentos suplementados com microrganismos vivos (normalmente e mais comercializados, do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) que, quando consumidos regularmente em quantidades suficientes, podem produzir efeitos benéficos à saúde e efeitos nutricionais habituais, beneficiando o hospedeiro por meio da melhoria no equilíbrio da microbiota intestinal (DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010).

A seleção do microrganismo para ser definido como probióticos deve atender a alguns requisitos, como estar presente normalmente no trato gastrointestinal, ser administrado em dose suficiente para que atinja o intestino grosso, levando em consideração a ação ácida do suco gástrico, ou básica da secreção biliar. Ao chegar ao órgão alvo deve ainda ser capaz de aderir às células do epitélio intestinal e colonizá-las, atuando para melhorar a saúde do hospedeiro (BURGOS et al, 2008).

Estudos relatam que o *Lactobacillus plantarum* é uma bactéria que reside no trato gastrointestinal de humanos e quando administrados em doses suficientes pode ser capaz de resistir às condições adversas impostas pelo processo digestivo, sendo capaz de colonizar o intestino e beneficiar a saúde do hospedeiro (FIGUEROA-GONZÁLEZ et al, 2011).

Além de cepas probióticas observa-se um grande número de doenças que podem ser prevenidas com o consumo regular de óleos vegetais, peixes e óleos de peixes, cujos componentes funcionais incluem os ácidos graxos poli-insaturados (FLORA; DICHI, 2006). Estes, por sua vez, são ácidos graxos com duas ou mais duplas ligações, que podem ser do tipo n-3 e n-6. A utilização de ácidos graxos n-3, presentes em peixes de águas profundas, possui efeitos anti-inflamatórios importantes que podem auxiliar no combate à inflamação da mucosa, que ocorre também na RCU (ANDRADE; CARMO, 2006).

A utilização de ácidos graxos n-3 apresenta influência no metabolismo dos triacilglicéris e interferem na agregação plaquetária reduzindo o risco de doenças cardiovasculares (SUÁREZ-MAHECHA et al, 2002) e também na inflamação causada na RCU (NIETO et al, 1998).

Assim, este estudo visa avaliar a influência que a utilização prévia de *Lactobacillus plantarum* (Lp-115) e ácidos graxos n-3 derivados de óleo de peixe podem exercer na RCU induzida com TNBS em ratos Wistar machos em uso de sulfassalazina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar o uso de ácidos graxos poli-insaturados n-3 derivados de óleo de peixe e probiótico *Lactobacillus plantarum* (Lp-115), isolados ou em combinação sobre a colite induzida com TNBS em ratos Wistar machos tratados com sulfassalazina.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a ação dos nutrientes imunomoduladores ácidos graxos n-3 derivados de óleo de peixe, *Lactobacillus plantarum* (Lp-115) e a combinação destes sobre a doença avaliada sobre a lipoperoxidação, produtos avançados de oxidação proteica e capacidade antioxidante total do plasma;
- Verificar a ação dos nutrientes imunomoduladores isolados ou combinados sobre parâmetros inflamatórios avaliados pela mieloperoxidase, fosfatase alcalina e Gama-glutamil transferase.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Doença Inflamatória Intestinal (DII)

A doença inflamatória intestinal corresponde a qualquer processo inflamatório que envolve o trato gastrointestinal, podendo ser agudo ou crônico. Pode ser classificada como DII com causa conhecida, como as infecções, parasitoses, enterocolite, isquemia e DII com causa não totalmente esclarecida, que correspondem de 80 a 90% dos casos diagnosticados como a RCUI e a DC. O restante é representado principalmente pelas colites linfocítica e colágena e pela bolsite ou pouchitis, uma inflamação da bolsa ileal pós colectomia realizada em pacientes com RCUI refratários ao tratamento clínico (DAMIÃO; SIPAHI, 2004).

Estas doenças acometem pessoas de diferentes classes socioeconômicas, idade, sexo e nacionalidades, atingindo cerca de 1,4 milhões de pessoas só nos Estados Unidos, podendo ser considerada como uma doença de alta frequência (LOFTUS, 2004). Porém, quando comparado com os Estados Unidos, Reino Unido e Austrália, a América Latina é considerada uma região de baixa prevalência (BRASIL, 2002).

Portanto, o Brasil ainda é considerado uma área com baixa prevalência de DII, apesar do aumento significativo de sua incidência. Uma das suposições a serem feitas é que as DII não estejam sendo diagnosticadas, já que há um número muito grande de prontuários médicos que registram altas taxas de diarreias com etiologia bacteriana ou parasitária (SOUZA; BELASCO; AGUILAR-NASCIMENTO, 2008).

Souza, Belasco e Aguilar-Nascimento (2008) realizaram um estudo visando conhecer o perfil epidemiológico de pacientes portadores de DII no estado de Mato Grosso. Estes avaliaram 220 pacientes, destes 54% apresentavam retocolite ulcerativa, 39% DC e 7% colite indeterminada; a maior parte dos pacientes analisados (57%) era do sexo feminino de cor branca (43,2%) e ao comparar com outros estados do Brasil, concluíram que os dados obtidos para o estado do Mato Grosso apresentam características epidemiológicas semelhantes ao restante do país.

Assim, as doenças inflamatórias intestinais podem ocorrer no mundo todo e acabam representando um grande problema de saúde, já que atingem pessoas jovens preferencialmente, além de cursarem com recidivas frequentes, podendo assumir formas clínicas de alta gravidade. A doença inflamatória intestinal refere-se, tradicionalmente à RCUI e a DC (SOUZA; BELASCO; AGUILAR-NASCIMENTO, 2008).

Segundo Fonseca et al (2003), a RCUI pode ser definida como uma doença inflamatória, caracterizada pela presença de ulcerações na mucosa do reto e em parte ou em todo o cólon (Figura 1), apresentando evolução crônica, com períodos de remissão e exacerbação.

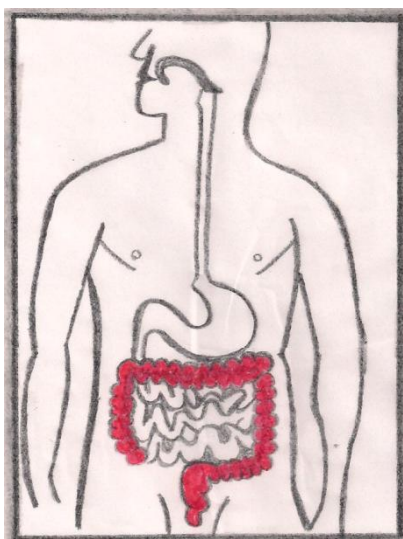


Figura 1 - Local de acometimento da RCUI

Em contrapartida, a DC, que apresenta este nome em homenagem ao médico que a descreveu em meados de 1932, caracteriza-se por inflamação crônica de uma ou mais partes do tubo digestivo e pode acometer desde a boca até o reto e ânus, passando pelo esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso (VERONESI, 2003). O acometimento pode ser analisado na Figura 2.

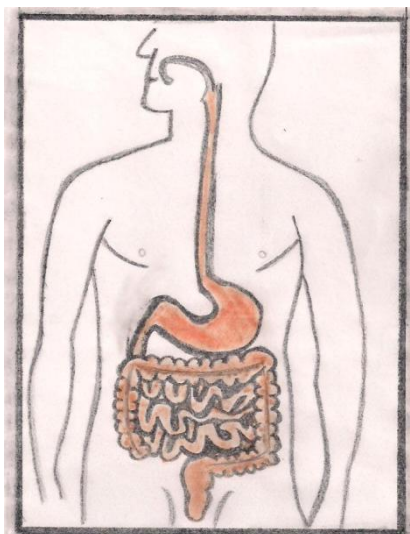


Figura 2 - Local de acometimento da DC

A distinção entre as duas doenças é realizada por meio de exames de colonoscopia (VERONESI, 2003) e apresentam diferenças macros e microscópicas, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Principais diferenças entre RCUI e Doença de Crohn

Achados macroscópicos	RCUI	DC
Predomínio de envolvimento: cólon distal	Comum	Incomum
cólon proximal	Incomum	Comum
Reto poupado	Raro	Comum
Lesões segmentares	Não	Sim
Úlceras aftosas	Não	Sim
Úlceras profundas	Incomuns	Comuns
Aspecto pavimentoso	Raro	Comum
Pseudopólipos	Comum	Incomum
Mucosa atrófica	Comum	Incomum
Achados microscópicos	RCUI	DC
Inflamação	Difusa, mucosa	Segmental, focal
Abscessos de criptas	Frequentes	Ocasionais
Distorção de criptas	Leves a intensas	Leve
Atrofia de mucosas	Comum	Rara
Depleção de células calciformes	Pronunciada	Discreta
Células gigantes de Langhans	Ausente	Presente (30-60%)
Úlcerações com pouca inflamação	Em casos fulminantes	Típicas
Metaplasia pilórica no íleo	Ausente	Típica

Fonte: Adaptado de DAMIÃO; SIPAHI (2004).

Assim, enquanto a RCUI é limitada ao acometimento da mucosa do cólon, a DC se caracteriza por uma inflamação com maior frequência na região terminal do íleo. Além disso, também diferem de acordo com os sintomas apresentados: a diarreia sanguinolenta é a manifestação mais dominante na RCUI, enquanto na DC os sintomas principais são diarreia, dor abdominal e perda de peso (FLORA; DICH, 2006).

3.2 Retocolite Ulcerativa Inespecífica (RCUI)

A RCUI não apresenta etiologia conhecida, porém a etiopatogenia multifatorial compreende os fatores genéticos, ambientais, microflora intestinal e resposta imune (FIOCCHI, 2005). Destes, os dois últimos fatores são as categorias selecionadas para terapêutica e tratamentos, já que os fatores genéticos e ambientais são mal definidos (KANAUCHI et al, 2005).

O diagnóstico da doença é estabelecido pela avaliação da história clínica, exames de fezes, exames endoscópicos e achados histopatológicos (BRASIL, 2002). Deve ser realizado o mais rapidamente possível por se tratar de doença crônica, sem tratamento clínico de caráter curativo e caso ocorra demora terapêutica, pode levar a sequelas graves, como por exemplo, baixa estatura em crianças, desnutrição, transtornos psicossociais e câncer intestinal (FIGUEIRÊDO et al, 2004). Conforme a Figura 3, o diagnóstico pode ser obtido através da análise dos sinais e sintomas previamente a confirmação da doença.

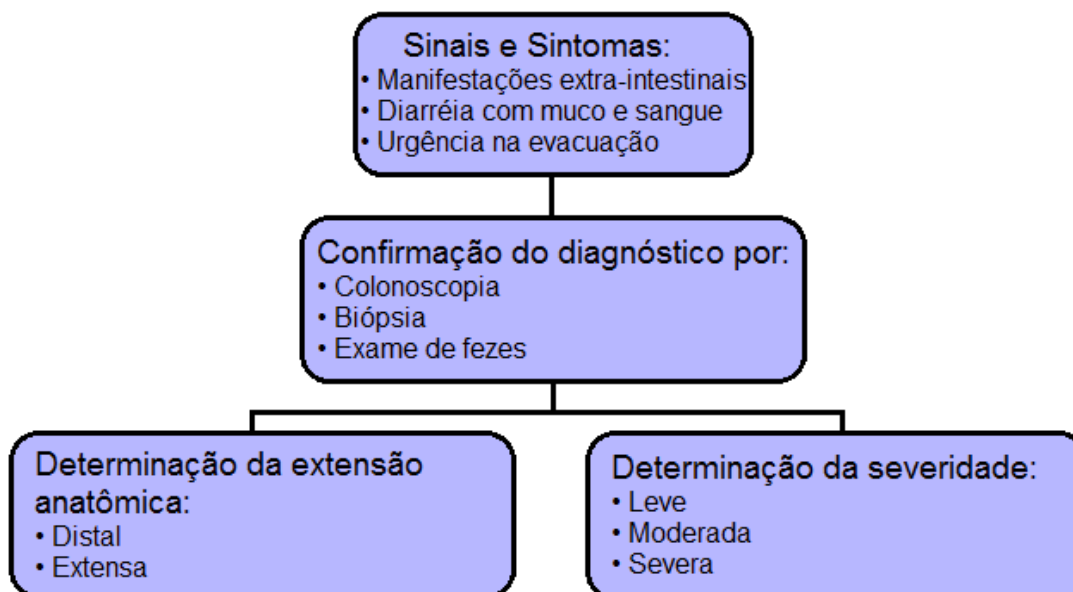


Figura 3 - Diagnóstico da RCUI

Fonte: Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn, 2014.

Figueirêdo et al (2004) realizaram uma análise casuística em 29 crianças e adolescentes com diagnóstico de colite ulcerativa inespecífica e nestes, a perda de peso estava presente como sintoma em 55,2% dos pacientes, ressaltando a importância de rápido diagnóstico e boa avaliação antropométrica.

A forma leve é a mais frequente (50%), a moderada atinge 25% e a grave ocorre em 15% dos casos. Os últimos 10% são indeterminados (FONSECA et al, 2003). Para a determinação da severidade da RCUI em leve, moderada e severa analisam-se os critérios apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Critérios de severidade da RCUI

Clínica	Leve	Moderada	Severa
Frequência de evacuação em 24 horas	< 4	4 – 6	> 6
Pulso (batimentos/minuto)	< 90	90 – 100	> 100
Hematócrito (%)	Normal	30 – 40	< 30
Perda de peso (%)	Normal	1 – 10	> 10
Temperatura (°C)	Normal	37,2 – 38	> 38
VHS (mm/hora)	Normal	20 – 30	> 30
Albumina (g%)	Normal	3 – 3,5	< 3

Fonte: FONSECA et al (2003).

Além de sintomas intestinais, a maior parte dos pacientes apresenta manifestações extra-intestinais, que chegam a ser mais graves que a própria RCUI e pode levar ao óbito (TEIXEIRA et al, 2001).

Costa e Chaves (2006) realizaram um estudo para investigar as formas de enfrentamento do estresse e a presença de sintomas depressivos em 100 indivíduos portadores de RCUI. Aplicou-se o Inventário de Depressão de Beck e obtiveram como resultado que, no aspecto transtorno de humor, 20% dos pacientes apresentaram sintomas de depressão, dificultando ainda mais o tratamento da patologia. Flora e Dichi (2006) ressaltam que o tratamento deve-se iniciar primeiramente por um diagnóstico preciso, já que, muitas vezes é realizado de maneira errônea.

O tratamento cirúrgico torna-se a única opção para os casos onde já houve o acometimento colônico total e pode ser realizado em três opções: proctocolectomia total com ileostomia definitiva, colectomia total com anastomose íleo-retal e retocolectomia total com preservação esfíncteriana, reservatório ileal e anastomose íleo-anal. Ainda assim, o tratamento cirúrgico apresenta uma série de riscos e muitos pacientes mantêm esses sintomas ou apresentam manifestações extra-intestinais após a cirurgia (TEIXEIRA et al, 2001).

3.2.1 Tratamento medicamentoso na RCUI

O tratamento medicamentoso é realizado de maneira a tratar a fase aguda e, posteriormente, manter a remissão da doença; compreende aminossalicilatos orais e por via retal, corticoides e imunossupressores, com o principal objetivo de evitar a sintomatologia (GHOSH; SHAND; FERGUSON, 2000).

Segundo Reis e Pedruzzi (2007), a sulfassalazina é um medicamento utilizado no tratamento farmacológico de doenças inflamatórias intestinais. Trata-se de um anti-inflamatório intestinal, da classe dos aminossalicilatos, administrado via oral.

A sulfassalazina mostrou-se eficaz no tratamento da retocolite ulcerativa leve a moderada em ensaio clínico randomizado desde a década de 60. A partir daí,

metanálises estudando esse medicamento no tratamento da retocolite ulcerativa ativa mostrou a sua eficácia (SUTHERLAND; MAY; SHAFFER, 1993).

A sulfassalazina é composta pela sulfa piridina e ácido 5-aminossalicílico (5-ASA, mesalamina) ligados por uma ponte diazo (PEPPERCORN; GOLDMAN, 1973).

Seu mecanismo de ação está relacionado às propriedades imunossupressoras, afinidade com o tecido conjuntivo e/ou com a concentração relativamente elevada encontrada nos fluidos plasmáticos, no fígado e nas paredes intestinais. A sulfassalazina também tem sido descrita como um excelente veículo, já que transporta seus principais metabolitos até o cólon, local de sua ação (BIONDO-SIMÕES et al, 2003).

Apresenta pouca absorção, cerca de 10% da dose ingerida, no trato digestivo alto, e sua clivagem é realizada por bactérias colônicas e após chegar ao cólon direito, são liberados seus dois fragmentos, sendo que a 5-ASA é a parte ativa e anti-inflamatória da molécula e a sulfa piridina é a parte com baixa atividade terapêutica que auxilia no transporte da 5-ASA e impede a sua absorção no intestino delgado, possibilitando a sua chegada à mucosa colônica. O 5-ASA atua na modulação da secreção de citocinas pró-inflamatórias, inibindo a produção de leucotrienos e prostaglandinas e ativando os receptores nucleares PPAR ("*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*"), envolvidos no controle da inflamação, na proliferação celular e na apoptose (CATAPANI, 2009).

Souza-Junior et al (2000) realizaram um estudo no qual se analisou o cólon de ratos com colite experimental induzida e tratados com 5-ASA e verificaram que este promoveu menor escore de gravidade das lesões na mucosa colônica, menores complicações cavitárias e melhora clínica mais precoce.

Segundo a Portaria nº 861 de 12 de novembro de 2002, a sulfassalazina deve ser apresentada em comprimidos de 500 e 800 mg e antes do início do uso do medicamento, deve ser realizado hemograma, testes hepáticos, creatinina e exame qualitativo de urina. Estes exames devem ser repetidos quinzenalmente nos primeiros três meses e mensalmente no segundo e terceiro meses e, após, trimestralmente ou quando clinicamente indicado (BRASIL, 2002).

3.2.2 Terapia nutricional na RCUI

As pesquisas relacionadas às DII e em especial à RCUI apresentam opções terapêuticas que objetivam aumentar a eficácia do bloqueio seletivo de mediadores inflamatórios e também um incremento da imunidade inata (DAMIÃO; SIPAHI, 2004). A terapia nutricional tem se mostrado como um destes recursos terapêuticos auxiliares muito úteis, além disso, pode ser iniciada em todos os pacientes independentemente do estado nutricional, como também naqueles com estado nutricional comprometido, como medida terapêutica nos casos de má evolução clínica e nas diferentes fases de atividade da doença (BURGOS et al, 2008).

A eficácia da terapia nutricional no que diz respeito à diminuição da atividade inflamatória na DC é conhecida há mais de 20 anos. Porém, na RCUI a terapia nutricional com a utilização dos probióticos e ácidos graxos n-3 de óleo de peixe vem se destacando recentemente por meio da diminuição da atividade inflamatória (FLORA; DICHI, 2006).

A desnutrição agrava o prognóstico do paciente, com conseqüente redução da competência imunológica e aumento das infecções (TEIXEIRA NETO; GOMES, 2003).

O tratamento da RCUI com nutrientes imunomoduladores é uma modalidade terapêutica que vem apresentando perspectivas promissoras, já que, estes nutrientes atuam modulando a resposta imunoinflamatória, mantendo a integridade da mucosa intestinal e melhorando o estado clínico e nutricional dos pacientes. Desta forma, um esquema terapêutico adequado deve incluir nutrientes para fornecer calorias, reduzir a indução do estímulo antigênico, regular a resposta inflamatória e imunológica e estimular o trofismo da mucosa (CAMPOS et al, 2002).

As doenças inflamatórias intestinais acometem o trato gastrointestinal e normalmente são associadas à desnutrição proteico-energética. As alterações nutricionais dependem da extensão e da gravidade com que se manifesta a doença, podendo agravar o prognóstico do paciente em tratamento clínico e daqueles submetidos a cirurgias, podendo diminuir ainda mais a resistência imune (BURGOS et al, 2008).

Segundo Flora e Dichi (2006) o tratamento de RCUI, quando associado à utilização de fibras dietéticas solúveis desempenham um papel importante na diminuição da atividade da patologia, além disso, pesquisas com ácidos graxos n-3 e probióticos tem mostrado resultados benéficos e prolongamento do tempo de remissão das DII, respectivamente.

3.3 Probióticos

Os probióticos (“pró-vida”) podem ser definidos como preparações ou produtos que contem microrganismos viáveis, definidos e em quantidades adequadas, que apresentam a capacidade de alterar a microbiota própria das mucosas e, por consequência, produzem efeitos benéficos para a saúde (SCHREZENMEIR; DE VRESE, 2001).

Este fato ocorre, pois o trato gastrointestinal possibilita o desempenho fisiológico das suas funções, a menos que microrganismos prejudiciais e/ou patogênicos dominem. Assim, para se assegurar a manutenção de um equilíbrio apropriado da microbiota tem-se a suplementação da dieta com tal alimento funcional (BIELECKA; BIEDRZYCKA; MAJKOWSKA, 2002). Porém estes, além de apresentarem a capacidade de prevenir certas doenças, também podem ser utilizados como terapêuticos (SAAD, 2006).

Na figura a seguir (Figura 4), notam-se as possíveis reações dos probióticos sobre a saúde.

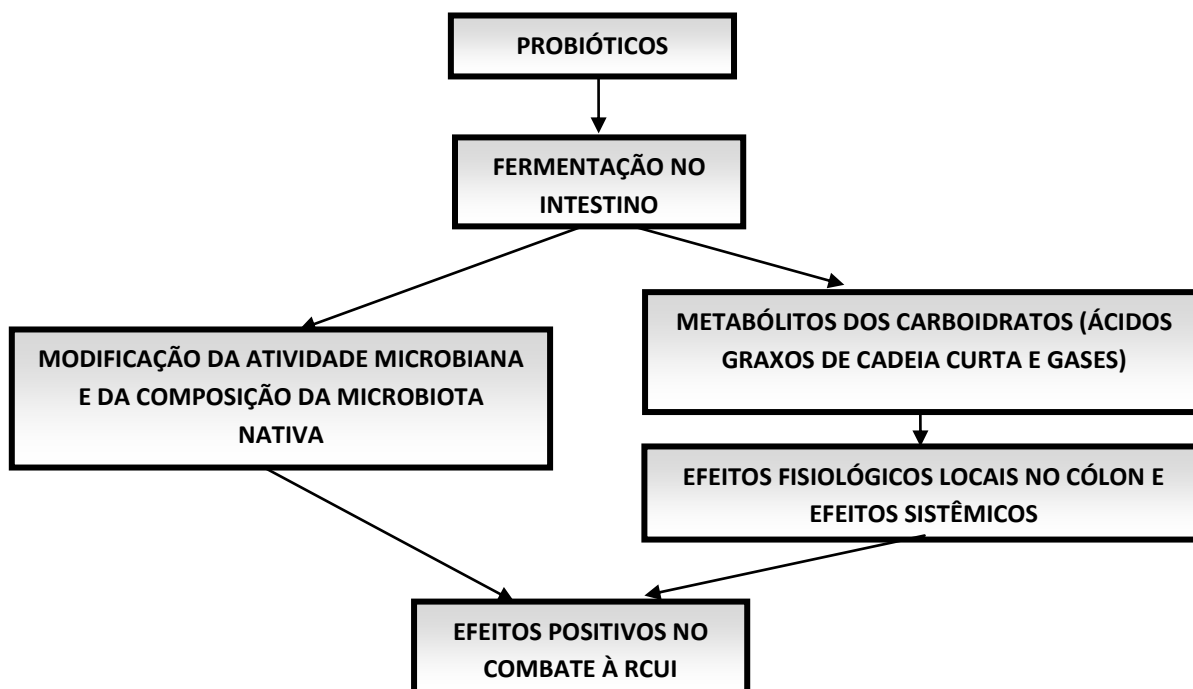


Figura 4 - Reações dos probióticos sobre a microbiota intestinal

Fonte: Adaptado de SAAD (2006).

Logo no início do século XX, o bacteriologista russo Ilya Metchnikoff observou que os camponeses búlgaros tinham uma vida média de 87 anos. Assim, começou a investigar os benefícios que as bactérias lácticas presentes no leite fermentado apresentavam e relacionou o consumo habitual destes alimentos à longevidade destes (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Após a observação do bacteriologista, outros cientistas iniciaram suas pesquisas e cada vez mais foi possível demonstrar a influencia positiva que algumas linhagens das bactérias lácticas exercem, surgindo então os probióticos (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Os probióticos são bactérias não patógenas que, quando ingeridas, promovem redução da proliferação de bactérias mais agressivas e patogênicas, tornando o ambiente intestinal menos antigênico, diminuem citocinas pró-inflamatórias, incrementam citocinas anti-inflamatórias e normalizam a permeabilidade intestinal (SEKSIK; MARTEAU, 2004).

Além das propriedades mencionadas, os probióticos devem, ainda, ser inócuos, manter-se viáveis por longo tempo devido à estocagem e transporte, tolerar o baixo pH do estômago, resistir à ação da bile, das secreções pancreática e intestinal, além de não transportar genes transmissores de resistência a antibioticos

e anticarcinogênicas (COPPOLA; TURNES, 2004).

Coppola e Turnes (2004) afirmam que vários microrganismos são usados como probióticos, entre eles as bactérias ácido lácticas, bactérias não ácido lácticas e leveduras, como pode ser analisado na tabela a seguir (Tabela 2).

Tabela 2 - Microrganismos com propriedades de probióticos

Lactobacillus	Bifidobacterium	Outras bactérias ácido lácticas	Bactérias não ácido lácticas
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus var. toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli cepa nissle</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. johnssonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Fonte: Adaptado de COPPOLA; TURNES (2004).

O gênero *Lactobacillus* foi isolado e classificado em 1901, por Otto Kandler e Norbert, sendo conhecidas quarenta e quatro espécies sendo que a maioria fermenta glicose, lactose e frutose. Posteriormente, o gênero *Bifidobacterium* foi isolado e classificado em 1924, por Orla-Jensen. São conhecidas vinte e quatro espécies e estas se diferenciam pela capacidade de fermentação de diferentes tipos de açúcar (SILVA; STAMFORD, 2000).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* podem ser definidas morfológicamente como Gram-positivas, não formadoras de esporos, catalase negativa, anaeróbicas ou aerotolerantes, acidodúricas, homofermentativas ou heterofermentativas, possuindo uma complexa necessidade nutricional (carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, sais, ácidos nucleicos e vitaminas) (LEE; SALMINEN, 2009).

Adicionalmente, a espécie *Lactobacillus plantarum* foi à primeira do gênero a ter seu genoma sequenciado (KLEEREBEZEM et al, 2003), embora esta não seja considerada probiótico pela legislação brasileira, é caracterizada como tal

em outros países no qual é utilizada em produtos e apresenta histórico de segurança na utilização (VRIES et al, 2006).

L. plantarum apresenta um considerável número de genes relacionados ao transporte e utilização de carboidratos e para produção de agentes antimicrobianos, este conteúdo de genes e o genoma relativamente grande, indicam uma boa adaptação a diversos ambientes e condições diferentes, incluindo o trato gastrointestinal humano (KLEEREBEZEM et al, 2003).

Estudos recentes têm atribuído a *L. plantarum* habilidades para modular o sistema imune (PAOLILLO et al, 2009), reduzir o risco de doenças cardiovasculares (NARUSZEWICZ et al, 2002), atenuar desordens intestinais (YEN et al, 2006), atividade antimicrobiana contra patógenos (*Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*) (BUJALANCE et al, 2007), entre outros benefícios à saúde como a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que inibem produtos carcinogênicos por meio da redução da atividade enzimática (FIGUEROA-GONZÁLEZ et al, 2011).

Em um estudo realizado por Barreto *et al* (2014) pode-se constatar que a ingestão de um leite fermentado por *L. plantarum* reduziu dois importantes fatores de riscos cardiovasculares, como o teor de glicose no sangue e homocisteína, em mulheres na pós-menopausa e com síndrome metabólica.

3.3.1 Aplicação dos probióticos

As cepas normalmente são comercializadas em formas lácteas, podendo ser em pó ou líquidas, cápsulas ou até misturadas aos suplementos alimentares com intenção de regularização da microbiota intestinal (FULLER, 1992).

Inúmeros laticínios probióticos são disponíveis comercialmente e a variedade desses produtos continua em expansão (STANTON et al, 2003). Saad (2006) realizou um levantamento de pesquisas sobre os probióticos e concluiu que grande parte destas, encontra-se voltadas para produtos como leites fermentados e iogurtes, sendo estes os principais produtos comercializados no mundo, contendo culturas probióticas. Outros produtos comerciais contendo essas culturas incluem

sobremesas à base de leite, leite em pó destinado a recém-nascidos, sorvetes, sorvetes de iogurte e diversos tipos de queijo, produtos na fórmula de cápsulas ou em pó para serem dissolvidos em bebidas frias, alimentos fermentados de origem vegetal e maionese. Além disso, diversos tipos de queijo foram testados como veículos para cepas probióticas de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium*, revelando-se apropriados.

3.3.2 Mecanismo de ação dos probióticos

Vários processos tem sido sugeridos como modo de ação dos probióticos, podendo atuar independentemente ou associados. Um dos processos é a exclusão competitiva, onde o probiótico compete com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes, impedindo sua ação transitoriamente (CROSS; WILSON, 2003). Esta exclusão competitiva sugere a necessidade da administração continuada para manifestar seus efeitos. Além disso, Saad (2006) relata que os probióticos podem também afetar os patógenos através da síntese de bacteriocinas, de ácidos orgânicos voláteis e de peróxido de hidrogênio.

Rolfe (2000) realizou estudos *in vivo* e *in vitro*, utilizando diferentes cepas de *Lactobacillus*, que confirmaram que os probióticos promovem a saúde intestinal alterando o balanço ecológico intestinal mediante a exclusão competitiva de bactérias patogênicas.

Os probióticos são utilizados na prevenção e tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, em distúrbios do metabolismo gastrointestinal como imunomoduladores e na inibição da carcinogênese (SAAD, 2006).

Na figura a seguir (Figura 5), tem-se os principais mecanismos de atuação e benefícios à saúde atribuídos à ingestão de culturas probióticas.

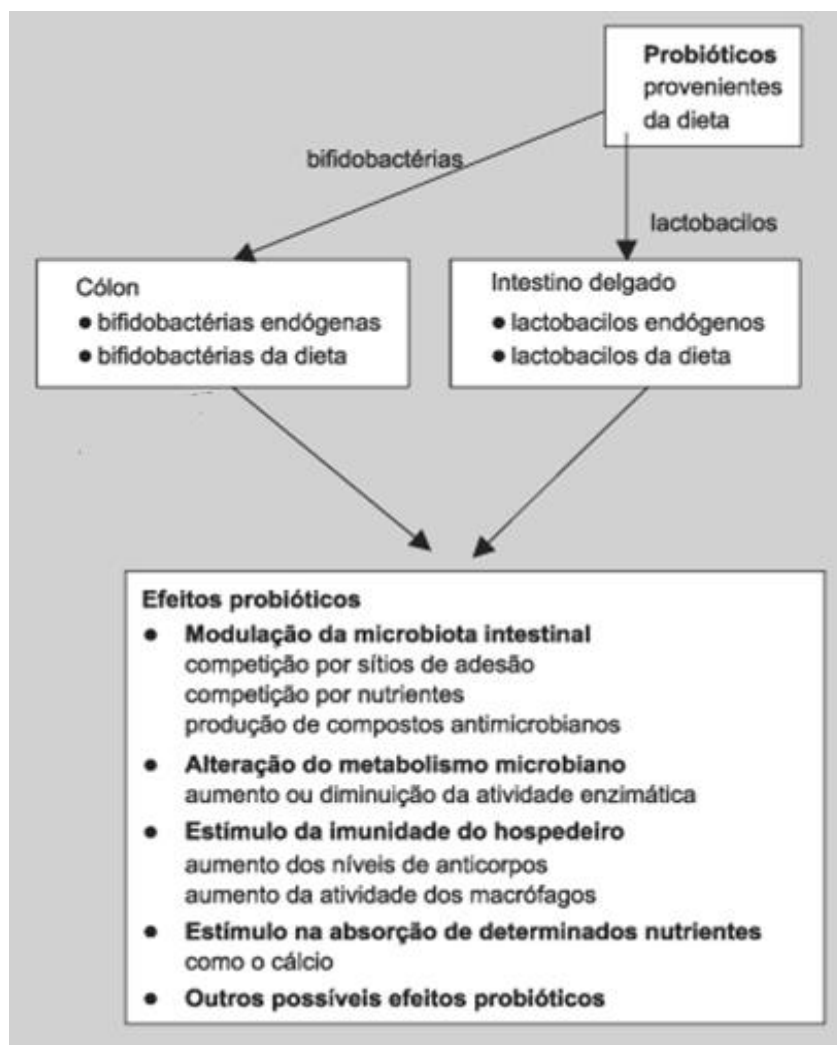


Figura 5 - Principais mecanismos de atuação dos probióticos

Fonte: Adaptado de SAAD (2006).

Além disso, o efeito dos probióticos também é importante no que se refere à resposta imune, já que grande parte das evidências de sistemas *in vitro* e de modelos animais e humanos sugere que os probióticos apresentam capacidade de estimular tanto a resposta imune específica quanto a não específica. Acredita-se que esses efeitos sejam mediados por uma ativação dos macrófagos, pelo aumento nos níveis de citocinas e pelo aumento da atividade das células destruidoras naturais (“natural killers”), sem que ocorra o desencadeamento de uma resposta inflamatória prejudicial (VAN DE WATER, 2003).

A microbiota intestinal humana é importante para a imunorregulação e possíveis diferenças qualitativas na composição desta podem alterar a homeostase imunológica (ISOLAURI, SALMINEN, OUWEHAND, 2004).

A ação de microrganismos durante o processamento de produtos contendo culturas ou no trato digestivo influencia favoravelmente a quantidade, biodisponibilidade e digestibilidade de alguns nutrientes da dieta, pois a fermentação de produtos lácteos por bactérias lácticas pode aumentar a concentração de vitaminas do complexo B (KOPP-HOULIHAN, 2001).

Ainda, as bactérias lácticas caracterizam-se pela liberação de diversas enzimas no lúmen intestinal, e estas exercem efeitos sinérgicos sobre a digestão. Esta liberação enzimática pode aumentar a biodisponibilidade de proteínas e de gorduras, já que favorecem a digestão. Além disso, também aumentam a disponibilidade de ácidos graxos de cadeia curta, principalmente propiônico e butírico (KOPP-HOULIHAN, 2001).

3.3.3 Terapia nutricional na RCUI com probióticos

A terapia nutricional nos casos de DII tem se mostrado como um recurso terapêutico auxiliar muito útil, já que atua diretamente sobre o estado nutricional, podendo mantê-lo e/ou recuperá-lo, com benefício na evolução e tratamento das DII (BURGOS et al, 2008).

A microbiota nativa do trato gastrointestinal é de grande importância, já que é responsável pela regulação imunofisiológica, sendo considerado também uma barreira defensiva da mucosa. A utilização de probióticos, em especial *Lactobacillus*, *Bifidobactérias* e *Saccharomyces*, demonstra ser capaz de reduzir o crescimento bacteriano intestinal (KLARIN; WIMO; FASTBOM; 2005).

Saad (2006) afirma que os probióticos vem sendo amplamente utilizados como alimento funcional, além de serem utilizados como tratamento de várias doenças. No caso de doença inflamatória crônica do intestino, o uso de cepas de *Saccharomyces boulardii* e *Lactobacillus casei* é bastante promissor. Relatam ainda, que as alterações das propriedades da microbiota residente devido ao tratamento com probióticos é capaz de reverter algumas alterações da resposta imune do intestino, observada principalmente na doença inflamatória intestinal.

A regulação imunofisiológica no trato gastrintestinal depende do estabelecimento da microbiota nativa, um componente importante da barreira

defensiva da mucosa. Assim, novos métodos de tratamento baseados no consumo de monoculturas e de culturas múltiplas de microorganismos vivos que atuam como probióticos foram introduzidos (ISOLAURI, 2001).

Isolauri (2001) demonstrou que probióticos apresentam a capacidade de reforçar diferentes linhas de defesa do intestino, como por exemplo através da regulação imune. Estes microorganismos estimulam a resposta imunológica humoral e por consequencia, promovem a função do intestino de ser uma barreira imunológica.

Burgos et al (2008) descreveram que a utilização de probióticos em pacientes com RCUI apresenta resultado no que diz respeito ao prolongamento do tempo de remissão.

3.4 Ácidos Graxos n-3

O papel que os ácidos graxos poli-insaturados exercem sobre o sistema imune vem sendo bastante estudado nos últimos anos com objetivo de elucidar sua modulação das respostas inflamatórias e imunológicas. O interesse atual maior se relaciona aos ácidos graxos poli-insaturados n-3 que podem atuar inibindo a síntese dos mediadores inflamatórios (ANDRADE; CARMO, 2006).

Segundo Din, Newby e Flapan (2004), cada vez mais se observam doenças que podem ser prevenidas com o consumo de certos óleos vegetais e óleos de peixes; dentre seus componentes destacam-se os ácidos graxos poli-insaturados, que podem ser definidos como ácidos graxos com duas ou mais duplas ligações, que podem ser do tipo n-3 e n-6, como se observa na figura a seguir (Figura 6).

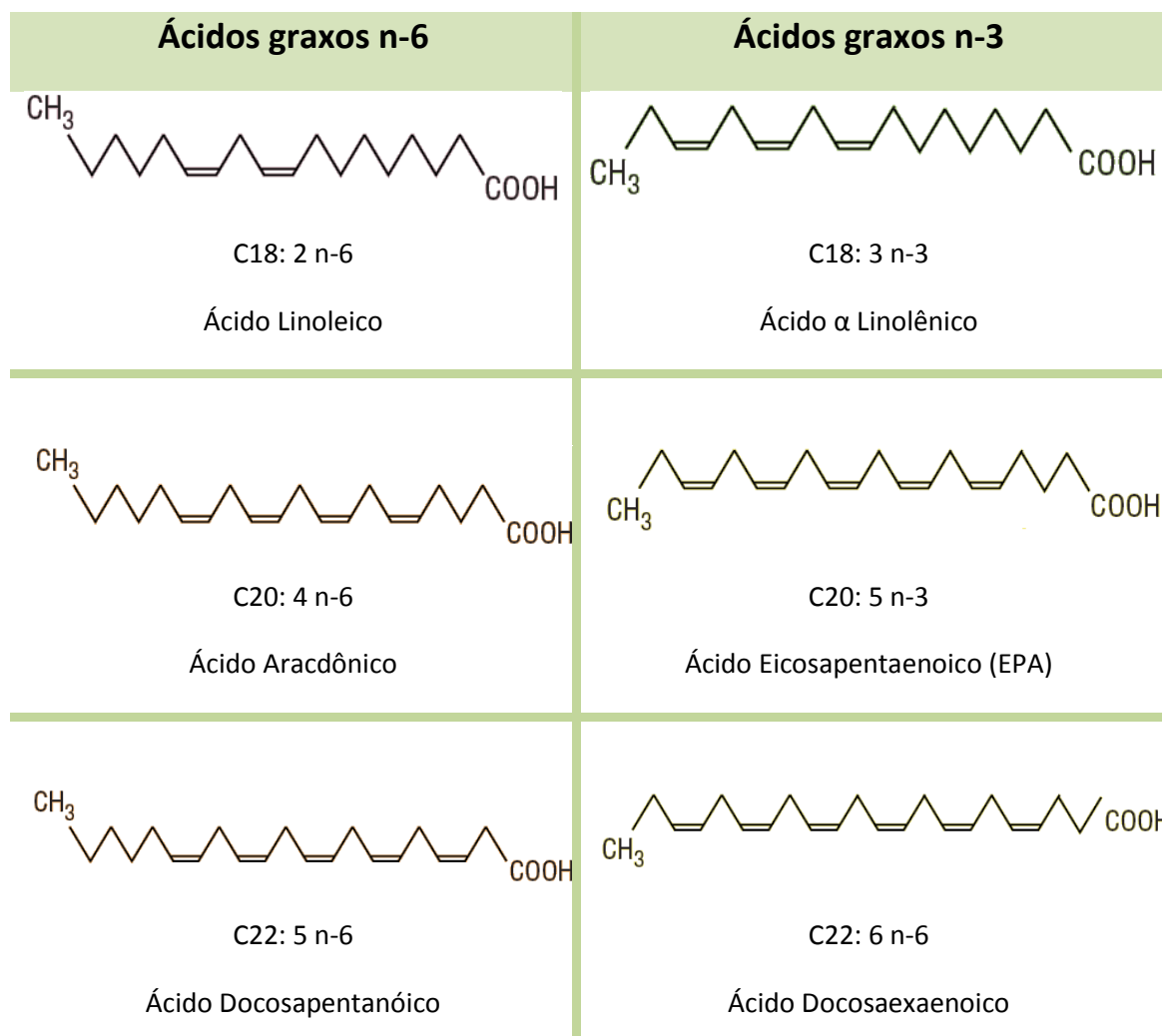


Figura 6 - Estrutura dos ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6

Fonte: Din, Newby, Flapan (2004).

As famílias de ácidos graxos ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6) consistem de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs ou “Polyunsaturated Fatty Acids”) contendo de 18 a 22 carbonos. A designação de ômega tem relação com a posição da primeira dupla ligação, contando a partir do grupo metílico final da molécula de ácido graxo. Os ácidos graxos n-3 apresentam a primeira dupla ligação entre o terceiro e o quarto átomo de carbono (SUÁREZ-MAHECHA et al, 2002).

Os PUFAs n-3 são pertencentes à forma cis, chamados de ácido alfa-linolênico (ALA, 18:3 n-3), ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido decosahecaenóico (DHA), sendo que ALA é encontrado em óleos vegetais como linhaça e canola e o EPA e DHA são encontrados, principalmente nos peixes e nos óleos de peixe (SUÁREZ-MAHECHA et al, 2002).

3.4.1 Biossíntese

Na figura a seguir (Figura 7), observa-se que os n-6 geram eicosanoides das séries 2 e 4 e converte-se em longas cadeias como o ácido γ -linolênico (GLA) e o ácido araquidônico (AA), enquanto os n-3 geram eicosanoides das séries 3 e 5 e é convertido em EPA e em DHA (SUÁREZ-MAHECHA et al, 2002). Como a taxa de conversão é muito baixa em humanos e diminui ainda mais à medida que a quantidade de n-6 aumenta, pois os dois substratos competem pelo mesmo sistema enzimático, torna-se muito importante o consumo de alimentos fontes de n-3 (FAO/WHO, 2001).

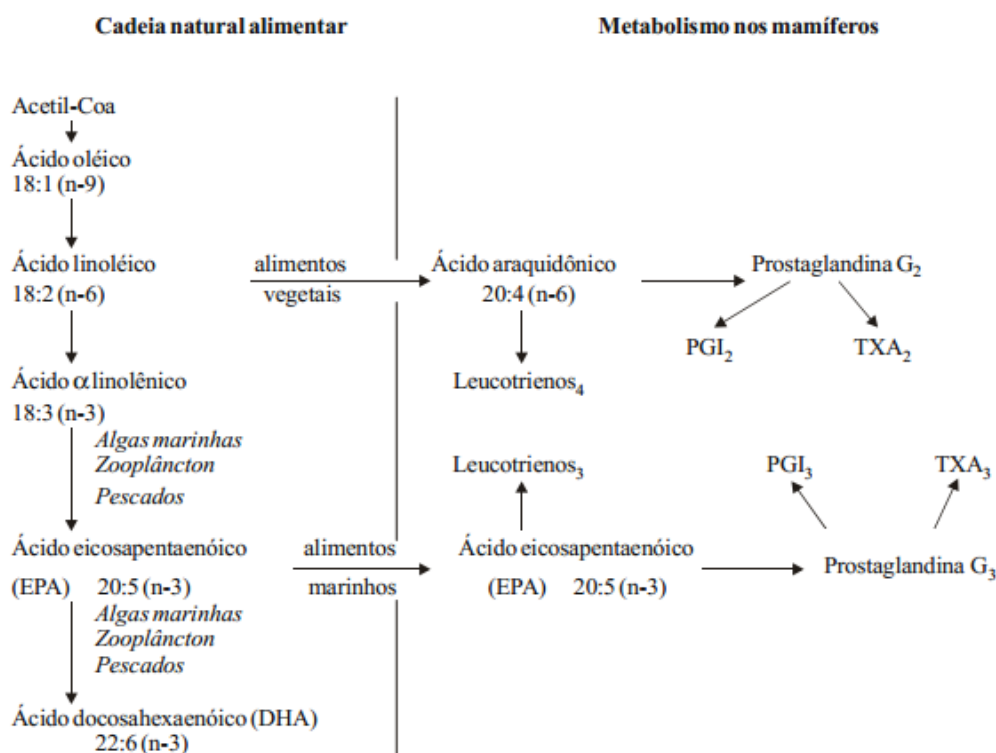


Figura 7 - Biossíntese de ácidos graxos n-3

Fonte: Ward (1995)

Os ácidos graxos poli-insaturados n-3 atuam através da competição entre os ácidos EPA e DHA e o ácido araquidônico na via ciclooxigenase e lipooxigenase. Assim, diminuem a síntese das prostaglandinas da série 2 (PGE₂) e dos leucotrienos da série 4. Os leucotrienos são agentes quimiotáticos neutrofílicos, ou seja, atraem os neutrófilos durante a inflamação. Na via da lipooxigenase, a

formação dos leucotrienos da série 4 é diminuída e favorece-se a produção de séries com menor potencial inflamatório, como o leucotrieno B5 (DICHI; BURINI, 1996; CAMPOS et al, 2002).

3.4.2 Alimentos fonte

Os ácidos graxos n-3 podem ser encontrados, principalmente, nos óleos de peixes de águas frias e profundas como no salmão, arenque, atum e sardinhas, conforme demonstrado na Tabela 3 (VISENTAINER et al, 2000).

Tabela 3 - Concentração de n-3 em pescados e frutos do mar

Alimento	g de n-3/ 100g de alimento
Cavala	1,8 – 5,1
Arenque	1,2 – 3,1
Salmão	1,0 – 1,4
Atum	0,5 – 1,6
Truta	0,5 – 1,6
Camarão	0,2 – 0,5
Lagosta	0,3 – 0,4
Bacalhau	0,2 – 0,3
Linguado	0,2

Fonte: Adaptado de Visentainer et al, 2000.

Os óleos provenientes de peixes marinhos contêm grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, denominados n-3. Estes são oriundos de sua alimentação, já que as plantas contem ácido graxo linolênico. Os principais ácidos graxos da classe n-3 são os EPA e DHA, chegando a representar até 26% dos ácidos graxos presentes em óleos de peixe (SUÁREZ-MAHECHA et al, 2002).

A utilização de ácidos graxos n-3 apresenta influência no metabolismo dos triacilgliceróis e interferem na agregação plaquetária reduzindo o risco de doenças cardiovasculares (SUÁREZ-MAHECHA et al, 2002). Na tabela abaixo, verificam-se os principais benefícios e recomendações para a utilização de ácidos graxos n-3 (Tabela 4).

Tabela 4 - Alimento fonte, componente-chave, benefícios potenciais à saúde, evidências científicas e referências

Alimento encontrado	Pescados
Componentes-chave	Ácidos graxos poli-insaturados n-3
Benefícios à saúde	Reduz risco de doença coronariana
Evidências científicas	Estudos epidemiológicos (peixe), ensaios clínicos (n-3)
Classificação regulatória	Alegação de saúde não submetida à petição
Referencias	ADA Report, 1999; Connor, 1997 Gibson & Makrides, 2000

Adaptado de: ADA Reports, 1999; retirado de Anjo, 2004.

Simopoulos (1999) descreveu o papel protetor dos ácidos graxos n-3 em doenças crônicas como o diabetes, doenças cardiovasculares, renais e inflamatórias e concluiu que o papel protetor destes está relacionado à substituição de PUFAs n-6 na membrana de plaquetas, eritrócitos, neutrófilos, monócitos e células hepáticas. Os PUFAs n-6 e n-3 possuem efeitos biológicos diferentes, pois quando são metabolizados pela ciclooxigenase e lipooxigenase produzem compostos com diferentes atividades como nota-se na figura a seguir (Figura 8).

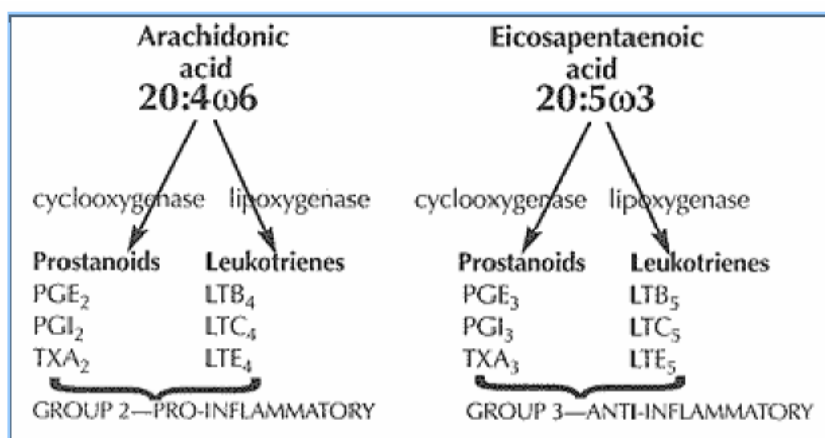


Figura 8 - Efeitos biológicos dos ácidos graxos n-6 e n-3

Fonte: Simopoulos, 1999.

A ingestão de peixe ou óleo de peixe resulta em diminuição da produção de prostaglandinas E2 e seus metabólitos, diminuição das concentrações de tromboxana A2, que é um importante agregante plaquetário e vasoconstritor; diminuição da formação de leucotrienos B4, indutor da resposta inflamatória e agente quimiotático para leucócitos, aumento da concentração de tromboxana A3 que induz fracamente a agregação plaquetária e a vasoconstrição e aumento da

concentração de leucotrienos B₅, que é um fraco agente indutor de inflamação e com baixa ação quimiotática (SIMOPOULOS, 1999).

3.4.3 Terapia nutricional na RCUI com ácidos graxos n-3

Dichi et al (2000) verificaram que o tratamento com sulfassalazina (2g/dia) foi superior à utilização de ácidos graxos n-3 de óleo de peixe (5,4g/dia – 18 cápsulas) em pacientes com RCUI leve ou moderada. Posteriormente, o mesmo grupo (BARBOSA et al, 2003) verificou que ao associar ácidos graxos n-3 (4,5g/dia – 15 cápsulas) à sulfassalazina houve uma diminuição do estresse oxidativo, o que não ocorreu com o uso isolado de sulfassalazina. A suplementação com óleo de peixe foi, ainda, capaz de aumentar a capacidade antioxidante do plasma.

Após 72 horas de suplementação dietética com ácidos graxos n-3 já há alteração da composição da membrana celular e diminuição na síntese de prostaglandinas, tromboxanos da série 2 e leucotrienos da série 4, de forma que estas alterações podem modular a resposta inflamatória e interferir em mecanismos patológicos (CUKIER; WAITZBERG, 1996).

Campos et al (2002), verificaram os resultados da administração parenteral de diferentes emulsões lipídicas em colite aguda induzida em ratos Wistar machos, e concluíram que as emulsões contendo triglicerídeos de cadeia longa com baixa razão n-3/n-6 não modificam as manifestações inflamatórias da colite, enquanto que a associação entre triglicerídeos de cadeia média e de cadeia longa e óleo de peixe determinou grande impacto benéfico.

Nieto et al (1998) realizaram um estudo com 160 ratos, destes, 80 foram tratados com TNBS para indução de colite e o restante, com um volume idêntico de NaCl 0,9% e foram aleatoriamente atribuídos a quatro subgrupos de 20 ratos cada. Após a indução foram ofertadas diferentes dietas, tendo como componente principal em cada uma delas: azeite de oliva, óleo de peixe ou fosfolípidos cerebrais purificados de porco. Os autores concluíram que os ácidos graxos n-3 podem agir benéficamente quando administrados para prevenir a inflamação na RCUI.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa se trata de um experimento realizado com ratos Wistar machos realizado no biotério do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. Porém, anteriormente, foi realizado um experimento *in vitro* para constatar um possível resultado *in vivo*, este foi realizado no Laboratório de pós-graduação em Ciencia de Alimentos da mesma universidade.

4.1 Atividade Antagônica de *Lactobacillus Plantarum* versus *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*

Visando avaliar a atividade antagônica *in vitro* de linhagens de *Lactobacillus Plantarum* (Lp-115) versus *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*, realizou-se a análise microbiológica por meio do método de difusão.

Foram selecionados os dois microrganismos, pois Cartwright (2003) afirma que pacientes com DII, em sua microbiota nativa, apresentam menor quantidade de bactérias benéficas, como *Lactobacillus* e *Bifidobactérias*, além de maior quantidade de bactérias nocivas (*Escherichia coli*) ou potencialmente danosas (Bacteróides). Assim, sugere-se que, na DII, ocorra uma alteração na microbiota bacteriana normal, ao invés do aumento de um patógeno.

Para isso, inicialmente, as colônias foram reativadas, no qual para as colônias de *L. Plantarum* utilizou-se o caldo MRS (Acumedia[®]) e para *E. coli* e *S. enteritidis*, o caldo Mueller-Hinton (Acumedia[®]). Ambos foram preparados conforme as descrições do rótulo, colocados em tubos de ensaio e esterilizados em autoclave esterilizado a 121°C por 15 minutos, após atingir temperatura ambiente e inoculou-se as colônias, armazenou-se em estufa a 37°C por 24 horas e assim, foram realizados três diferentes testes.

Para o primeiro teste, utilizou-se o meio de cultura Agar nutriente (Himedia[®]) preparado conforme a descrição do rótulo do produto, adicionado em placas de Petri descartáveis com adição de 200µL do inóculo *L. plantarum*. Após solidificação do meio de cultura, foram realizados quatro poços perfurados e

adicionados, respectivamente, de 0,02mL do medicamento sulfassalazina diluído em água destilada estéril, 0,02mL do sobrenadante obtido após centrifugação do caldo Mueller-Hinton com *E. coli*, 0,02mL do sobrenadante obtido após centrifugação do caldo Mueller-Hinton com *S. enteritidis* e 0,02mL de água destilada estéril adotada como poço controle.

Para o segundo teste também se utilizou o meio de cultura Agar nutriente (Himedia[®]), porém com adição de 200µL do inóculo *E. coli* e após a solidificação, realizados três poços adicionados, respectivamente, de 0,02mL do medicamento sulfassalazina diluído em água destilada estéril, 0,02mL do sobrenadante obtido após centrifugação do caldo MRS com *L. plantarum* e 0,02mL de água destilada estéril adotada como controle.

O terceiro teste foi realizado da mesma forma do segundo, porém, desta vez, ao invés de inocular *E. coli* no meio de cultura, inoculou-se *S. enteritidis*. Todos os testes foram realizados em triplicata e foram mantidos a 37°C em estufa por 24 horas. A figura a seguir apresenta o teste realizado, antes do crescimento em estufa (Figura 9).

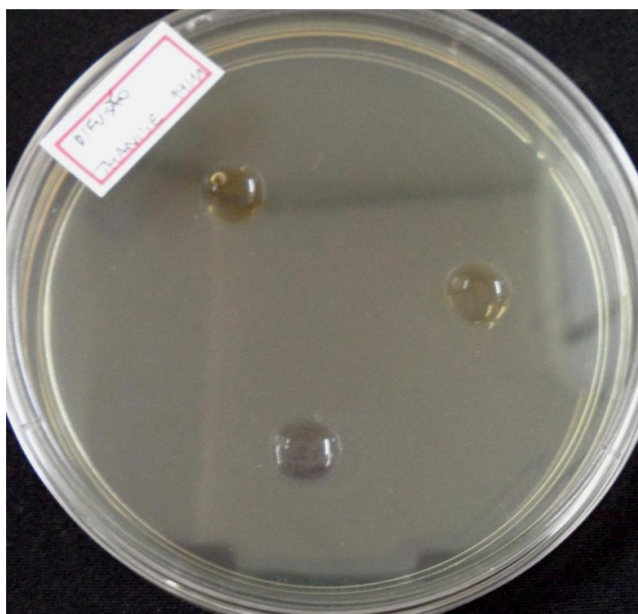


Figura 9 - Teste de difusão para avaliar atividade antagonica de microrganismos

Após o período da estufa, as placas foram fotografadas e avaliou-se o crescimento dos microrganismos, bem como, a formação do elo de inibição entre os microrganismos.

4.2 Modelo Experimental e Indução da Colite nos Animais

Foram adquiridos 50 ratos da linhagem Wistar, machos, recém desmamados, oriundos do Biotério Central do Instituto de Tecnologia do Paraná (TecPar) de Curitiba/PR e assim, ficaram vinte dias com água e ração comercial normoprotéica (marca Nuvilab CRL[®]) *ad libitum* para adaptação ao biotério e ganho de peso, respeitando o ciclo claro-escuro de 12/12horas, com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade de $55\%\pm 10$.

Após este período, os animais, com peso individual entre 180 e 230 gramas, foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (A, B, C, D e E), sendo que cada grupo foi constituído de dez animais, acondicionados em gaiolas plásticas, permanecendo cinco animais por gaiola durante os 21 dias de experimento. No 14º dia do experimento, os animais sofreram a indução da colite, conforme demonstrado na figura abaixo (Figura 10).

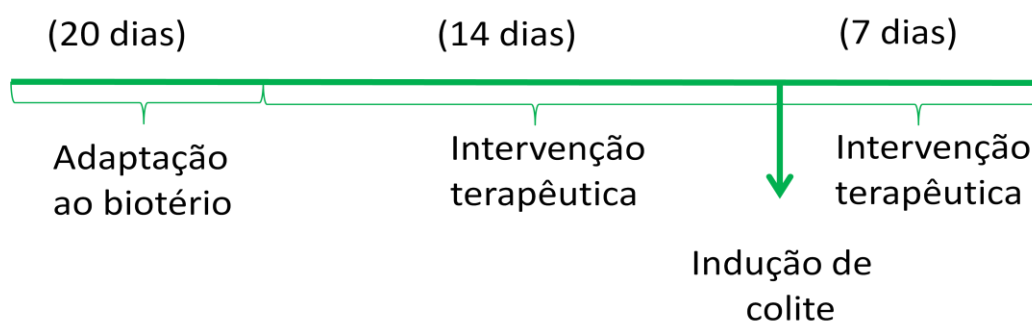


Figura 10 - Divisão das etapas ocorridas no período experimental

Os animais foram marcados para identificação da numeração de um a 50 por meio de perfuração na orelha (Figura 11).

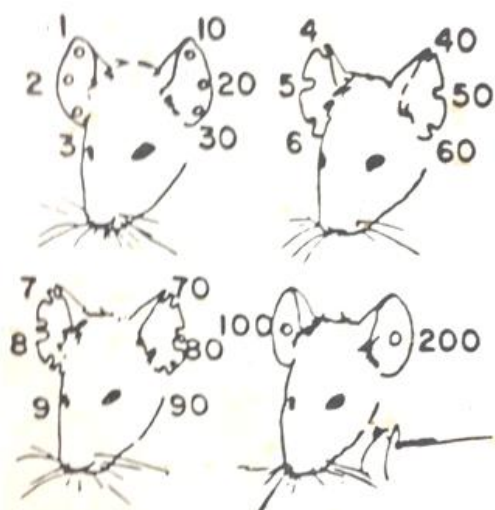


Figura 11 - Marcação realizada nos animais

Assim, os animais foram separados nos cinco grupos, no qual o grupo A foi adotado como padrão de referência, ou seja, grupo controle, sendo os animais mantidos com a mesma ração comercial e água *ad libitum* pelo período de 21 dias. No grupo A, a colite foi induzida, porém não houve intervenção terapêutica e correspondeu ao Grupo controle positivo (CP).

Os grupos B, C, D e E receberam a mesma dieta e água *ad libitum* e sofreram indução da colite, com intervenção terapêutica. O grupo B foi submetido ao tratamento com sulfassalazina, enquanto que, os grupos C, D e E foram submetidos, além da sulfassalazina, administração de leite fermentado com probióticos *L. plantarum* (LP-115), ácidos graxos n-3 derivados do óleo de peixe e a associação destes dois, respectivamente, conforme o esquema experimental (Figura 12).

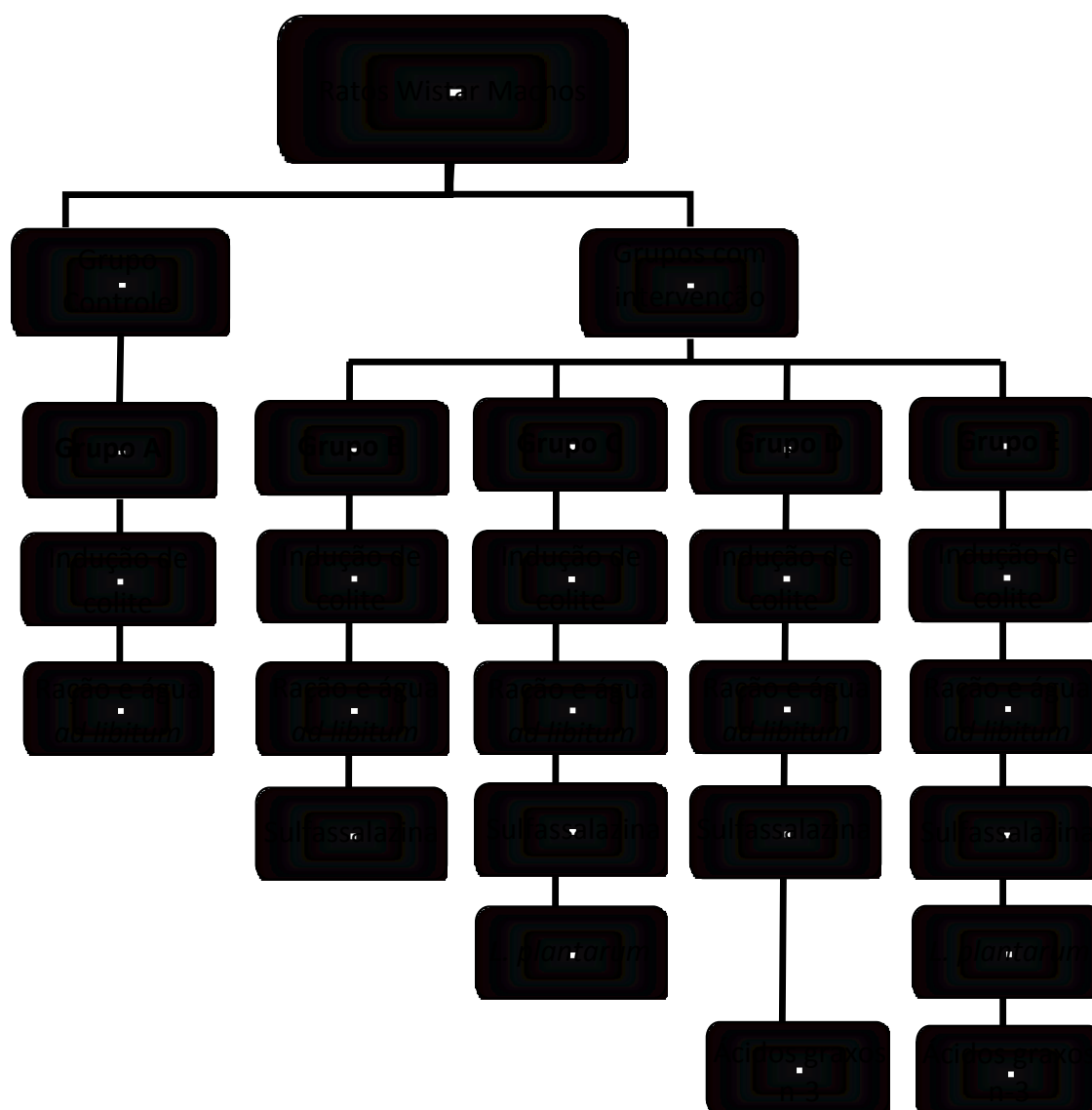


Figura 12- Esquema da pesquisa experimental

Diariamente, respeitando os mesmos horários, antes da intervenção terapêutica, os animais foram pesados para avaliação das modificações de peso corporal durante o período experimental. A pesagem foi realizada em balança digital (Helmac HM 5000) com os ratos anestesiados.

A indução da colite foi realizada utilizando 0,5 mL de TNBS na concentração de 30 mg/mL em 50% de etanol 70% para instilação intracolônica por meio de uma sonda com 2 mm de diâmetro, sendo que esta sonda foi perfurada várias vezes para que o ácido fosse liberado distribuídamente no colón, evitando uma grave lesão focal.

Este foi introduzido intrarretalmente de forma que a ponta ficasse oito centímetros proximais ao ânus, conforme demonstrado na figura abaixo (Figura 13).



Figura 13 - Indução da colite por meio de instilação intracolônica

Após a instilação os ratos foram mantidos por 60 segundos na posição *Trendelenburg* (Figura 14) para facilitar o acesso interno da solução de TNBS.



Figura 14 - Animal na posição de Trendelenburg

O procedimento foi realizado com os ratos anestesiados com 0,1mL de xilazina Anasedan[®] (2% de xilazina) e 0,1mL de ketamina Dopalen[®] (10% de ketamina) administrado intramuscularmente (MORRIS et al,1989; ELSON et al,1995, NIETO et al,1998; PERAN et al, 2007).

No 21^o dia, após o início do tratamento com *L. plantarum* (Lp-115), ácidos graxos n-3 de óleo de peixe e sulfassalazina, os ratos foram anestesiados para obtenção das amostras de sangue e de tecido. Os parâmetros de análise foram realizados igualmente nos cinco grupos e todos os animais foram sacrificados devido à punção cardíaca realizada (exosanguínea). Este procedimento foi realizado após a administração intramuscular de ketamina e xilazina (0,15mL de cada,

correspondente a 10mg/kg), conforme a Resolução nº 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária de 20 de junho de 2002 (BRASIL, 2002).

4.3 Intervenções Terapêuticas

Para as intervenções terapêuticas, utilizou-se uma seringa com agulha para gavagem com comprimento de sete centímetros visando à administração das doses exatas para todos os animais. Portanto, diariamente, respeitando-se o mesmo horário, os animais foram mantidos em caixas plásticas fechadas para anestesia via inalatória com éter sulfúrico (NIETO et al, 1998; PERAN et al, 2007).

Com exceção do grupo controle, todos os animais receberam, uma vez ao dia, durante todo o período da experimentação, a administração do medicamento usual para o tratamento de colite, a sulfasalazina, este foi adquirido da Sigma[®], na forma em pó visando facilitar seu manuseio, assim, em cada animal administrou-se a dose de 100mg/kg (BYRAV et al, 2011), adotando-se a média de 25mg/animal, sendo este diluído em solução salina estéril (0,9%) para administração por gavagem.

Os animais pertencentes aos grupos de D e E receberam uma vez ao dia, do 1º ao 21º dia do experimento, a administração de 1g/kg de peso corporal de ácidos graxos n-3 derivados de óleo de peixe (NIETO et al, 1998), sendo em média 250mg. O óleo de peixe foi adquirido no comercio varejista local da marca Sundown naturals[®] e foi respeitado o prazo de validade e os critérios de armazenamento do produto orientados pelo fabricante.

Os animais pertencentes aos grupos C e E receberam, da mesma forma, uma vez ao dia, durante os 21 dias do experimento, a administração das culturas probióticas de *Lactobacillus plantarum* (Lp-115), preparadas para uso direto (DVS-Direct Vat Set).

4.4 Preparo do leite fermentado com *Lactobacillus plantarum* (Lp-115)

O preparo do leite fermentado foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, sob todos os critérios de higiene para a produção, embalagem e transporte até o Biotério do Hospital Universitário.

Os ingredientes utilizados para a produção foram: Leite em pó desnatado Molico Nestlé®, açúcar refinado obtido no comércio varejista local e cultura liofilizada de *L.plantarum* (Lp 115), fornecido pela empresa Danisco®.

Inicialmente, em um tubo falcon adicionou-se leite em pó desnatado (10% m/v), açúcar refinado (8% m/v) e 25 mL de água destilada, misturou-se e o conteúdo foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após atingir a temperatura próxima da ambiente foi inoculada a cultura liofilizada de *L.plantarum* (Lp 115) para ativação. O frasco foi levado à estufa a 37°C durante oito horas.

Após a ativação do inócuo, preparou-se o leite fermentado utilizando frascos de vidro de 500 mL com tampa rosqueável resistentes a esterilização, no qual, 250 mL de leite em pó desnatado reconstituído (10% m/v) com adição de açúcar refinado (8% m/v) foram esterilizados (121°C/15min.) em autoclave e após atingir temperatura ambiente, adicionado do inócuo ativado na concentração de 10% (v/v). O conteúdo foi homogeneizado e foi levado à estufa a 37°C para fermentação durante 18 horas. O esquema de produção do leite fermentado segue o esquema apresentado a seguir (Figura 15).

O processo adotado para a produção do leite fermentado seguiu o mesmo processo que o grupo de pesquisadores do departamento já trabalha (COSTA *et al*, 2011; BARRETO *et al*, 2014).

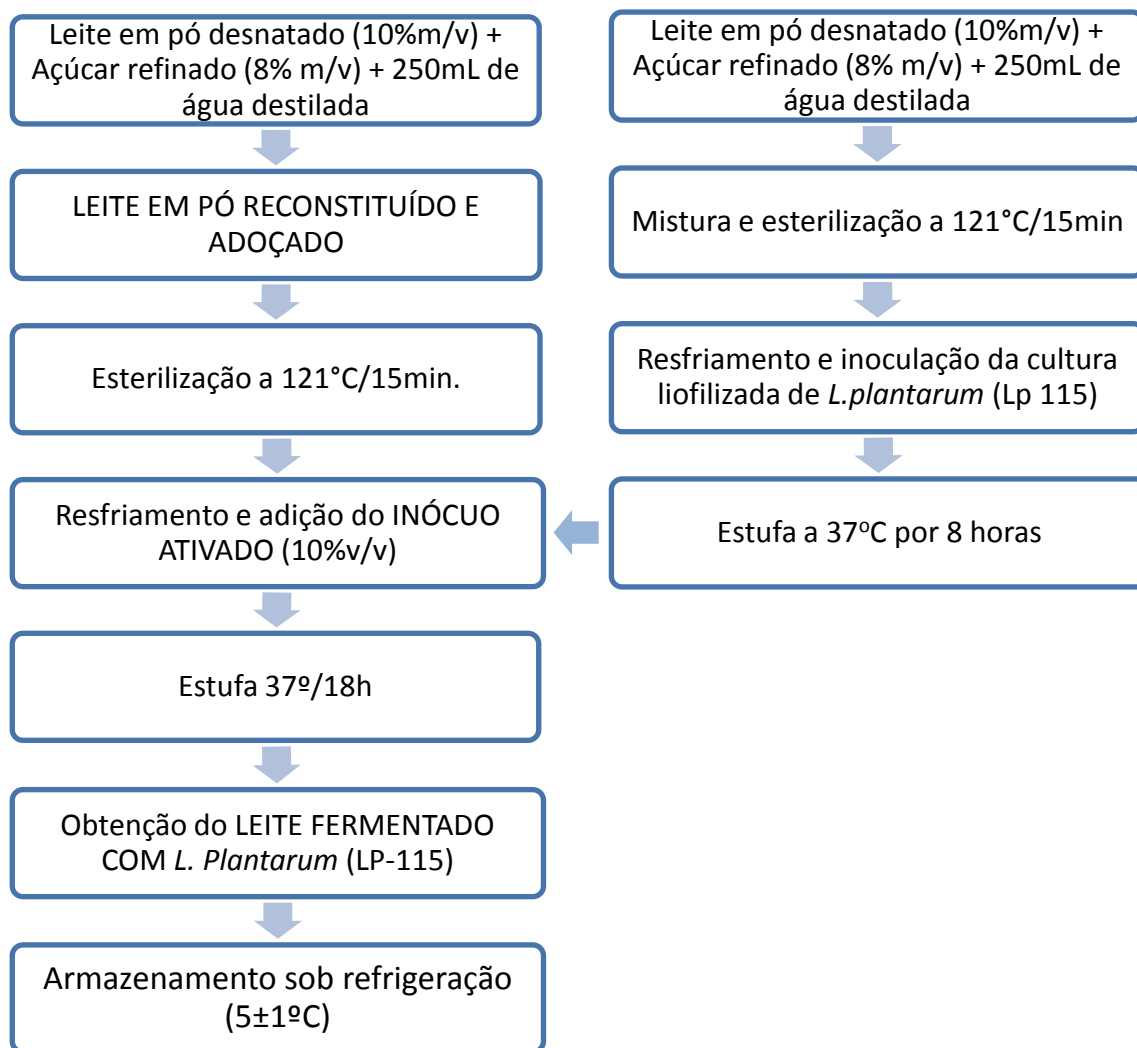


Figura 15 - Esquema de produção do leite fermentado com *L. plantarum* (LP-115)

Ao final do período verificou-se o pH da bebida, objetivando-se obter valor médio de 4,3, sendo que, para esta avaliação utilizou-se um potenciômetro digital devidamente calibrado com pH 4,0 e 7,0. E assim, o leite fermentado foi acondicionado em refrigeração ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) para ser administrado nos animais por quatro dias.

4.4.1 Análises microbiológicas do leite fermentado

Para realização das análises microbiológicas do leite fermentado, seguiu-se o preconizado pela legislação brasileira vigente. Assim, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância

Sanitária (ANVISA), que estabelece os parâmetros microbiológicos sanitários a serem avaliados em alimentos destinados a consumo humano, relata a necessidade de avaliar a contagem de coliformes a 45°C em leites fermentados.

A ANVISA preconiza, ainda, que o leite fermentado, para ser considerado como probiótico, deve apresentar uma contagem mínima de bactérias viáveis na faixa de 10^8 a 10^9 UFC/g no produto final. (BRASIL, 2008).

Já, a Instrução Normativa nº 16 de 23 de agosto de 2005, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece padrões de identidade e qualidade de bebida láctea destinada ao consumo humano, afirma que a bebida láctea fermentada deve conter uma contagem total de bactérias lácticas viáveis de 10^6 UFC/g no produto final durante todo o prazo de validade. Além dos padrões de higiene e contagem de coliformes totais e a 45°C.

Para a realização das análises, a contagem de bactérias lácticas viáveis foi realizada por meio de diluições seriadas em água peptonada 0,1% (m/v) previamente esterilizada (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) e plaqueamento por pour plate em Agar MRS (de Man Rogosa e Sharpe, Difco, Diadema, BR) preparado conforme a descrição do rótulo do produto. A contagem de coliformes totais e a 45°C se deu em meio caldo verde brilhante (Himidia, Mumbai).

4.5 Exames Hematológicos e Bioquímicos

Além do registro diário de peso corporal dos animais, foram realizadas as análises laboratoriais de acordo com cada material biológico. No soro, realizou-se a análise de albumina, mieloperoxidase (MPO), fosfatase alcalina, gama-GT. No plasma, capacidade antioxidante total (TRAP), quimiluminescência induzida por t-Butil hidroperóxido (QM), produtos avançados da oxidação proteica (AOPP). E no tecido, realizou-se a avaliação macroscópica, MPO, fosfatase alcalina e Gama-GT.

No 21º dia após o início do tratamento foi colhido por meio de punção cardíaca na válvula atrial esquerda, 2,5mL de sangue em ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e 3mL de sangue sem anticoagulante. Em seguida, todas as amostras foram centrifugadas a 2.500rpm durante oito minutos.

Após o sacrifício, a parte distal do cólon foi removida e submetida à lavagem superficial com tampão fosfato salino (PBS) 200mM pH=7,4 e com a ajuda de um paquímetro, mediu-se aproximadamente, oito centímetros, foram fotografadas e em seguida raspou-se o cólon com lâmina de vidro. Assim, adicionou-se 6mL de PBS, homogeneizou-se e foram armazenados em três tubos de crio congelamento, para cada animal, e congeladas a -70°C.

4.5.1 Medida do TRAP

O TRAP foi avaliada por quimiluminescência (QL) em uma adaptação do método da técnica descrita por Repetto et al (1996) utilizando o sobrenadante obtido após centrifugação do homogenato (11.000 Rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada) visando à detecção de antioxidantes hidro e lipossolúveis presentes no plasma.

Ao meio de reação (1,8 mL de tampão glicina 0,1M, pH 8,6) foram acrescentados 100 µL de luminol em solução aquosa 200 µM, 5 µL de soro diluído 50% em tampão glicina e 100 µL de solução aquosa de 2,2' azo-bis (2-amidinopropano) 200 mM.

Assim, o 2,2' azo-bis é responsável pela geração de radicais peroxil rapidamente, via interação com radicais centrados em carbono e oxigênio molecular, causando a oxidação de lipídeos e proteínas nas biomoléculas

Estes radicais livres reagem com o luminol, responsável pela amplificação do sinal e produzindo QL. Esta reação pode ser inibida pela superóxido dismutase, catalase e análogos da vitamina E, este último, o Trolox (100 µL na concentração de 20 µM em tampão glicina pH 8,6), foi adotado para calibração da reação por ser o antioxidante.

A adição de plasma também diminui a QL em níveis basais por um período, denominado de tempo de indução t_i , proporcional à concentração plasmática de antioxidantes até que os radicais do luminol sejam regenerados, restituindo-se os níveis iniciais de QL.

Ao comparar o tempo de indução após a adição de concentrações conhecidas de Trolox e plasma, pode-se obter os valores de TRAP em equivalentes de Trolox segundo a equação:

$$\text{TRAP } (\mu\text{M Trolox}) = \frac{D \times t_{\text{amostra}}}{t_{\text{Trolox}}}$$

No qual, D é um fator de diluição da amostra no meio de reação (802), t_{amostra} é o tempo de indução promovido pela adição da amostra de plasma, t_{Trolox} é o tempo de indução promovido por 1 μM de Trolox. Os resultados foram expressos em CPM (fluxo de fótons contados por minuto). Este experimento foi conduzido em um contador β marca Beckman® (EUA) modelo LS 6000, utilizando-se um modo de contagem não coincidente por 30 minutos, com uma faixa de resposta entre 300 a 620 nM.

4.5.2 Medida de QM

A QM estimulada por t-butil hidroperóxido foi empregada para analisar a integridade dos mecanismos de defesa antioxidante não enzimáticos e os níveis de lipoperóxidos. O composto t-butil hidroperóxido é um potente formador de radicais peroxil. Nas membranas biológicas, estes atacam os lipídeos gerando lipoperóxidos, que podem reagir com outros lipídeos, oxidando-os. Assim, este teste baseia-se na premissa de que um aumento de QM está relacionado com um estresse oxidativo prévio sofrido pelo tecido, levando ao consumo das defesas antioxidantes de baixo peso molecular, tais como vitamina E e formação de lipoperóxidos, resultando em aumento da emissão de fótons, além disso, quanto mais oxidantes a amostra possui, maior será o tempo para que esta reação seja iniciada (GONZALES-FLECHA; LLESUE; BOVERIS, 1991; OLIVEIRA; CECCHINI, 2000; BARBOSA et al, 2003).

Para a quantificação da formação de hidroperóxidos lipídicos, por QL, foi empregado o método descrito por Gonzales-Flecha, Llesue e Boveris (1991).

A reação foi realizada em frasco para cintilação (baixo teor de potássio) com capacidade de 20mL em local protegido da luz e consistiu de tampão fosfato

monobásico 20mM pH=7,4 (865 μ L), plasma (125 μ L) e tert-butil (20 μ L) com concentração de 3mM para um volume final de reação de 2,0mL.

A QL foi medida pela reação em protocolo de quimiluminescência de uma leitura por segundo, durante 60 minutos, em contador β marca Beckman® modelo LS 6000, em um modo de contagem não coincidente com faixa de resposta entre 300 a 620nm.

4.5.3 Medida de AOPP

Para a determinação de AOPP utilizou-se o método de Witko-Sarsat et al (1996), no qual foram preparados os reagentes iodeto de potássio (KI 1,16M), padrão estoque clora mina T, uma solução lipídica PM= 282,69 1mM e ácido acético glacial PA.

Inicialmente, diluiu-se o padrão com 500 μ L do padrão estoque clora mina T e 4,5mL de tampão fosfato salino (PBS) e, realizou-se diluições seriadas, onde no primeiro adicionou-se 2mL da solução, no segundo, 1mL da solução do tubo 1 e 1mL de PBS, no terceiro tubo, 1 mL da solução do tubo B e 1mL de PBS, e assim, conseqüentemente, até o quinto tubo. Para o branco, adicionou-se 1mL de PBS.

No momento da leitura, adicionou-se 100 μ L de ácido acético e 50 μ L de KI, a leitura foi realizada imediatamente a 340nm para a obtenção da curva de calibração. A partir da curva obteve-se o fator (divisão da concentração do padrão e a média das duas absorvâncias obtidas na leitura).

Para o preparo das amostras, foi realizada a diluição de 800 μ L de PBS e 200 μ L de soro, no momento da leitura, adicionou-se 100 μ L de ácido acético e 50 μ L de KI e realizada a leitura a 340nm. A concentração da amostra é obtida pela média dos dois pontos multiplicada pelo fator obtido na curva de calibração e o fator de diluição, no qual os valores foram expressos em μ moles/L de equivalente de clora mina.

4.5.4 Preparação das amostras de tecido para MPO

A parte distal do cólon foi mantida em congelamento a -70°C e no momento da realização dos testes a amostra foi descongelada, centrifugada na velocidade de 8.000rpm durante 4 minutos para ser utilizada.

Para a atividade da MPO, adotou-se o método inicialmente descrito por Bradley et al(1982) e posteriormente modificado por Nieto et al (1998), no qual, para a determinação, uma alíquota de $115\mu\text{L}$ do homogeneizado total foi adicionado a 1mL de tampão fosfato 80 mmol/L pH=5,4 com 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e 0,167 mg/mL de dihidrocloro de o-dianisidina. A mistura foi aquecida a 37°C por 3 minutos e a reação foi iniciada pela adição $540\mu\text{L}$ de uma solução de H_2O_2 , originando uma concentração de 0,3mM de H_2O_2 no meio, e ao final de exatos 3 minutos a reação foi interrompida pela adição de 4,0mL de tampão acetato de sódio 0,2M pH=3.0 selado. Uma unidade de atividade específica da MPO foi definida como a quantia de enzimas que produziu uma mudança de 0,1 de ABS a 37°C por minuto no volume final da reação com o tampão acetato. O valor encontrado foi ajustado para U/100mg de proteínas/minuto.

4.5.5 Medida de fosfatase alcalina, gama-GT, albumina e proteínas totais

Para a medida de fosfatase alcalina e gama-GT do tecido, a parte distal do cólon que estava mantida em congelamento a -70°C , foi descongelada, centrifugada por 4 minutos a 4.000rpm para ser utilizada. Para a utilização do soro, este foi descongelado no momento da utilização, já que estava mantido em congelamento a -70°C .

A albumina As quantificações de albumina sérica, fosfatase alcalina e gama-glutamilttransferase, além das proteínas totais do soro foram realizadas em um autoanalisador bioquímico (Dade-Behring® - Dimension) utilizando-se kits Dade-Behring®.

4.5.6 Medida de proteínas totais do tecido

A quantificação de proteínas totais dos homogenatos foi determinada utilizando albumina bovina como padrão (LOWRY, 1951; MILLER, 1959), para normalização dos resultados.

4.6 Critério para Avaliação e Escore Macroscópico da Lesão Colônica

Para a avaliação macroscópica da lesão colônica foram adotados os critérios descritos por Wallace et al (1989) conforme a Tabela 6 sendo que este foi preenchido e avaliado por um profissional médico veterinário especializado no momento da eutanásia dos animais e obtenção das amostras de tecido.

Tabela 5 – Critérios para escore macroscópico da lesão colônica

ACHADO	ESCORE
Ulceração	
Aparência Normal	0
Hiperemia focal, sem ulceração	1
Ulceração sem hiperemia ou parede intestinal espessa	2
Ulceração com inflamação em um local	3
Ulceração/inflamação em dois ou mais locais	4
Sítios grandes de lesão com mais de 1 cm de extensão ao longo do cólon	5
Quando a área de lesão se estender por mais de 2cm ao longo do cólon, o escore é aumentado em 1 por cada centímetro adicional envolvido.	6-10
Adesão	
Sem adesão	0
Adesões pequenas (o cólon pode ser separado de outros tecidos com pequeno esforço)	1
Adesões grandes (o cólon pode ser separado de outros tecidos com maior esforço)	2
Diarreia	
Não	0
Sim	1
Espessura (Máximo de espessura da parede intestinal em milímetros)	
Escore total	

*a espessura foi medida com auxílio de um paquímetro.

Fonte: WALLACE et al (1989)

4.7 Análises Estatísticas

As comparações entre os grupos das variáveis contínuas foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis com post teste de Dunn. Os dados foram expressos como mediana e interquartis (25%-75%). Foram comparados todos os grupos com colite com intervenção terapêutica e o grupo controle positivo (Grupo 1).

Posteriormente realizou-se a comparação dos grupos tratado com sulfassalazina (Grupo 2) e os grupos que receberam, além da sulfassalazina, tratamentos complementares (Grupo 3, Grupo 4 e Grupo 5) utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism version 4.0. Foi considerada significância estatística quando nível de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Atividade Antagônica de *Lactobacillus plantarum* versus *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*

Pode-se observar nas figuras a seguir (Figuras 16, 17 e 18), que houve crescimento dos microrganismos nos meios de cultura, já que todos se apresentaram turvos, assim como nos respectivos poços denominados de controle no qual se adicionou a água estéril (poços 4, 3 e 3, respectivamente). Ressalta-se que todos os testes foram realizados em triplicata.

No primeiro teste, no qual cepas de *L. plantarum* (Lp-115) foi adicionado no meio de cultura, pode-se observar que seu crescimento não foi inibido pela sulfassalazina, sobrenadante da *E. coli* ou sobrenadante da *S. enteritidis*, já que não houve elos e inibição.

Dessa forma, descarta-se a hipótese de que a sulfassalazina pode inibir a proliferação de *L. plantarum*, quando consumidos concomitantemente por um indivíduo, bem como, ao ser administrado nos animais do estudo experimental.



Figura 16 - Atividade antagônica de *L. plantarum*, *S. enteritidis* e *E. coli* pelo método de difusão

No segundo teste, no qual o meio de cultura estava acrescido de *E.coli*, este não foi inibido pelo medicamento, porém, no poço adicionado do sobrenadante de *L. plantarum* (poço 2), observa-se um nítido elo de inibição, mostrando que o *L. plantarum* pode atuar também, na competição com *E.coli*.

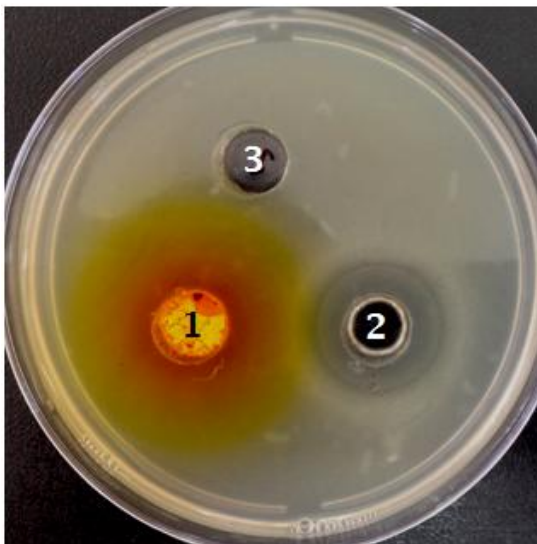


Figura 17 - Atividade antagônica de *E. coli* e *L. plantarum* pelo método de difusão

E assim como foi observado no teste 2, no terceiro teste, no qual foi inoculado *S. enteritidis* no meio de cultura, também se pode observar o elo de inibição no poço adicionado sobrenadante de *L. plantarum* (poço 2).

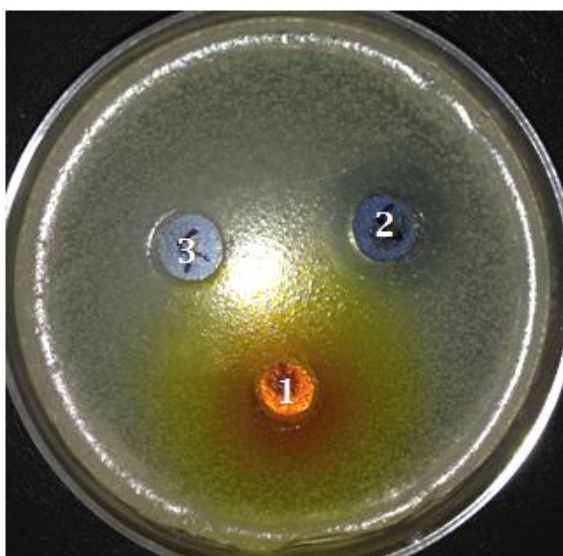


Figura 18 - Atividade antagônica de *S. enteritidis* e *L. plantarum* pelo método de difusão

5.2 Avaliação do Modelo Experimental e da Indução da Colite nos Animais

O peso dos animais foi monitorado diariamente no mesmo horário e antes da administração do tratamento, sendo que foi realizado com os animais anestesiados. A tabela abaixo (Tabela 7) apresenta duas pesagens, no qual a primeira linha corresponde à diferença de peso entre o primeiro e o último dia do experimento, no qual se observa que todos os grupos ganharam peso sem diferença significativa.

Ao analisar a diferença de peso entre os grupos no dia anterior à indução da colite (T13) e no dia posterior à indução (T15) também não foi estatisticamente significativa, assim, ao induzir a colite nos animais, independente do tratamento utilizado para prevenção, a modificação na perda de peso não foi constatada entre os grupos.

No que se refere às mortes dos animais durante o período experimental, não houve diferença estatística significativa, entre os grupos. Assim, para todas as análises, adotou-se o mínimo de sete animais por grupo.

Tabela 6 - Resultado da análise estatística dos parâmetros do modelo experimental e do escore macroscópico da lesão colônica

Análise/Grupo	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
Peso corporal (T1-T21)	21,0 (12,0 – 33,0)	13,5 (4,5 – 23,0)	15,5 (-3,9 – 23,75)	19,0 (3,5 – 29,5)	20,0 (-13,0 – 28,0)
Peso corporal (T13- T15)	-12,0 (-25,0 – -7,5)	-12,0 (-21,0 – -3,0)	-15,5 (-27,0 – 5,75)	-12,0 (-24,5 – 3,75)	-11,0 (-21,0 – -2,0)
Mortes	2	2	0	1	3
Escore macroscópico	16,0 (13,0 – 16,0)	12,0^a (10,0 – 14,0)	15,0^b (14,79 – 16,25)	11,5^a (10,25 – 13,0)	16,0 (11,0 – 16,0)

Sendo, Grupo A: Controle com Colite, Grupo B: Colite + Sulfassalazina, Grupo C: Colite + Sulfa + *L. plantarum*, Grupo D: Colite + Sulfa + Óleo de peixe, Grupo E: Colite + Sulfa + *L. plantarum* + Óleo de peixe

^a versus Grupo A $p < 0,05$; ^b versus Grupo B $p < 0,05$

As mortes dos animais ocorreram devido às anestésias diárias no éter etílico, bem como na anestesia para indução da colite nos animais, não sendo influenciadas pela doença. Assim, os grupos foram comparados com o mínimo de sete animais.

A imagem abaixo (Figura 19) apresenta uma fotografia do cólon no momento da avaliação macroscópica para um dos animais pertencentes a cada grupo, os animais diferiram quanto a lesão, porém, pode-se observar que em todos ocorreu uma lesão focal grave.

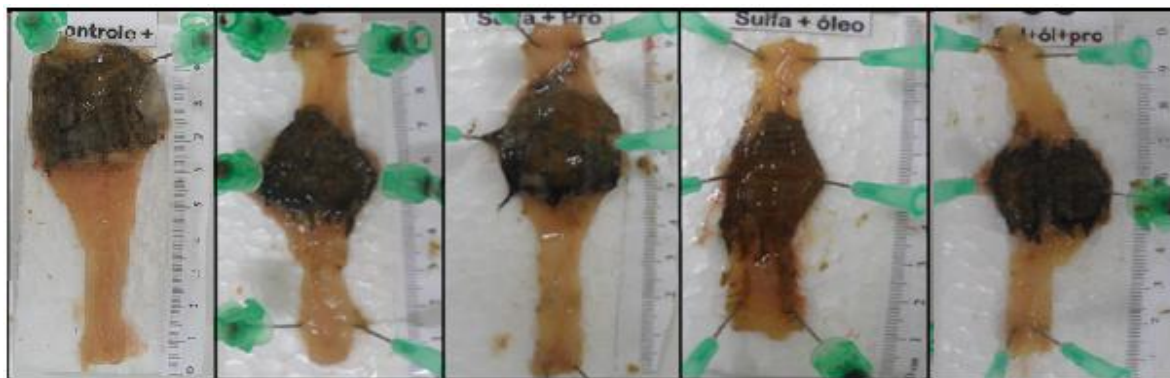


Figura 19- Fotografia da lesão colônica no momento da eutanásia

5.3 Análises Microbiológicas do Leite Fermentado com *L. plantarum* (Lp-115)

A contagem de bactérias viáveis no leite fermentado administrado nos animais esteve contida em 10^8 UFC/mL, não havendo redução de nem um ciclo log durante os quatro dias de estocagem. O resultado mostrou-se bastante satisfatório, uma vez que está bastante acima do recomendado pelo MAPA (no mínimo 10^6 UFC/mL) e dentro do especificado pela ANVISA (10^8 a 10^9 UFC/mL).

Ao final de cada uma das produções, avaliou-se o teor coliformes totais e a 45°C . Todos os lotes apresentaram resultados satisfatórios para os parâmetros microbiológicos avaliados, demonstrando que não houve influencia de outros microrganismos no leite fermentado, bem como na colite.

5.4 Aspectos Inflamatórios após Intervenções Terapêuticas na Colite Experimental

No que se refere aos aspectos inflamatórios da colite, foram realizadas as análises apresentadas na tabela a seguir (Tabela 8).

Tabela 7 - Resultado da análise estatística dos parâmetros inflamatórios

Análise/Grupo	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
Tecido					
Mieloperoxidase	73,85 (68,78 – 85,81)	68,50 (58,99 – 108,3)	60,16^a (58,24 – 62,83)	55,72^{b,c} (47,45 – 63,33)	65,10 (63,52 – 69,99)
Gama GT	10,66 (7,28 – 15,26)	11,25 (7,53 – 12,09)	13,49 (9,58 – 19,56)	12,82 (11,33 – 15,40)	15,00^c (13,81 – 22,90)
Fosfatase alcalina	82,52 (66,08 – 107,80)	119,00 (91,21 – 132,30)	99,85 (82,30 – 130,70)	110,80 (95,40 – 167,70)	125,50 (86,92 – 181,10)
Plasma					
Fosfatase alcalina	16,0 (12,5 – 16,5)	18,0 (14,0 – 29,0)	18,5^a (17,0 – 19,85)	17,0 (16,0 – 18,0)	16,0 (14,0 – 17,0)
Albumina	0,89 (0,85 – 0,99)	0,9 (0,85 – 1,04)	0,9 (0,86 – 0,93)	0,86 (0,8 – 0,98)	0,97 (0,91 – 1,03)
Proteínas totais	6,35 (6,22 – 6,83)	6,39 (6,22 – 6,82)	6,34 (6,02 – 6,77)	6,24 (6,0 – 6,49)	6,82 (5,98 – 6,91)

Sendo, Grupo A: Controle com Colite, Grupo B: Colite + Sulfassalazina, Grupo C: Colite + Sulfa + *L. plantarum*, Grupo D: Colite + Sulfa + Óleo de peixe, Grupo E: Colite + Sulfa + *L. plantarum* + Óleo de peixe

^a versus Grupo A p<0,01; ^b versus Grupo A p<0,0001; ^c versus Grupo B p<0,05

5.5 Estresse Oxidativo após Intervenções Terapêuticas na Colite Experimental

A tabela a seguir apresenta os resultados para o estresse oxidativo no plasma dos animais após o período experimental, foram realizadas as análises de AOPP, QM e TRAP.

Tabela 8 - Resultado da análise estatística dos parâmetros de estresse oxidativo

Análise/Grupo	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
AOPP	159,3 (137,4 – 167,7)	118,6^a (95,95 – 143,9)	143,1 (112,0 – 164,6)	137,70 (118,6 – 149,0)	131,4^a (101,1 – 133,3)
QM	162,0 (160,4 – 174,5)	170,6 (142,2 – 217,3)	162,9 (149,1 – 191,3)	181,4 (162,2 – 186,5)	169,6 (162,1 – 187,7)
TRAP	341,0 (330,3 – 391,2)	313,3 (309,2 – 398,3)	350,0 (319,7 – 357,2)	333,1 (317,5 – 3354,9)	317,4 (282,3 – 342,9)

Sendo, Grupo A: Controle com Colite, Grupo B: Colite + Sulfassalazina, Grupo C: Colite + Sulfa + *L. plantarum*, Grupo D: Colite + Sulfa + Óleo de peixe, Grupo E: Colite + Sulfa + *L. plantarum* + Óleo de peixe

^a versus Grupo A p<0,05

Sobre hidroperóxidos lipídicos, não foi constatada diferença estatística entre os grupos, porém, ao elaborar o gráfico com os 3.600 pontos gerados durante a leitura da quimiluminescência (faixa de 300 a 620nm) dos 60 minutos de análise, pode-se observar a diferença na geração de radicais livres entre os grupos.

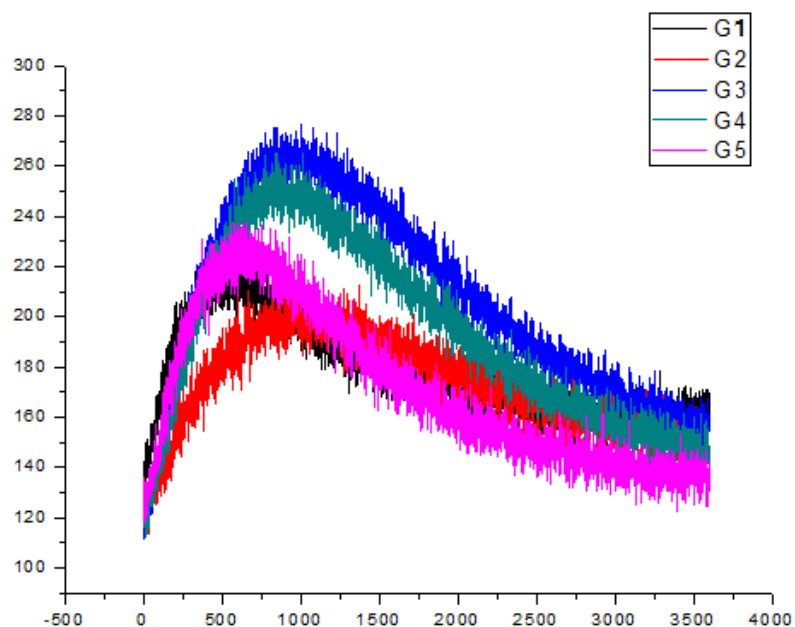


Gráfico 1 - Resultado do estresse oxidativo avaliado pelos hidroperóxidos lipídicos

6 DISCUSSÃO

De acordo com o teste *in vitro* realizado, pode-se encontrar resultados importantes para o tratamento de RCUI já que foi observado que o *L. plantarum* pode ser capaz de impedir o crescimento de microrganismos patogênicos. Cartwright (2003) sugere a importância que o tratamento na DII seja capaz de aumentar a microbiota bacteriana benéfica, ao invés de permitir o aumento do patógeno.

Segundo Clancy (2003), acredita-se que há anos a maioria dos efeitos benéficos dos microrganismos probióticos estão concentrados na sua capacidade de suprimir o crescimento de patógenos. De fato, esta interferência na barreira intestinal e, conseqüente competição entre probióticos e bactérias patogênicas por sítios específicos no epitélio intestinal e na camada mucosa sobrejacente, constitui um mecanismo de ação importante.

Assim, pesquisadores afirmam que o mecanismo denominado de “exclusão competitiva” é a principal forma de colonização da microbiota intestinal pelos probióticos. Estes microrganismos se fixam ao meio e o alteram pela síntese de ácidos graxos de cadeia curta, reduzindo a aderência dos sítios epiteliais da mucosa intestinal de forma que o desenvolvimento dos microrganismos patogênicos torna-se desfavorecido, influenciando diretamente no controle do número das unidades formadoras de colônia durante a competição por nutrientes e/ou da produção de compostos antimicrobianos (KAUR; CHOPRA; SAINI, 2002; GUARNER; MALAGELADA, 2003).

A microbiota nativa do trato gastrointestinal é responsável pela regulação imunofisiológica, sendo considerada uma barreira defensiva da mucosa. A utilização de probióticos, em especial *Lactobacillus*, *Bifidobactérias* e *Saccharomyces*, demonstra ser capaz de reduzir o crescimento indesejável de bactérias maléficas no intestino (KLARIN; WIMO; FASTBOM; 2005). Por este motivo, Saad (2006) afirma que os probióticos vem sendo amplamente utilizados como alimento funcional, além de serem utilizados como tratamento de várias patologias.

Além de competir com os microrganismos patógenos pelos sítios de adesão, ocorre também a competição por nutrientes disponíveis nos nichos ecológicos. Algumas bactérias probióticas possuem a capacidade de comunicação (“*crosstalking*” ou “*quorum sensing*”) com o hospedeiro, no qual a bactéria sinaliza o

quanto precisa de um dado nutriente e o hospedeiro o produz. Este relacionamento simbiótico impede a superprodução de um determinado nutriente, com criação de nichos ecológicos associados à exclusão de patógenos exógenos (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

As bactérias comensais, sobretudo as probióticas, podem ainda, inibir o crescimento de patógenos mediante a produção de moléculas antimicrobianas incluindo bacteriocinas, estas, por sua vez podem, ainda diminuir o pH luminal por meio da secreção de ácidos acético e láctico, e com isso inibir o crescimento de algumas bactérias patogênicas, como a *Escherichia coli* enterohemorrágica (COLLINS; BERCIK, 2009).

Outro fator importante de ser ressaltado é o mecanismo para melhora da função de barreira e eliminação de patógenos que os probióticos podem promover que seria o aumento da secreção de muco. *In vitro*, algumas espécies de *Lactobacillus* aumentaram a expressão de mucina em células humanas intestinais, bloqueando a invasão e aderência de *Escherichia coli* patogênica (MACK et al, 2003). *In vivo*, os poucos estudos realizados também demonstram uma tendência à indução da expressão de genes de mucina pelos probióticos (OHLAND; MACNAUGHTON, 2010).

Assim, os probióticos podem exercer efeitos diretos e/ou indiretos sobre a microbiota e sobre patógenos mediante a prevenção de infecções e inflamações, imunomodulação, promoção do aumento de anticorpos, produção de citocinas e, finalmente, o restabelecimento do equilíbrio da microbiota intestinal (COSTA, 2011).

No que se refere ao escore obtido na avaliação macroscópica da lesão colônica observa-se que houve diferença significativa nos Grupos B (somente com sulfasslazina) e D (sulfasslazina e *L. plantarum*) em comparação com o Grupo A (controle), no qual os grupos tratados possuíram uma diminuição do escore da lesão colônica. No estudo realizado por Peran et al (2005) os resultados de escore macoscópico atingiram os valores entre 5,5 e 8,6, demonstrando que no experimento realizado, os resultados obtidos em todos os grupos podem ser considerados como lesões graves.

Verificou-se também, ainda no escore macroscópico da lesão, que o grupo tratado apenas com sulfassalazina (Grupo B) diferiu do grupo tratado com *L. plantarum* (Grupo C), no qual o grupo tratado com a cepa probiótica apresentou um aumento da lesão quando comparado com o tratamento apenas com sulfassalazina.

Outro estudo encontrou resultados diferentes ao avaliar o efeito de probióticos na colite induzida por TNBS/etanol em ratos Wistar (180-200g). Estes receberam administração oral de probióticos *L. salivarius ssp.* E constataram que houve melhora da resposta inflamatória quando comparada com o grupo padrão sem o tratamento com probióticos. Este efeito anti-inflamatório foi evidenciado macroscopicamente pela significativa redução na extensão colônica necrosada e/ou inflamação (PERAN et al, 2005).

Damião e Sipahi (2004) ao induzir a lesão intestinal com indometacina, também observaram resultados positivos com o tratamento, encontrando redução de 45% no escore macroscópico ao utilizar cepas probióticas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus bulganicus* e *Streptococcus termophilus* na forma de 6×10^9 microrganismos vivos.

Loguercio et al (1996) observaram diferentes resultados do estudo histológico e do estresse oxidativo em ratos com colite durante oito semanas após a indução da colite com TNBS. Os autores verificaram, por meio do escore macroscópico da lesão que, na primeira semana, a lesão tecidual foi grave e, a partir da segunda semana, moderada com diminuição progressiva até a última semana avaliada. Como o período experimental após a indução de colite foi de uma semana, a lesão foi agressiva no qual foi observada até mesmo necrose tecidual com obstrução do cólon.

Assim, pode-se levantar a hipótese, que se o experimento fosse desenvolvido por um período maior, poderia ter sido observada uma melhora no escore macroscópico. Já que a indução da colite pelo TNBS em ratos é considerada um bom modelo de estudo da RCUI e tem sido utilizada frequentemente para estudos de estresse oxidativo (NIETO et al, 2000; ISOZAKI et al, 2006).

Ao avaliar os parâmetros inflamatórios, a colite tratada com sulfassalazina e *L. plantarum* (Grupo C) ou sulfassalazina e óleo de peixe (Grupo D) foi capaz de diminuir os níveis de MPO no tecido quando comparada ao grupo controle. A MPO é uma enzima constitutiva de neutrófilos que tem sido constantemente utilizada como um marcador de infiltração de neutrófilos em tecidos, principalmente no cólon (NIETO et al, 2000; CUZZOCREA et al, 2001). Assim, quanto maior sua atividade, maior a inflamação. Ao comparar o grupo tratado com sulfassalazina isolada versus os tratamentos auxiliares observa-se que houve diferença significativa entre o Grupo B (somente sulfassalazina) e o Grupo D (sulfassalazina e óleo de peixe) ($p < 0,05$), ou

seja, ao consumir a sulfassalazina e óleo de peixe, pode-se observar uma diminuição dos níveis de mieloperoxidase quando comparados ao tratamento apenas com sulfassalazina.

A dieta, quando suplementada com ácidos graxos n-3 tem sido associada à redução de doenças cardiovasculares, neoplasias e à prevenção de pré-malignidade para lesões de câncer de cólon. Assim, pacientes com risco potencial para desenvolvimento de carcinoma colo retal, como os portadores de RCUI, podem-se beneficiar do seu efeito protetor (DICHI; BURINI, 1996).

Vários trabalhos têm enfatizado os benefícios da imunonutrição com ácidos graxos n-3 em diversas situações clínicas. Campos et al (2002), verificou os resultados da administração parenteral de diferentes emulsões lipídicas em colite aguda em ratos Wistar machos, e concluíram que apesar das emulsões contendo triglicerídeos de cadeia longa com baixa razão n-3/n-6 não modificarem as manifestações inflamatórias da colite, a associação entre triglicerídeos de cadeia média e de cadeia longa e óleo de peixe determinou impacto benéfico no que se refere à inflamação e principalmente aos níveis de MPO.

Nieto et al (1998) realizaram um estudos com 160 ratos, destes, 80 foram tratados com TNBS para indução de colite experimental e o restante, com um volume idêntico de NaCl 0,9% e foram aleatoriamente atribuídos a quatro subgrupos de 20 ratos cada. Após a indução foram ofertadas diferentes dietas, tendo como componente principal em cada uma delas: azeite de oliva, óleo de peixe ou fosfolípidos cerebrais purificados de porco. Os autores concluíram que os ácidos graxos n-3 podem agir beneficemente quando administrados para prevenir a inflamação na RCUI avaliado por meio da fosfatase alcalina e Gama-GT.

No que se refere ao tratamento com probióticos no controle da inflamação, outros estudos apresentaram resultados satisfatórios quando à sua utilização. Gionchetti et al (2000) avaliaram 40 pacientes portadores de pouchite, uma inflamação possível de ocorrer após uma anastomose íleo-anal, normalmente realizada em pacientes com RCUI com caráter curativo da doença. Destes, 50% receberam durante nove meses uma mistura de probióticos contendo três cepas de bifidobactérias, quatro cepas de lactobacillii e *Streptococcus termophilus*, enquanto que o restante recebeu placebo. Do grupo placebo, todos (100%) reativaram a pouchite, enquanto o grupo que recebeu a mistura de probióticos, apenas 15% reativaram, demonstrando a importância da terapia nutricional com probióticos,

principalmente para pacientes portadores de RCUI submetidos à pouchite.

Ao administrar o probiótico *L. salivarius ssp.* em ratos machos com colite induzida através do ácido trinitro-benzeno sulfônico (TNBS), Peran et al (2007) verificaram diminuição na produção de alguns mediadores envolvidos na resposta inflamatória do intestino, como por exemplo de TNF- α (fator de necrose tumoral), o que é relevante, pois o TNF- α atua como potente indutor de quimiotaxia, contribuindo para o recrutamento de neutrófilos no cólon e iniciando a cascata inflamatória, que contribui para melhora da inflamação do cólon. Além disso, age inibindo o óxido nítrico (NO) e, desta forma, preserva a mucosa do cólon. Tal efeito benéfico pode ser atribuído à alteração na resposta imune que se torna comum nesta condição inflamatória.

Os mesmos autores também notaram que houve uma melhora da resposta inflamatória quando comparada com o grupo sem o tratamento com probióticos, pois ocorreu um efeito anti-inflamatório evidenciado pela significativa redução na extensão colônica necrosada e/ou na inflamação.

Em outro estudo, realizado por Sazawal et al (2006), verificou-se uma diminuição de 57% do risco de diarreia aguda entre crianças e de 26% nos adultos, após uma ingestão contínua de *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus* e *L. rhamnosus GG*.

A combinação de *L. acidophilus* ($3,33 \times 10^6$ UFC/g), *B. bifidum* ($3,33 \times 10^6$ UFC/g), *E. faecium* ($3,33 \times 10^6$ UFC/g) e Probiótico Vetnil foi administrada via retal em ratos com colite induzida em um estudo realizado por Souza et al (2007) e observou-se que seu efeito, em associação à budesonida ou não, acelera o trofismo mucoso, que resulta em efeitos benéficos para o tratamento, já que aumenta as trocas metabólicas entre os tecidos, melhorando a nutrição.

Quanto à utilização de *Lactobacillus plantarum* na imunomodulação in vitro em células extraídas de cólon humano inflamado, notou-se um aumento na síntese de IL-10, secreção de macrófagos e células T derivadas do cólon inflamado (PATHMAKANTHAN et al, 2004).

Dentre os principais efeitos benéficos estabelecidos mediante a ingestão de probióticos incluem: atividade antimicrobiana, propriedades anti-diarreicas e alívio da constipação, redução do risco de doenças gastrointestinais e imunomodulação (ISOLAURI, SALMINEN, OUWEHAND, 2004; SHAH, 2007).

No que se refere a Gama-GT no tecido, uma enzima hepática que se localiza no interior das células do fígado e quando ocorre destruição das células hepáticas a enzima entra na corrente sanguínea. É um marcador sensível para lesão tecidual e de estresse oxidativo, sendo que quanto mais alto o valor de Gama-GT maior é o grau de inflamação hepática (REIS; PEDRUZZI, 2007; SIMÃO et al, 2008), observa que houve um aumento significativo da atividade ao comparar o Grupo E (tratado com sulfassalazina, óleo de peixe e probióticos) e o Grupo B (tratado apenas com sulfassalazina). Normalmente, o aumento de Gama-GT está associada com um aumento de estresse oxidativo e inflamação. Porém, o aumento da atividade da enzima pode ser explicada, pois o aumento desta também possui o objetivo de aumentar sua atividade para colocar dentro da célula a glutathione, um antioxidante importante. Assim, dentre as suposições que podem ser feitas, é que esta enzima pode ter sido aumentada como um efeito para melhorar as defesas antioxidantes intracelular (SIMÃO et al, 2008).

Já, sobre a fosfatase alcalina, uma enzima que possui a capacidade de retirar grupos de fosfato de uma distinta gama de moléculas, abrangendo nucleotídeos, proteínas e alcalóides e é utilizada no diagnóstico e no acompanhamento de distúrbios hepáticos e ósseos (REIS; PEDRUZZI, 2007), pode-se observar que o Grupo C diferiu do Grupo A ($p < 0,01$), no qual sua atividade foi aumentada quando avaliada no plasma. Este aumento pode ser observado ao comparar o grupo sem tratamento e o grupo tratado com sulfassalazina e probióticos, dentre as hipóteses a serem levantadas, é que a sulfassalazina por si só já é agressora já que esta pode causar toxicidade por níveis séricos elevados de sulfapiridina (CATAPANI, 2009).

Não se observou diferenças significativas nas atividades de fosfatase alcalina no tecido e de albumina e proteínas totais no plasma.

Avaliando o estresse oxidativo na colite, observa-se que a única diferença obtida pela análise estatística relacionada foi constatada na AOPP, no qual o Grupo B (sulfassalazina) e o tratamento concomitante de sulfassalazina, óleo de peixe e probióticos (Grupo E), diferiram do grupo controle, melhorando os parâmetros de estresse oxidativo. No entanto, estes não foram diferentes entre si, assim o tratamento com terapias complementares não foi capaz de diminuir o estresse oxidativo avaliado pela AOPP.

O mesmo resultado observado também foi obtido no primeiro estudo realizado por Dichi et al (2000) no qual se pode verificar que o tratamento com sulfassalazina (2g/dia) era superior à utilização de ácidos graxos n-3 de óleo de peixe (5,4g/dia – 18 cápsulas) em pacientes com RCUI leve ou moderada. Porém, posteriormente, o mesmo grupo (BARBOSA et al, 2003) verificou que ao associar ácidos graxos n-3 de óleo de peixe (4,5g/dia – 15 cápsulas) à sulfassalazina houve uma diminuição do estresse oxidativo de pacientes com RCUI leve ou moderada, o que não ocorreu com o uso isolado de sulfassalazina. Além disso, a suplementação com óleo de peixe nestes pacientes foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante do plasma.

No que se refere ao TRAP, que avalia a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes no meio que resulta em um parâmetro integrado capaz de revelar alterações no equilíbrio redox existente *in vivo* (VASCONCELOS et al, 2007), em outro estudo envolvendo um grande número de pacientes com RCUI e DC, Koutroubakis et al (2004) compararam dois métodos automatizados para determinar o TRAP em 191 pacientes, sendo que nestes dois métodos havia redução nos valores do TRAP em pacientes com DC e RCUI em relação aos controles negativos. Também verificaram que pacientes com DC ativa apresentavam valores menores destas determinações quando comparados com pacientes em remissão, o mesmo não sendo observado nos pacientes com RCUI.

Observa-se que no Grupo C, tratado com probióticos, houve um aumento do estresse oxidativo avaliado. A hipótese a ser levantada é que este aumento do estresse oxidativo pode ser ocasionado como uma alternativa de defesa, aumentando a síntese de radicais livres para combater outras bactérias patogênicas, ou seja, os probióticos, além de serem capazes de diminuir a adesão de microrganismos patogênicos na parede intestinal, também estimulam a imunidade da parede intestinal.

Segundo Ma, Forsythe e Bienenstock (2004), os probióticos apresentam mecanismos de ação na prevenção e no tratamento das doenças inflamatórias intestinais resultantes da modulação do sistema imune. A administração de *Lactobacillus casei* foi relacionada com a indução de uma resposta antitumoral mediada por células T e a ativação de macrófagos (KATO; ENDO; YOKOKURA, 1988).

Algumas referencias sendo na sua maioria relatando estudos com bactérias ácido-lácticas, demonstra que os probióticos possuem efeito imunestimulante em animais e no homem, apesar de ainda não estarem esclarecidos os mecanismos pelos quais isto ocorre (CROSS; WILSON, 2003).

Este efeito pode estar relacionado à capacidade dos probiótico interagirem com as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA e a migração de células T do intestino (PERDIGÓN; HOLGADO, 2000). Também tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (CROSS; WILSON, 2003).

Assim, ao atrair os macrófagos, os probióticos podem aumentar a resposta imune contra os microrganismos como uma resposta rápida, porém, de forma que este não é suficiente para prejudicar o organismo já que se trata de uma geração controlada (CROSS; WILSON, 2003).

O aumento de hidroperóxidos causado pelo óleo de peixe pode ser explicado, pois este é um ácido graxo poli-insaturado, portanto a oxidação tende a ser maior (CAMPOS et al, 2002). Já, no grupo tratado com sulfasalazina, este por ser um anti-inflamatório, ocasionará uma conseqüentemente diminuição na geração de radicais livres (BARBOSA et al, 2003). Porém, a utilização das terapias complementares concomitantes, pode ter levado a uma diminuição do estresse devido ao equilíbrio entre eles.

7 CONCLUSÃO

Houve redução significativa da atividade da enzima mieloperoxidase quando a colite experimental foi tratada 14 dias antes da indução e após sete dias com óleo de peixe e com o leite fermentado com *Lactobacillus plantarum* (LP-115). Além disso, ao comparar com o grupo tratado com sulfassalazina, o grupo tratado com óleo de peixe também obteve a diminuição da atividade enzimática.

Reduções do estresse oxidativo avaliado pelos produtos avançados da oxidação proteica também foram verificadas nos grupos tratados com sulfassalazina e o tratamento concomitante de sulfassalazina, óleo de peixe e probióticos. No entanto, estes não diferiram entre si, sugerindo que o tratamento com terapias complementares não foi capaz de diminuir o estresse oxidativo avaliado pela AOPP.

A diminuição da atividade inflamatória e do estresse oxidativo verificados em alguns resultados com a utilização de sulfassalazina, n-3 de óleo de peixe e probióticos poderiam ser mais significativos com um tempo maior de espera após a indução da colite.

REFERENCIAS

ADA. American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: **Functional Foods**, v. 10, p. 1278 – 1285, 1999.

ANDRADE, P. M. M. A; CARMO, M. G. T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanoides, inflamação e imunidade. **MN metabólica**, v. 8, n. 3, p. 135 – 143, jul – set, 2006.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J Vasc Br**, v. 3, n. 2, p. 145 – 154, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE COLITE ULCERATIVA E DOENÇA DE CROHN (ABCD). Disponível em: < <http://www.abcd.org.br/tratamento2.asp>>. Acesso em: 11 abr. 2014.

BARBOSA, D. S; et al Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil ω -3 fatty acids and sulfasalazine in ulcerative colitis. **Nutrition**, v. 19, n. 10, p. 837 – 842, 2003.

BARRETO, F. M.; et al Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* on glycemia and homocysteine levels in postmenopausal women with metabolic syndrome: a pilot study. **Nutrition**. 2014.

BIELECKA, M; BIEDRZYCKA, E; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v. 35, n. 2-3, p.125-131, 2002.

BIONDO-SIMÕES, M. de L. P. et al Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. **Rev bras Coloproct.** v. 23, n. 3, jul – set, 2003.

BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**. v. 60, n. 3, p. 618-622, 1982.

BRASIL [1]. Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV. Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002. **Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências**. Disponível em: <http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_714.pdf>. Acesso em: 11 abr. 2014.

BRASIL [2]. ANVISA- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. Resolução RDC n. 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm>. Acesso em: 20 jul. 2014.

BRASIL. ANVISA- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm >. Acesso em: 20 mar. 2014.

BUJALANCE, C.; et al A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. **International Journal of Food Microbiology**. v. 113, p. 28 -34, 2007.

BURGOS, M. G. P. A; et al Doenças inflamatórias intestinais: o que há de novo em terapia nutricional? **Rev Bras Nutr Clin**, v. 23, n. 3, p. 184 – 189, 2008.

BYRAV, D. S. P; et al. Comparative Evaluation of Different Doses of Green Tea Extract Alone and in Combination with Sulfasalazine in Experimentally Induced Inflammatory Bowel Disease in Rats. **Dig Dis Sci**. N. 56, p. 1369 – 1378, 2011.

CAMPOS, F. G; et al Inflammatory bowel diseases: principles of nutritional therapy. **Rev Hosp Clin Fac Med USP**, v. 57, n. 1, p. 187 – 198, 2002.

CARTWRIGHT, P. Probiotics for IBD: evidence for benefits. Crohn's & Colitis. In:_____. **Probiotics for Crohn's e Colitis**. Great Britain, Prentice Publishing. 2003. p. 46 - 53.

CATAPANI, W. R. Doença inflamatória intestinal. **RBM Rev. Bras. Med**, v. 11, n. 66, p. 410 - 419, nov, 2009.

CLANCY, R. Immunobiotics and the probiotic evolution. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 38, p. 9-12, 2003.

COLLINS, S. M.; BERCIK, P. The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. **Gastroenterology**. v. 136, p. 2003-2014, 2009.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1297 - 1303, jul - ago, 2004.

COSTA, A. L. S; CHAVES, E. C. Processos de enfrentamento do estresse e sintomas depressivos em pacientes portadores de retocolite ulcerativa idiopática. **Rev Esc Enferm USP**, v. 40, n. 4, p. 507 – 514, 2006.

COSTA, G. N; et al *In silico* phylogenetic analysis of lactic acid bacteria and new primer set for identification of *Lactobacillus plantarum* in food samples. **European Food Research Technology**. v. 233, n. 2, p. 233-241, 2011.

CROSS, R. K.; WILSON, K. T. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. v. 93, n. 3, p.179-189, 2003.

CUKIER, C; WAITZBERG, D. L. Biological activity of fish oil. **Arq. Gastroenterol**, v. 33, n. 3, p. 173 - 178, jul - set, 1996.

CUZZOCREA, S.; et al Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor reduces the severity of experimental colitis induced by dinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Eur J Pharmacol*. v. 431, p. 91-102, 2001.

DAMIÃO, A. O. M. C; SIPAHI, A. M. Doença inflamatória intestinal. In: PAULA-CASTRO, L; COELHO, L. G. V., eds. **Gastroenterologia**. Rio de Janeiro: Medsi, 2004.

DE SOUZA, M. M.; BELASCO, A. G. S.; AGUILAR-NASCIMENTO, J. E. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de doença inflamatória intestinal do estado de Mato Grosso. **Rev. Bras. Coloproct.**, v. 28, n. 3, p. 324-328, jul- set, 2008.

DENIPOTE, F. G; TRINDADE, E. D. B. S. de M; BURINI, R. C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arq. Gastroenterol**. São Paulo, v.47, n.1, jan – mar, 2010.

DICHI, I; BURINI, R. C. Dietoterapia na doença inflamatória intestinal. **Rev Bras Nut Clin**, v. 11, n. 1, p. 1 – 7, 1996.

DICHI, I; et al Comparison of ω -3 fatty acids and sulfasalazine in ulcerative colitis. **Nutrition**, v. 16, n. 2, p. 87 – 90, 2000.

DIN, J. N; NEWBY, D. E; FLAPAN, A. D. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease: fishing for a natural treatment. **BMJ**, v. 328, p. 30 – 35, 2004.

ELSON, C. O, et al Experimental Models of inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**. v. 109, p. 1344 - 1367, 1995.

FAO - Food and Nutrition paper 85. Probiotics in food - Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. (2006). Report of a Joint FAO-WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, 2001.

FIGUEIRÊDO, A. A. de; et al Colite ulcerativa inespecífica em crianças e adolescentes: análise casuística. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant**, Recife, v. 4, n. 3, jul – set, 2004.

FIGUEROA-GONZÁLEZ, I.; et al Probiotics and prebiotics – perspectives and challenges. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 91, p. 1341–1348, 2011.

FLORA, A. P. L; DICHI, I. Aspectos atuais na terapia nutricional da doença inflamatória intestinal. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 21, n. 2, p. 131 - 137, 2006.

FONSECA, H. C. Doenças Inflamatórias Intestinais. In: FONSECA, H C; et al **Gastroenterologia**: rotinas terapêuticas. São Paulo: Fundação Byk, 2003. p.192.

FULLER, R. **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman & hall, p. 209-221, 1992

GHOSH, S; SHAND, A. FERGUSON, A. Ulcerative Colitis. **BMJ**, v. 320. P. 1119 – 1123, 2000.

GIONCHETTI, P. *et al Probiotics and barrier function in colitis*. **Gastroenterology**, v. 119, n. 2, p. 305 - 309, 2000.

GONZALEZ-FLECHA B, LLESUY S, BOVERIS A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radic Biol Med**. v. 10, n. 2, p. 93 – 100, 1991.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v. 361, p. 512-518, 2003.

ISOZAKI, Y.; et al Effect of a novel water-soluble vitamin E derivative as a cure for TNBS-induced colitis in rats. **Int J Mol Med**. v.17, p. 497-502, 2006.

KANAUCHI, O; et al The beneficial effects of microflora, especially obligate anaerobes and their products on the colonic environment in inflammatory bowel disease. **Curr Pharm Des**, v. 11, n. 8, p. 1047 – 1053, 2005.

KATO, I.; ENDO, K.; YOKOKURA, T. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. **International Journal of Immunopharmacology**, Oxford, v.16, n.1, p.29-36, 1994.

KAUR, I. P; CHOPRA, L; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutic applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 1 – 9, 2002.

KLARIN, I; WIMO, A; FASTBOM, J. The association of inappropriate drug use with hospitalisation and mortality: a population-based study of the very old. **Drugs Aging**. v. 22, p. 69-82, 2005.

KOPP-HOULIHAN, J. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v. 101, p. 229-241, 2001.

KOUTROBAKIS, I. E.; et al Decreased Total and Corrected Antioxidant Capacity in Patients with inflammatory Bowel Disease. **Dig Dis Sci**. v. 49, n. 9, p. 1433-1437, 2004.

KUMAR, S.; et al Severe ulcerative colitis: prospective study of parameters determining outcome. **J Gastroenterol Hepatol**. v.19, n. 11, p. 1247-1252, 2004.

LEE, Y. K.; SALMINEN, S. **Handbook of probiotics and prebiotics**. New Jersey: Wiley, p.596, 2009.

LOFTUS, E.V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, Prevalence, and Environmental Influences. **Gastroenterology**. v. 126, p. 1504-1517, 2004.

LOGUERCIO, C.; et al Direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental colitis in rats. **Dig Dis Sci.** v. 41, p. 1204-1211, 1996.

LOWRY, O. H.; et al Protein measurement with the folin phenol reagent. **The journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MA, D.; FORSYTHE, P.; BIENENSTOCK, J. Live *Lactobacillus reuteri* is essential report of a joint for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5308-5314, 2004.

MACK, D.R.; et al Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. **Gut.** v. 52, p. 827-833, 2003.

MILLER, G. L. Protein determination for larger numbers of samples. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 5, p. 964, 1959.

MORIS, G. P, et al Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v. 96, p.795-803, 1989.

NARUSZEWICZ, M. et al Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. **The American Journal of Clinical Nutrition.** v. 76, p. 1249-1255, 2002.

NIETO, N.; et al Experimental ulcerative colitis impairs antioxidante defense system in rat intestine. **Dig Dis Sci.** v. 45, n. 9, p. 1820-1827, 2000.

NIETO, N; et al Dietary monounsaturated n-3 long-chain polynsaturated fatty acids affect cellular antioxidant defense system in rats with experimental ulcerative colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid. **Dig Dis Sci**, v. 43, p. 2676 - 2687, 1998.

OHLAND, C. L.; MACNAUGHTON, W. K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology.** v. 298, p. 807-819, 2010.

OLIVEIRA, F. J. D. A.; CECCHINI, R. Oxidative stress of liver in hamster infected with *Leishmania* (L) chagasi. **J Parasitol.** v. 86, p. 1067-1072, 2000.

PAOLILLO, R.; et al Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells. **International Immunopharmacology.** v. 9, p. 1265-1271, 2009.

PATHMAKANTHAN, S. et al Lactobacillus plantarum 299: beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 19, n. 2, p. 166 – 173, 2004.

PEPPERCORN, M; GOLDMAN, P. Distribution studies of salicylazosulfapyridine and its metabolites. **Gastroenterology**, n. 64, v. 2, p.240-243, fev, 1973.

PERAN, L. et al A comparative study of the preventative effects exerted by three probióticos, *Bifidobacterium Lactis*, *Lactobacillus Casei* and *Lactobacillus Acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 836 – 844, out, 2007.

PERDIGÓN, G.; HOLGADO, A.P.R. Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: FULLER, R.; PERDIGÓN, G. **Probiotics 3: Immunodulation by the Gut Microflora and Probiotics**. Dordrecht : Kluwer Academic, 2000. p.213-233.

REIS, N. T; PEDRUZZI, M. B. Terapia Nutricional nas Afecções do Trato Digestório. In:____. SILVA, S. M. S; MURA, J. D. P. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, 2007. p. 515 – 548.

REPETTO, M, et al Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clin Chim Acta**. v. 255, n. 2, p. 107-17, 1996.

ROLFE R. D. The role of probiotic culture in the control of gastrointestinal health. **J Nutr** . n, 130, p. 369 - 402, 2000.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm**, São Paulo, v. 42, n.1, p. 1-16, jan-mar, 2006.

SAZAWAL, S.; et al Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 374-382, 2006.

SCHREZENMEIR, J; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 361 - 364, 2001.

SEKSIK P, MARTEAU P. Probiotics in inflammatory bowel disease: controlled trials and perspectives. **Therapie**, v. 29, n. 1, p. 83 – 87, 2004.

SILVA, L. L; STAMFORD, T. L. M. Alimentos probióticos: uma revisão. **Higiene alimentar**, n. 11, v. 68-69, p. 41-50, 2000.

SIMÃO, A. N. C; et al. Influence of uric acid and γ -glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. **Nutrition**. n. 24, p. 675 – 681 , 2008.

SIMOPOULOS, A. P. Essential fatty acids in health and chronic. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 3, p. 560 - 569, set, 1999.

SOUZA, M. M; et al Effects of budesonide and probiotics enemas on the colonic mucosa of rats with experimental colitis. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 22, n.1, jan – fev, 2007.

SOUZA-JUNIOR, O. G. de; et al Estudo macroscópico da colite experimental tratada com ácido 5-aminossalicílico (5-ASA). **Rev. Para. Med.** v. 14, n. 3, p. 39 - 43, set - dez. 2000.

STANTON, C; et al Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, Edward R; **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.27-58.

SUÁREZ-MAHECHA, H; et al A importância de ácidos graxos poliinsaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 101 - 110, 2002.

SUTHERLAND, L; MAY, G; SHAFFER, E. A. Sulphasalazine revisited: a meta-analysis of 5-aminosalicylic acid in the treatment of ulcerative colitis. **American College of Physicians**, n. 118, v. 7, p. 540-549, 1993.

TEIXEIRA NETO, F; GOMES, C.H.G. Doença Inflamatória Intestinal. In: TEIXEIRA NETO, F; ed. **Nutrição Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 360 - 371.

TEIXEIRA, W. G. J; et al Manifestações extra-intestinais após tratamento cirúrgico da retocolite ulcerativa. **Rev bras Coloproct**, v. 21, n.1, p. 9 – 18, 2001.

VAN DE WATER, J. Yogurt and immunity: the health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria. In: FARNWORTH, E. R., ed. **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.113-144.

VASCONCELOS, S. M. L.. et al Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quimi. Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics: from Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.

VERONESI, J. Inflammatory bowel disease. **Registered Nurse**, v. 66, n. 5, p. 38 – 45, 2003.

VISENTAINER, J. V; et al Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 20, n. 1, abr, 2000.

VRIES, M. C.; et al Lactobacillus plantarum—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**, v.16, p.1018-1028, 2006.

WALLACE, J. L, et al Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**. v. 96, p. 29-36, 1989.

WARD, O.P. Microbial production of long-chain PUFAs. **Biotechnology Inform**, v. 6, n. 6, p. 683 – 687, 1995.

WITKO, A. T. V; et al Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, **Kidney International**, v. 49, p. 1304 – 1313, 1996.

YEN, D.; et al IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 116, p. 1310-1316, 2006.

ANEXOS

ANEXO I – CARTA DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA



COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 84/2010

Londrina, 12 de agosto de 2010.

Prezada Pesquisadora

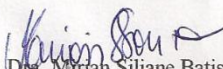
O CEEA/UEL, reunido em 13 de julho do ano corrente, avaliou o projeto de “Efeito da utilização de probióticos e ácidos graxos N-3 de óleo de peixe no tratamento da retocolite ulcerativa inespecífica induzida por TNBS em ratos machos Wistar”, registrado no CEEA sob o nº 35/10, processo nº 14820.2010.21, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o *aprovado* para execução por entender que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 50 ratos Wistar, pesando entre 220 e 250 gramas, machos, com procedência da Universidade Estadual de Maringá. Os animais serão divididos em 5 grupos com 10 animais cada: A. não sofrerá indução de retocolite e nem intervenção terapêutica (controle negativo); B. será induzida a retocolite mas não haverá intervenção terapêutica (controle positivo); C, D e E receberão dieta normoprotéica, sofrerão indução da retocolite e serão submetidos a tratamento com probiótico, ácido graxo n-3 de óleo de peixe e associação destes dois. O projeto está previsto para ser desenvolvido entre agosto de 2010 e março de 2012.

Cumprе orientar que caso se pretendam quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação do CEEA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,


 Prof. Dra. Mirrah Siliane Batista de Souza
 Coordenadora do CEEA/UEL

Ilma. Sra.
 Prof. Dra. Andrea Name Colado Simão
 Coordenadora do Projeto
 Departamento de Patologia Aplicada, Análises Clínicas e Toxicológicas
 Centro de Ciências da Saúde

Com cópia para Srª Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG).