

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

PALOMA OLIVEIRA ANTONINO DE ASSIS

**EFEITO DE PRODUTOS LÁCTEOS CAPRINOS SOBRE A
DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL EM MODELO
ANIMAL**

João Pessoa – PB
2015

PALOMA OLIVEIRA ANTONINO DE ASSIS

**EFEITO DE PRODUTOS LÁCTEOS CAPRINOS SOBRE A
DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL EM MODELO
ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Área de concentração: Análise e Controle de Qualidade de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga

Co-orientadora: Profa. Dra. Leylliane de Fátima Leal Interaminense de Andrade

Co-orientadora: Profa. Dra. Gerlane Coelho Bernardo Guerra

A848e Assis, Paloma Oliveira Antonino de.
Efeito de produtos lácteos caprinos sobre a doença
inflamatória intestinal em modelo animal / Paloma Oliveira
Antonino de Assis.- João Pessoa, 2015.
111f. : il.
Orientadora: Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga
Coorientadoras: Leylliane de Fátima Leal Interaminense de
Andrade, Gerlane Coelho Bernardo Guerra
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
1. Nutrição. 2. Leite de cabra. 3. Probiótico. 4. Iogurte e
mel. 5. Alimento funcional. 6. Colite.

UFPB/BC

CDU: 612.3(043)

PALOMA OLIVEIRA ANTONINO DE ASSIS

**EFEITO DE PRODUTOS LÁCTEOS CAPRINOS SOBRE A
DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL EM MODELO
ANIMAL**

Dissertação Aprovada em 13 / 02 /2015.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga
DN/CCS/UFPB



Prof. Dra. Gerlane Coelho Bernardo Guerra
DBF/CB/UFRN



Prof. Dra. Juliana Késsia Barbosa Soares
CES/ UAS/UFCG



Prof. Dra. Liana Clébia de Moraes Pordeus
DFP/CCS/UFPB

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que sempre me deram amor, carinho,
apoio e incentivo durante esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me conduzido durante esta caminhada, a qual só foi possível porque Ele esteve comigo, me orientando, dando forças e cuidando de mim em todos os momentos.

Aos meus pais, Israel e Iolanda, que desde o primeiro dia me deram forças pra ir em frente, me ensinando a não desistir nunca. Por todo amor, carinho, apoio e incentivo.

A meu irmão, Pablo e à minha cunhada, Elisa, por todo apoio e incentivo, e por ter me ajudado, sempre que precisei.

Ao meu noivo, namorado, amigo, Matheus, que sempre teve paciência, me incentivou e me deu forças durante esta caminhada.

À minha orientadora, Profa Dra Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga, pela orientação, conselhos, valiosos ensinamentos e confiança para realização desta pesquisa.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Leylliane de Fátima Leal Interaminense de Andrade, pelas contribuições, ensinamentos e constante disponibilidade na realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Gerlane Coelho Bernardo Guerra, pelas valiosas contribuições, ensinamentos e disponibilidade. Por todo apoio nas análises realizadas na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

A Tamires Alcântara Dourado Gomes Machado, pela elaboração do iogurte caprino para o desenvolvimento deste trabalho.

A Profa Dra. Jailane de Souza Aquino, por disponibilizar o Laboratório de Nutrição Experimental/ UFPB para realização do experimento, bem como pelo apoio durante o mesmo.

À equipe de trabalho do Laboratório de Nutrição Experimental/ UFPB, todos foram essenciais, em algum momento, para realização desta pesquisa.

A Jéssyca, Raphaela, Fernanda, Helena, por sempre estarem disponíveis para me auxiliar na realização do experimento.

A Profa. Dra. Juliana Késsia Barbosa Soares e a Profa. Dra. Liana Clébia de Moraes Pordeus, pelo apoio, disponibilidade e sugestões para realização deste trabalho.

A minha amiga, Daline, pela amizade, força e apoio em todos os momentos. Por sempre estar disponível em ajudar, em especial, nas análises realizadas na UFRN.

À equipe de trabalho do Laboratório de Biofísica e Farmacologia/ UFRN, Dona Neida, Flávio, César, Arthur e Cássio, pela disponibilidade em ajudar nas análises ali realizadas.

A Profa Dra. Aurigena Antunes de Araújo, pelos ensinamentos e auxílio na realização das análises de citocinas.

Ao Prof. Dr. Raimundo Fernandes de Araújo Júnior, pela disponibilidade em realizar as análises imunohistoquímicas.

À equipe do Laboratório de Bromatologia/ UFPB, pelo companheirismo e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

A Eduardo Vasconcelos, pela ajuda e disponibilidade, sempre que precisei, na análise estatística do trabalho.

A Elieidy, por sempre me ajudar em tudo que precisei, esclarecendo dúvidas que surgiam ao longo do experimento.

Ao Prof. Dr. Hugo Enrique Mendez Garcia, pelo apoio e estar sempre disponível a ajudar nas análises histológicas do trabalho.

A Tamires Alcoforado Sena de Lima, por sempre estar presente nos momentos em que precisei e pela disponibilidade para realização dos preparos histológicos para análise.

Ao Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa, do Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica (LAMIB), pela disponibilidade em ceder o Laboratório para realização das fotos histológicas.

Ao Prof. Dr. Alexandre Sérgio Silva, por ter disponibilizado o Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e à Saúde (LETFADS/ UFPB) para realização das análises bioquímicas.

A Lidiane Tavares e Luciana Tavares, pela disponibilidade em ajudar na realização das análises bioquímicas.

Aos secretários do Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição, seu Carlos e seu Marcos, por todo apoio e disponibilidade em ajudar em todos os momentos.

Ao CNPq, Processo: 403020/2013-1 Edital: Chamada N° 39/2013 MCTI/ CT – AGRONEGÓCIO/ CNPq/ LINHA 2: Produto Lácteo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa durante o estudo.

A todos vocês, muito obrigada!

RESUMO

O leite de cabra é um alimento de alto valor nutritivo que proporciona características terapêuticas e dietéticas, sendo assim uma excelente fonte para obtenção de produtos com potencial funcional, cujos benefícios nutricionais podem ser aprimorados enriquecendo-os com cepas probióticas. O leite e seus derivados podem prover o suporte nutricional necessário para pacientes com inflamação intestinal. A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma doença imunologicamente mediada que leva à destruição do tecido no trato gastrointestinal e, compreende a Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerativa (CU). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito anti-inflamatório intestinal do leite e do iogurte caprino adicionado de *Lactobacillus acidophilus*, acrescido ou não de mel de abelhas nativas (*Melipona scutellaris*), em ratas com colite induzida. Foram utilizadas ratas Wistar (190 a 240 g) divididas em 7 grupos experimentais (n = 10): Não colítico; Colítico; Leite de Cabra (LC); Iogurte Caprino (sem mel) (IC); Iogurte Caprino adicionado de Mel (10%) (ICM), Iogurte Caprino adicionado de Mel (10%) duas vezes ao dia (ICM/2x) e Sulfassalazina 250 mg/kg (SAZ). Os animais receberam, diariamente, via gavagem, 1 mL do produto durante 14 dias. Depois deste período, foi, então, induzida a colite com ácido acético (0,5 mL de 10% v/v em solução salina 0,9%). Quarenta e oito horas depois da indução, os animais foram eutanasiados. Foram avaliados o dano macroscópico e microscópico da colite, os parâmetros inflamatórios, expressos pela Mieloperoxidase (MPO), Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α , Interleucina (IL)1- β , Cicloxigenase (COX)-2 e iNOS (Óxido Nítrico Sintetase Induzida) e os marcadores de estresse oxidativo, como o Malondialdeído (MDA) e glutathiona total. O pré-tratamento com o leite, iogurte caprino ou sulfassalazina reduziu o escore do dano macroscópico ($p < 0,01$ vs. colítico), e melhorou significativamente a atividade de MPO ($p < 0,01$ vs. colítico), os níveis das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α ($p < 0,01$ vs. colítico) ($p < 0,01$ SAZ vs. LC, ICM e ICM/2x) e IL1- β ($p < 0,01$ vs. colítico). Também reduziu significativamente o estresse oxidativo, observado pela redução de MDA ($p < 0,01$ vs. colítico) ($p < 0,05$ LC vs. SAZ) e previniu a depleção de glutathiona ($p < 0,01$ vs. colítico) ($p < 0,01$ SAZ vs. LC, IC e ICM/2x). Este efeito também foi demonstrado pela preservação da citoarquitetura colônica, e diminuição da expressão de COX-2 ($p < 0,05$ vs. colítico) e iNOS ($p < 0,05$ vs. colítico). Concluiu-se que o leite de cabra, o iogurte caprino e a sulfassalazina exerceram efeito anti-inflamatório no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos. Portanto, estes produtos lácteos caprinos podem ser alternativas valiosas aos medicamentos tradicionais e um potencial alimento funcional para a prevenção da DII.

Palavras-chave: Leite de cabra. Probiótico. Iogurte. Mel. Alimento funcional. Colite

ABSTRACT

Goat milk is a highly nutritious food that provides therapeutic and dietary characteristics, being an excellent source for deriving products that has functional potential, whose nutritional benefits can be improved by enriching them with probiotic strains. Milk and dairy products can provide nutritional support for patients with intestinal inflammation. Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a debilitating and immunologically-mediated disease that leads to tissue destruction in the gastrointestinal tract, which comprises Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). This study aimed at evaluating the intestinal anti-inflammatory effect of goat milk and goat yogurt with addition of *Lactobacillus acidophilus*, with or without native bee honey (*Melipona scutellaris*), in rats with induced colitis. In the experiment female wistar rats (190 a 240 g), were randomized in 7 groups (n = 10): Non-colitic; Colitic; Goat milk (GM); Goat yogurt (without honey) (GY); Goat yogurt with honey (10%) (GYH); Goat yogurt with honey (10%) twice a day (GYH/2x), and Sulfasalazine (250 mg/kg) (SAZ). The animals received 1 ml of the product via gavage during 14 days. After this period, colitis was induced with acetic acid (0.5 mL of 10% v/v in 0.9% saline). Forty eight hours after inducing the colitis, the animals were euthanized. Were assessed the macroscopic and microscopic damage of colitis, inflammatory parameters, expressed by myeloperoxidase (MPO), Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , interleukin (IL)1- β , Cyclooxygenase (COX)-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and oxidative stress markers, such as malondialdehyde (MDA), and total glutathione. The pre-treatment with goat milk, goat yogurt or sulfasalazine resulted in a significant reduction of the macroscopic damage score ($p < 0.01$ vs. colitic group), and improved the MPO activity ($p < 0.01$ vs. colitic group), the levels of pro-inflammatory cytokines, TNF- α ($p < 0.01$ vs. colitic group) ($p < 0.01$ SAZ vs. LC, ICM e ICM/2x) and IL1- β ($p < 0.01$ vs. colitic group). It also promoted a significant reduction in oxidative stress that could be observed by the reduction in the MDA ($p < 0,01$ vs. colitic group) ($p < 0.05$ LC vs. SAZ) and the increase in the glutathione ($p < 0.01$ vs. colitic group) ($p < 0.01$ SAZ vs. LC, IC e ICM/2x). The benefits of the pre-treatments were also demonstrated by the preservation of the colonic cytoarchitecture, and the decreased expression of the COX-2 ($p < 0.05$ vs. colitic group) and the iNOS ($p < 0.05$ vs. colitic group). In conclusion, it was observed that goat milk, goat yogurt and sulfasalazine exerted anti-inflammatory effect on colitis model induced by acetic acid in rats. Therefore, these goat dairy products may be a valuable alternatives to traditional medications and a potential functional food for the prevention of IBD.

Keywords: goat milk, probiotic, yogurt, honey, functional food, colitis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA DISSERTAÇÃO

Figura 1 – Mecanismos de ação dos probióticos.....	24
Figura 2 – Doença de Crohn e Colite Ulcerativa.....	32
Figura 3 – Mapa Global da DII.....	33
Figura 4 – Respostas intestinais à flora intestinal durante a homeostase (intestino saudável) e DII.....	37
Figura 5 – Fluxograma de produção do iogurte caprino.....	43
Figura 6 – Desenho Experimental.....	44

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO

Figura 1 –	Efeito da administração do leite e iogurte caprino na atividade da MPO (A) e nos níveis de MDA (B) e Glutathione (C) na inflamação intestinal induzida com ácido acético.....	75
Figura 2 –	Efeito da administração do leite e iogurte caprino nos níveis de TNF- α (A)/ IL1- β (B) na inflamação intestinal induzida com ácido acético.....	76
Figura 3 –	Microfotografia de corte histológico examinado e corado com H/E, apresentando fragmento do cólon cortado no sentido longitudinal.....	77
Figura 4 –	(A) Efeito do leite e iogurte caprino sobre a COX-2/ (B) amostras representativas apresentadas em gráficos que resumem pontuação média do grupo, mostrando imunoreatividade a COX-2.....	78
Figura 5 –	(A) Efeito do leite e iogurte caprino sobre o iNOS/ (B) amostras representativas apresentadas em gráficos que resumem pontuação média do grupo, mostrando imunoreatividade a iNOS.....	79

LISTA DE QUADROS DA DISSERTAÇÃO

Quadro 1 –	Composição nutricional do leite humano, vaca, ovelha e cabra.....	18
Quadro 2 –	Valores médios das principais frações protéicas (g/100g de caseína total) em diferentes leites de mamíferos.....	20
Quadro 3 –	Micro-organismos utilizados como probióticos.....	23
Quadro 4 –	Requisitos para leites fermentados durante o período de validade.....	26
Quadro 5 –	Composição Química do Mel (em 100 g de mel).....	29
Quadro 6 –	Critérios de avaliação da gravidade para o dano macroscópico da colite.....	46

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1 – Efeito da administração do leite e iogurte caprino no dano macroscópico intestinal induzido com ácido acético.....	74
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Microlitro

μm - Micrômetro

AGCC – Ácido Graxo de Cadeia Curta

AGCM – Ácido Graxo de Cadeia Média

AGM – Ácido Graxo Monoinsaturado

AGPI – Ácido Graxo Poli-insaturado

BAL – Bactérias Ácido-láticas

CAA – Células Apresentadoras de Antígenos

CAPRIBOM – Cooperativa dos Produtores Rurais de Monteiro Ltda

CAT – Catalase

Cn – Caseína

cNOS – Óxido Nítrico Sintetase Constitutiva

COX – Ciclooxigenase

CT – Colesterol Total

CU – Colite Ulcerativa

DC – Doença de Crohn

DII – Doença Inflamatória Intestinal

eNOS – Óxido Nítrico Sintetase Endotelial

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

GO – Glutathione Oxidase

GR – Glutathione Redutase

GSH – Glutathione

GSSG – Glutathione Dissulfeto

GSH-Px – Glutathione Peroxidase

GST – Glutathione s-transferase

HDL-c – Colesterol HDL

HTAB – tampão brometo de hexadeciltrimetilamônio

IC – Iogurte Caprino sem Mel

ICM – Iogurte Caprino adicionado de Mel

ICM/2x – Iogurte Caprino adicionado de Mel (duas vezes ao dia)

IL – Interleucina

IFN – Interferon

IMC – Índice de Massa Corporal

iNOS – Óxido Nítrico Sintetase Induzida

IL-1Ra – Receptor Antagonista de IL-1

LC – Grupo Leite de Cabra

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDA – Malondialdeído

MPO – Mieloperoxidase

M-M1 – Macrófagos M1

M-M2 – Macrófagos M2

NADPH – fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidado

NF-kB – Fator Nuclear B

NOSs – Óxido Nítrico Sintetase

nNOS – Óxido Nítrico Sintetase neuronal

ON – Óxido Nítrico

PGE2 – Prostaglandina E2

RRP – Receptores de Reconhecimento Padrão

SOD – Superóxido dismutase

TCM – Triglicerídeo de Cadeia Média

TG – Triglicerídeos

TGI – Trato Gastrointestinal

Th – T-helper

TNBS – 2,4,6 – ácido trinitrobenzenosulfônico

TNF – Fator de Necrose Tumoral

Treg – T reguladora

UFC – Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 Leite de Cabra.....	18
2.1.1 Propriedades Terapêuticas do Leite de Cabra.....	20
2.2 Probióticos.....	22
2.2.1 Leites Fermentados.....	26
2.3 Mel.....	28
2.4 Doença Inflamatória Intestinal.....	31
2.4.1 Microbioma Intestinal.....	34
2.4.2 Barreira Intestinal.....	35
2.4.3 Sistema Imune.....	36
2.4.4 Estresse Oxidativo.....	40
2.4.5 Tratamento.....	41
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 Local de Execução.....	43
3.2 Leite de Cabra.....	43
3.3 Iogurte Caprino.....	43
3.4 Animais.....	44
3.5 Desenho Experimental.....	44
3.6 Indução da Colite.....	45
3.7 Parâmetros Avaliados.....	45
3.7.1 Parâmetros Murinométricos.....	45
3.7.2 Avaliação Bioquímica.....	46
3.7.3 Avaliação do Dano Intestinal.....	46
3.7.3.1 Avaliação Macroscópica do Cólon.....	46
3.7.3.2 Mensuração da Atividade de Mieloperoxidase.....	47
3.7.3.3 Determinação do Conteúdo de Malondialdeído.....	47
3.7.3.4 Determinação do Conteúdo de Glutathione Total.....	48
3.7.3.5 Dosagem de Citocinas – TNF- α e IL1- β	49
3.7.3.6 Análise Histológica.....	49
3.7.3.7 Análise Imunohistoquímica de COX-2 e iNOS.....	50

3.8 Análise Estatística.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
APÊNCIDE A – Outros resultados.....	62
APÊNDICE B – Artigo em Português: Atividade anti-inflamatória intestinal de leite de cabra e iogurte caprino em modelo de colite induzida com ácido acético em ratos.....	65
APÊNDICE C – Artigo em Inglês: Intestinal anti-inflammatory activity of goat milk and goat yogurt in the acetic acid model of rat colitis.....	88
ANEXO - Certidão - Comissão de Ética no Uso de Animais.....	110

1 INTRODUÇÃO

O leite e os produtos lácteos foram os pioneiros na área de alimentos funcionais, tendo em vista que o leite é uma fonte de importantes componentes com potencial aplicação funcional, portanto seu consumo vem sendo estimulado (SÁNCHEZ et al., 2009; ANNUNZIATA; VECCHIO, 2013). O leite de cabra apresenta propriedades nutricionais especiais que o torna atraente para muitos consumidores (EISSA; BABIKER; YAGOUB, 2011), incluindo glóbulos de gordura com diâmetros menores; maior conteúdo de ácidos graxos de cadeia curta na gordura do leite; maior teor de zinco, ferro e magnésio; sistema de lactoperoxidase forte, além de melhores características imunológicas e antibacterianas. (SLAČANAC et al., 2010). O consumo do leite de cabra também está associado a efeitos benéficos à saúde, além do seu valor nutritivo puro (SILANIKOVE et al., 2010), pode ser consumido como alternativa para o leite de vaca, por ser menos alergênico e possuir melhor digestibilidade (GARCÍA et al., 2014).

Os benefícios nutricionais dos produtos lácteos podem ser aprimorados enriquecendo-os com cepas probióticas (MUKDSI et al., 2013), representando uma opção tecnológica para a fabricação de novos alimentos lácteos funcionais (GOMES; MALCATA; KLAVER, 1998; SALVA et al., 2011), como é o caso dos produtos lácteos probióticos. Leites fermentados caprinos incorporando células probióticas vivas representam um grupo de produtos com grandes perspectivas no que diz respeito às suas propriedades funcionais e terapêuticas (SLAČANAC et al., 2010).

Os probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001). O *Lactobacillus acidophilus*, *rhannosus* e *casei* são as bactérias mais utilizadas nos alimentos funcionais (VIZZOTTO; KROLOW; TEIXEIRA, 2010). As bactérias probióticas são incorporadas, principalmente em produtos lácteos como queijos, sorvetes, sobremesas lácteas e iogurtes (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

O iogurte é conhecido por suas propriedades terapêuticas, nutricionais e sensoriais (GONZALEZ; ADHIKARI; SANCHO-MADRIZ, 2011), sendo considerado um produto lácteo fermentado que transporta bactérias viáveis com efeitos de promoção da saúde (MORELLI, 2014). O iogurte de leite de vaca é largamente consumido (RANADHEERA et al., 2012)., no entanto existe uma elevada demanda por alternativas para o leite de vaca, devido a problemas associados com alergenicidade, desordens gastrointestinais e desejos por novos produtos lácteos (HAENLEIN, 2004; RANADHEERA et al., 2012). O iogurte de cabra

é uma matriz adequada para inclusão de ingredientes como o mel (GARCÍA et al., 2014), tendo em vista que o mel apresenta propriedades benéficas, embora seja mais amplamente utilizado como adoçante, sendo este produto considerado um potencial ingrediente utilizado em diversos alimentos (VIUDA-MARTOS et al., 2008).

O leite e seus derivados podem prover o suporte nutricional necessário a pacientes com inflamação intestinal, visto que seus componentes apresentam efeitos benéficos à saúde gastrointestinal, podendo ser úteis como parte da alimentação (RUSS et al., 2010). A Doença Inflamatória do Intestino (DII) é uma doença crônica do trato digestivo, que usualmente se refere a Colite Ulcerativa (CU) e a Doença de Crohn (DC) (PERAN et al., 2007). A CU afeta o intestino grosso ao nível da mucosa, enquanto a DC é caracterizada pela inflamação transmural e pode envolver qualquer segmento do trato gastrintestinal (DADDAOUA et al., 2006). Viladomiu et al. (2013) afirmam que DII é uma doença debilitante e imunologicamente mediada, caracterizada por respostas inflamatórias excessivas e efetoras da mucosa que levam à destruição do tecido no trato gastrointestinal (TGI).

Diante do exposto, considerando a importância nutricional dos produtos lácteos, em particular do leite de cabra, bem como as propriedades funcionais dos probióticos e do mel, a realização do presente estudo surgiu a partir da necessidade de elucidar os possíveis efeitos da utilização destes três componentes, elaborando o iogurte caprino, adicionado de *Lactobacillus acidophilus* e mel, em ratas com colite induzida. Para tanto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito anti-inflamatório intestinal de leite e iogurte caprino, adicionado de *Lactobacillus acidophilus* e acrescido ou não mel de abelhas nativas (*Melipona scutellaris*), em ratas com colite induzida, avaliando os parâmetros murinométricos dos animais estudados, o perfil bioquímico dos animais inseridos no estudo, identificando o escore do dano intestinal do cólon relacionado à colite dos animais estudados, bem como, alterações morfológicas e ultraestruturais no tecido colônico, por meio de análises histopatológicas, dos animais em estudo, além de avaliar a concentração dos marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo no tecido colônico dos animais submetidos ao experimento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leite de Cabra

A produção de caprinos constitui uma parte importante da economia nacional em muitos países, especialmente na região do Mediterrâneo e do Oriente Médio, tendo uma importância particular na França, Itália, Espanha e Grécia (GARCÍA et al., 2014). De acordo com FAOSTAT (2013), a população de cabras no mundo aumentou cerca de 55%, a de bovinos creceu 9% e a de ovinos diminuiu em torno de 7% entre 1991 e 2011. A produção de leite de cabra aumentou cerca de 70% entre 1991 e 2011 (FAOSTAT, 2013).

Tradicionalmente, o leite caprino e bovino tem sido considerado um alimento fundamental na dieta de muitas culturas, sendo uma boa fonte de uma grande variedade de nutrientes essenciais como sais minerais, vitaminas e proteínas de fácil digestão, com perfis de aminoácidos equilibrados, importantes nas funções do corpo humano (SILANIKOVE et al., 2010). Assim como os grãos, carnes, legumes e frutas, os produtos lácteos são categorizados como alimentos ricos em nutrientes, sendo relevantes para a saúde ao longo do ciclo de vida (DREWNOWSKI; FULGONI, 2008).

A composição do leite de cabra varia de acordo com vários fatores, entre estes, a raça, dieta, período de lactação, ciclo estral, condições ambientais, estação do ano, alimentação, cuidados com animal, o estado fisiológico e de saúde do mesmo (JENNESS, 1980; JARDIM, 1984; SLAČANAC et al., 2010). Segundo Russ et al. (2010), o leite de ruminantes, comparado com o leite humano, tem menor teor de carboidrato e lactose, mais cinzas e proteínas, e variados níveis de gordura e água, dependendo da espécie, conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 – Composição nutricional do leite humano, vaca, ovelha e cabra

Componente (g/100g)	Humano	Vaca	Ovelha	Cabra
Água	87,5	88,3	80,7	87,0
Proteína	1,0	3,2	6,0	3,6
Gordura	4,4	3,3	7,0	4,1
Carboidrato	6,9	4,5	5,4	4,5
Cinzas	0,2	0,7	1,0	0,8
Energia (KJ)	291	252	451	288

FONTE: Adaptado de RUSS et al. (2010)

Slačanac et al. (2010) relatam que o leite caprino é um alimento nutricional e terapêutico que possui características únicas e benéficas que são superiores ao leite bovino, incluindo melhor digestibilidade; glóbulos de gordura com diâmetros menores; maior conteúdo de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) na gordura do leite; maior teor de zinco, ferro e magnésio; sistema de lactoperoxidase forte, além de melhores características imunológicas e antibacterianas.

Uma das vantagens nutricionais dos lipídios do leite caprino está na sua estrutura, tamanho e arranjo dos glóbulos de gordura, sendo estes de menor tamanho comparado ao do leite bovino e, os glóbulos de gordura de pequeno diâmetro permitem a melhor distribuição na emulsão dos lipídios lácteos em comparação com o leite bovino (ATTAIE; RICHTER, 2000). Além disso, o menor diâmetro dos glóbulos de gordura é um dos fatores que contribuem para a maior digestibilidade do leite de cabra em comparação com outros leites (PISANU et al., 2013). Em ambas as espécies, caprina e bovina, os glóbulos de gordura variam de 1 a 10 μm , mas o número de gotículas de gordura menores que 5 μm é aproximadamente 60% no leite de vaca enquanto que no leite de cabra é de aproximadamente 80% (SILANOKIVE et al., 2010).

Quanto aos ácidos graxos, o leite caprino apresenta elevados teores de AGCC e ácidos graxos de cadeia média (AGCM), além de ácidos graxos monoinsaturados (AGM), ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e triglicerídeos de cadeia média (TCM) que são conhecidos por serem benéficos à saúde humana, além de apresentar baixo teor de ácido graxo trans C18:1 (RUSS et al., 2010). Em adição, os AGCC, AGCM e TCM tem impacto tecnológico devido a sua influência no sabor e aroma dos produtos caprinos (PARK et al., 2007).

As proteínas do leite de cabra, por sua vez, possuem melhor digestibilidade do que as do leite bovino (PARK et al., 1994), sendo a classificação geral de proteínas do leite de cabra semelhante à do leite de vaca, no entanto, as primeiras diferem em polimorfismos, que são responsáveis por diferenças na digestibilidade, propriedades de fabricação do queijo e sabores de produtos lácteos caprinos (RUSS et al., 2010). O leite de cabra contém baixo teor de α_1 -caseína e elevados níveis de α_2 -caseína e β -caseína do que as presentes em leites bovinos e ovinos (TAMIME et al., 2011), além de quantidades aproximadamente iguais de frações de k-caseína (SLAČANAC et al., 2010), conforme apresentado no Quadro 2.

O leite caprino contém, ainda, imunoglobulinas IgG, IgA e IgM, bem como lactoferrina, transferrina e prolactina (PARK et al., 2007), além de elevados níveis de seis aminoácidos essenciais (treonina, isoleucina, lisina, cistina, tirosina, valina) (RUSS et al., 2010).

Quadro 2 – Valores médios das principais frações protéicas (g/100g de caseína total) em diferentes leites de mamíferos

Frações Protéicas de Caseínas (Cn)	Caprino	Ovino	Bovino
α_s -Cn ^a	26-30	31-51	48-49
α_{s1} -Cn	5	16	38
α_{s2} -Cn	25	15	10
β -Cn	50-64	39-47	33-39
k-Cn	10-20	7-10	11-13

FONTE: Adaptado de TAMIME et al. (2011)

^a Somatório das frações de α_{s1} - e α_{s2} -Cn

Silanikove et al. (2010) afirmam que a lactose é o principal carboidrato presente tanto no leite caprino como no leite bovino. No entanto, o teor de lactose no leite caprino é ligeiramente, mas não significativamente, menor do que no leite bovino (SLAČANAC et al., 2010), na média de 4,1% e 4,7%, respectivamente (SILANIKOVE et al., 2010)

O leite de cabra também é uma fonte natural de oligossacarídeos, contém entre 250 e 300 mg/L de oligossacarídeos, 4-5 vezes maior do que o conteúdo no leite de vaca e 10 vezes maior do que a de leite de ovelha, porém ainda é significativamente menor do que no leite materno humano, que possui o teor de 5-8 g/L (MARTINEZ-FEREZ et al., 2006).

Quanto aos teores de vitaminas e minerais, os leites dos mamíferos contém uma ampla gama desses nutrientes, que são adequados para o crescimento da cultura starter durante a fabricação de leites fermentados e queijos (TAMIME et al., 2011). No leite de cabra o conteúdo de minerais varia de 0,70 a 0,85% e contém teores mais elevados de cálcio, fósforo e potássio, comparados aos leites bovino e humano (SILANIKOVE et al., 2010). De acordo com Slačanac et al. (2010) o leite de cabra possui elevado teor de vitamina A, sendo mais branco do que o leite bovino, pois, as cabras convertem o β -caroteno dos alimentos em vitamina A.

2.1.1 Propriedades Terapêuticas do Leite de Cabra

O papel terapêutico mais significativo do leite caprino comparado com o leite bovino é o valor hipoalergênico (PARK 1994; SLAČANAC et al., 2010). Bevilacqua et al. (2001) sugeriram que a alergenicidade reduzida do leite de cabra pode estar diretamente relacionada

com os níveis mais baixos de α_1 -caseína. Cerca de 40 a 100% dos pacientes que são alérgicos às proteínas do leite bovino toleram o leite caprino (PARK, 1994), sendo que este último pode ser consumido como alternativa ao leite bovino (GARCÍA et al., 2014). Além disso, as proteínas do leite de cabra podem ser mais facilmente digeridas e, por este motivo, o leite caprino pode ser utilizado como um alimento alternativo para a dieta de pacientes com úlcera e colite ulcerativa (PARK 1994; SLAČANAC et al., 2010).

O teor elevado de AGCC, AGCM e TCM, assim como o menor diâmetro dos glóbulos de gordura do leite caprino, também tem importância terapêutica, tendo em vista a sua capacidade metabólica de fornecer energia diretamente, ao invés de serem depositados no tecido adiposo, bem como sua capacidade de diminuir o colesterol sérico e inibir a deposição de colesterol nos vasos sanguíneos (BABAYAN 1981; ALFERED et al., 2001; BOŽANIĆ et al., 2002; HAENLEIN, 2004; SLAČANAC et al., 2010). Têm sido utilizados em uma série de distúrbios clínicos, tais como a ressecção intestinal, síndromes de má absorção, hiperlipoproteínemia, desnutrição infantil, esteatorréia, cálculos biliares, entre outros (HAENLEIN, 2004).

O leite constitui-se uma boa fonte de antioxidantes, sendo o leite caprino particularmente elevado em cisteína (RUSS et al., 2010) e glutathione peroxidase, sendo este último, um ingrediente importante do leite, pois faz parte de um sistema de defesa contra micro-organismos indesejáveis (SLAČANAC et al. 2010).

Os oligossacarídeos do leite são considerados benéficos devido às suas propriedades prebiótica e anti-infecciosa (MARTINEZ-FEREZ et al., 2006). Os oligossacarídeos do leite de cabra possuem efeitos anti-inflamatórios em ratos com modelo experimental de colite, podendo ser utilizados no tratamento da DII (DADDAOUA et al., 2006; LARA-VILLOSLADA et al., 2006).

O leite e seus derivados podem prover o suporte nutricional necessário a pacientes com inflamação intestinal, visto que seus componentes apresentam efeitos benéficos na saúde gastrointestinal em crianças e adultos (RUSS et al., 2010). Pacientes com DII são aconselhados para retirarem leite de suas dietas, no entanto, tem sido sugerido que o leite possa ser tolerado por muitos pacientes com DII, e que, devido ao seu valor nutricional, os produtos lácteos podem ser úteis como parte da sua alimentação (MISHKIN, 1997; RUSS et al., 2010).

Os benefícios nutricionais dos produtos lácteos podem ser aprimorados enriquecendo-os com cepas probióticas (MUKDSI et al., 2013). Segundo García et al. (2014), a qualidade do leite de cabra pode ser definida como o seu potencial para tolerar diferentes tratamentos

tecnológicos, a fim de obter um produto com a capacidade de satisfazer a demanda dos consumidores em termos de saúde, valores nutricionais, segurança e atributos sensoriais.

2.2 Probióticos

Os probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, estimulando o crescimento de outros micro-organismos, modulando a mucosa e imunidade sistêmica, melhorando o equilíbrio nutricional e microbiano no trato intestinal (KOTZAMPASSI; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, 2012). Os probióticos consistem de bactérias ou leveduras que podem recolonizar e restaurar a simbiose da microflora intestinal (CHAUHAN; CHORAWALA, 2012).

Para que um micro-organismo seja considerado um probiótico, ele deve seguir a alguns critérios, dentre os quais estão: eles devem ser rigorosamente especificados nos níveis de gênero, espécie e da cepa; não serem patogênicas; serem capazes de sobreviver ao trânsito intestinal através do estômago e intestino delgado, para aderir à mucosa e colonizar o intestino; terem efeito cientificamente comprovado na promoção da saúde ou prevenção e tratamento de uma patologia específica (OREL; TROP, 2014), além de um número suficiente de micro-organismos viáveis devem estar presente durante toda a vida de prateleira do produto (SÁNCHEZ et al., 2009). Um produto lácteo deve conter, pelo menos, 10^6 UFC/ mL no momento de seu consumo (SHAH, 2000; PLESSAS et al., 2012) devendo estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis (ANVISA, 2008).

Segundo Sánchez et al. (2009), dentre os micro-organismos mais utilizados como probióticos estão algumas espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, no entanto outras espécies de bactérias e fungos podem ser utilizadas. Outras cepas probióticas promissoras incluem micro-organismos do gênero *Bacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Propionibacterium*, e a levedura do gênero *Saccharomyces* (CEAPA et al., 2013) (Quadro 3).

Segundo a alegação aprovada pela ANVISA (2008) para probióticos, os micro-organismos *Lactobacillus delbrueckii* (subespécie *bulgaricus*) e *Streptococcus salivarius* (subespécie *thermophilus*) foram retirados da lista, pois além de serem espécies necessárias para produção de iogurte, não possuem efeito probiótico cientificamente comprovado.

Quadro 3 – Micro-organismos utilizados como probióticos

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Outras bactérias ácido-láticas (BAL)	Outros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>cepa Nissle</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilis</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

FONTE: Adaptado de SAAD et al. (2013)

As bactérias mais utilizadas nos alimentos funcionais são *Lactobacillus acidophilus*, *rhamnosus* e *casei* (VIZZOTTO; KROLOW; TEIXEIRA, 2010). O *Lactobacillus acidophilus* são bactérias gram-positivas, não formadoras de esporos, com as extremidades arredondadas que ocorrem isoladamente, em pares e em cadeias curtas (GOPAL, 2011). De acordo com o mesmo autor, o grupo de *Lactobacillus acidophilus* contém *lactobacillus* obrigatoriamente homofermentativos, mas alguns são heterofermentativos facultativos.

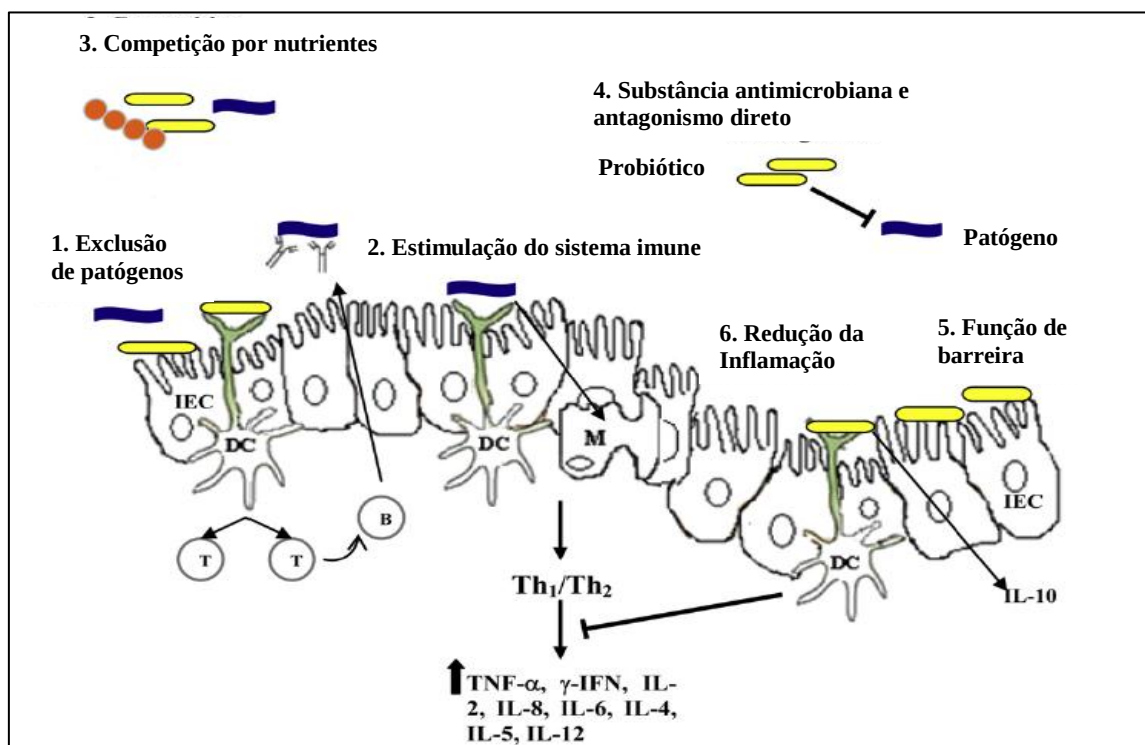
Dentre as bactérias ácido-láticas (BAL), o *Lactobacillus acidophilus* é considerado um micro-organismo com potencial probiótico, sendo utilizado pela indústria de laticínios na elaboração de vários produtos como suplementos alimentares, suspensões orais, comprimidos, iogurtes, leites fermentados, no tratamento e prevenção de doenças como efeito anticarcinogênico, no estímulo do sistema imunológico, sendo também capazes de tolerar a acidez do suco gástrico, quando comparados a outras espécies de *Lactobacillus* (GUEDES NETO, 2002; CHIODA et al., 2007).

Para exercerem seus efeitos de promoção da saúde, os probióticos, após a ingestão, devem superar barreiras biológicas presentes no TGI, tais como as enzimas digestivas, o pH ácido do estômago e a bile, para então alcançarem o intestino delgado e cólon (SÁNCHEZ et al., 2009; CIORBA, 2012). O uso de probióticos tem demonstrado promover benefícios à saúde em diversas patologias como a DII, câncer de cólon, infecção por *Helicobacter pylori*, doenças de fígado (SAAD et al., 2013), intolerância à lactose, doença intestinal pediátrica, reações alérgicas a alimentação, atividade imunomodulatória, efeitos hipocolesterolêmicos,

atividades anticarcinogênica, antigenotóxica e antimutagênica (CHAUHAN; CHORAWALA, 2012), além de constipação e diarreia (SÁNCHEZ et al., 2009).

Os mecanismos de ação dos probióticos ainda não estão completamente eluciados (GARDLIK; PALFFY; CELEC, 2012). No entanto, têm sido propostos mecanismos pelo qual os probióticos podem melhorar a saúde intestinal (Figura 1), incluindo a competição por nutrientes limitados, a inibição da aderência e da mucosa epitelial dos agentes patogênicos, a inibição da invasão por patógenos no epitélio, a produção de substâncias antimicrobianas e/ou a estimulação da imunidade da mucosa (SERVIN; COCONNIER, 2003).

Figura 1- Mecanismos de ação dos probióticos



IEC: Células do epitélio intestinal; DC: Dendritic cells (CD: Células Dendríticas); IL: Interleucina; TNF: Fator de Necrose Tumoral; IFN: Interferon; M: Células M intestinal.

FONTE: Adaptado de SAAD et al. (2013).

De acordo com Kotzampassi e Giamarellos-bourboulis (2012), as bactérias probióticas podem antagonizar comensais e/ou bactérias patogênicas pela produção de substâncias inibidoras, bloqueando sites de adesão, apresentando efeitos anti-invasivos e antitoxina e, ainda, competindo por recursos limitados (Figura 1.1; 1.3) Carmen et al. (2011) afirmam ainda que o microbioma intestinal pode antagonizar bactérias patogênicas, proporcionando um ambiente fisiológico restritivo, inibindo a adesão e translocação bacteriana, ou a produção

de substâncias antibacterianas e defensinas (Figura 1.4) A produção de substâncias antibacterianas, como as bacteriocinas, produzidas por *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., inibem o crescimento de outros lactobacilos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como bolores e leveduras (KOTZAMPASSI; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, 2012).

Outro mecanismo de ação dos probióticos proposto é a função de barreira (Figura 1.5), proporcionando a homeostase das células epiteliais, melhorando a sobrevivência das células e aumentando a produção de muco (CIORBA, 2012). Em adição, Kotzampassi e Giamarellos-bourboulis (2012) afirmam que os probióticos podem melhorar a barreira da mucosa do intestino pelo o aumento de glicosilação das células epiteliais, a produção de IgA segregado (sIgA) e a produção de AGCC.

Os probióticos podem atuar sobre o sistema imune do intestino (Figura 1.2), eles atravessam a barreira epitelial e modulam a resposta inata e adquirida (GOURBEYRE; DENERY; BODINIER, 2011). Modulam o sistema imune intestinal através da redução de citocinas pró-inflamatórias, promovendo vias regulatórias e aumentando a secreção de IgA (CIORBA, 2012). Estudo realizado por Peña e Versalovic (2003), mostrou que o *L. rhamnosus* GG inibiu a produção TNF- α pelos macrófagos.

As bactérias probióticas podem atuar no processo inflamatório (Figura 1.6) pela estabilização do ambiente microbiano intestinal e a permeabilidade da barreira intestinal e reforçando a degradação dos antígenos enterais e alterando a sua imunogenicidade (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004; CARMEN et al., 2011). Foi relatado que o *L. reuteri* pode ser usado para prevenir a colite em ratos, aumentando o número de BAL no TGI (MADSEN et al., 1999). Peran et al. (2007) observaram que três probióticos (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*) apresentaram atividade anti-inflamatória em ratos com colite induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzonosulfônico (TNBS), podendo, portanto, serem utilizados como um potencial adjuvante no tratamento de DII.

Carmen et al. (2011) afirmam que outro mecanismo pelo qual as BAL podem prevenir a inflamação é através da expressão de enzimas antioxidantes, que podem degradar as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) ou impedir sua formação. Gardlik, Palffy e Celec (2012) observaram que a terapia com probióticos reduziu o estresse oxidativo em ratos com modelo experimental de colite. Amaretti et al. (2013) afirmam ainda que cepas probióticas, que são capazes de limitar a excessiva quantidade de radicais reativos *in vivo*, podem contribuir para prevenir e controlar diversas doenças associadas com o estresse oxidativo. As

atividades metabólicas probióticas podem ter um efeito antioxidante através da limpeza de compostos oxidantes ou da prevenção da sua geração no intestino (AZCÁRATE-PERIL; SIKES; BRUNO-BÁRCENA, 2011; AMARETTI et al., 2013).

Os probióticos podem ser usados na prevenção ou tratamento da DII, podendo ser usados como uma terapia adjuvante com os tratamentos convencionais (CARMEN et al., 2011).

2.2.1 Leites Fermentados

As bactérias probióticas são incorporadas, principalmente em produtos lácteos como queijos, iogurtes, sorvetes e outras sobremesas lácteas (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010) e são considerados um veículo ideal para o fornecimento de probióticos ao TGI (ROSS et al., 2002; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

De acordo com a Resolução nº 5 de 13/11/2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), leites fermentados são os produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácteos próprios. Ainda segundo a Resolução do MAPA, os leites fermentados deverão cumprir os requisitos considerados no Quadro 4, durante seu período de validade.

Quadro 4 – Requisitos para leites fermentados durante o período de validade

Produto	Contagem de BAL totais (ufc/g) Norma FIL 117^a: 1988	Contagem de leveduras específicas (ufc/g) Norma FIL 94 B: 1990
Iogurte	Min. 10^7 (*)	-
Leite cultivado ou fermentado	Mín. 10^6 (*)	-
Leite acidófilo ou acidofilado	Min. 10^7	-
Kefir	Min. 10^7	Min. 10^4
Kumys	Min. 10^7	Min. 10^4
Coalhada	Min. 10^6	-

FONTE: RESULUÇÃO nº 5 de 13/11/2000 do MAPA.

Segundo Sánchez et al. (2009), os produtos lácteos fermentados são utilizados para restaurar a saúde da flora intestinal. Em adição, tem-se aumentado o uso dos probióticos, que são capazes de exercer efeitos benéficos sobre a composição do microbioma intestinal (GARCIA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012).

Leites fermentados contendo bactérias probióticas são relatados por terem capacidade imunomodulatória e atividade anti-inflamatória (PERDIGÓN et al., 1999; CARMEN et al., 2011), sendo candidatos ideais para a prevenção e/ ou tratamento de inflamações intestinais (CARMEN et al., 2011). Em adição, leite de soja fermentado com cepas probióticas apresentaram efeitos antioxidantes (WANG; YU; CHOU, 2006).

A Resolução nº 5 de 13/11/2000 do (MAPA) afirma que o iogurte é um leite fermentado, cuja fermentação se realiza com cultivos protosimbóticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaris*, que podem-se acompanhar, de forma complementar, outras BAL que, por sua atividade contribuem para a determinação das características finais ao produto.

O iogurte oferece ao consumidor mais do que ingredientes convencionais (POSECION et al., 2005), é considerado um produto lácteo fermentado que transporta bactérias viáveis com efeitos de promoção da saúde (MORELLI, 2014). Os iogurtes que contém espécies de *L. acidophilus* e/ou *Bifidobacterium* são amplamente comercializados (RANADHEERA, 2010).

O iogurte é conhecido por suas propriedades terapêutica, nutricional e sensorial (GONZALEZ; ADHIKARI; SANCHO-MADRIZ, 2011). De acordo com LeBlanc e Perdigon (2010), o iogurte modula a resposta imune pela estimulação da produção de citocinas e regulando esta produção, a fim de evitar uma exacerbação da resposta imune inflamatória.

Estudo realizado por LeBlanc, Chaves e Perdigon (2009) mostrou que a administração de iogurte convencional, antes e depois da inoculação com TNBS, exerceu efeito anti-inflamatório, reduzindo o dano colônico, aumentando os níveis de IL-10 no tecido intestinal, enquanto que houve diminuição nos níveis de IL-17 e IL-12. De acordo com os mesmo autores, o efeito protetor do iogurte pode ser mediado através de mudanças no microbioma intestinal, aumentando nas populações de lactobacilus e bifidobactérias. Gobbato, Rachid e Perdigon (2008) em seu estudo demonstraram o efeito anti-inflamatório do iogurte em modelo experimental de DII induzida com TNBS, pelo aumento do número de células IgA, diminuindo a população de CD8+ e pela indução da apoptose de células infiltradas no intestino grosso. Outro estudo realizado por Chaves, Perdigon e LeBlanc (2011) mostrou que a administração do iogurte na fase de remissão preveniu a recorrência da inflamação, pelo aumento dos níveis de IL-10 e mudanças no microbioma intestinal.

O iogurte de leite de vaca é largamente consumido (RANADHEERA et al., 2012), no entanto existe uma elevada demanda por alternativas para o leite de vaca, devido a problemas associados com alergenicidade, desordens gastrointestinais e desejos por novos produtos lácteos (HAENLEIN, 2004; RANADHEERA et al., 2012). Leites fermentados caprinos

incorporando células probióticas vivas representam um grupo de produtos com grandes perspectivas no que diz respeito às suas propriedades funcionais e terapêuticas (SLAČANAC et al., 2010).

García et al. (2014) afirmam que o iogurte de cabra é uma matriz adequada para inclusão de ingredientes como frutas cristalizadas, geléias, mel, nozes, que são muito bem aceitos pelos consumidores.

2.3 Mel

O mel pode ser definido como uma mistura de açúcares preparada pelas abelhas, a partir do néctar, obtido de flores e outras secreções de plantas, podendo ser unifloral, quando é coletado da mesma fonte vegetal, como também multifloral, quando coletado de fontes vegetais diversas (SUBRAHMANYAM, 2007). O mel natural é um alimento conhecido por seu valor terapêutico e tem sido utilizado na medicina tradicional pelo mundo (HUSSEIN et al., 2012), embora seja mais utilizado como adoçante (VIUDA-MARTOS et al., 2008). Apresenta-se como um alimento funcional prebiótico devido à presença de fruto-oligossacarídeos em sua composição (ANJO, 2004; VIZZOTTO et al., 2010).

A cor do mel coletado pelas abelhas geralmente varia de água branca até âmbar escuro, dependendo da fonte vegetal e do conteúdo de minerais (KHALIL; SULAIMAN; BOUKRAA, 2010). Segundo os mesmos autores citados, o *flavor* do mel depende da cor, em geral, quanto mais escuro o mel, melhor o flavor e a qualidade. Em adição, Bogdanov et al. (2008), afirmam que o aroma do mel depende do conteúdo de ácidos e aminoácidos presentes, bem como o mel com maior teor de frutose é mais doce do que aquele que possui uma maior concentração de glicose.

A composição do mel é variável, dependendo da fonte vegetal, das condições ambientais e sazonais, processamento e outros fatores externos (ALVAREZ-SUAREZ; GIAMPIERI; BATTINO, 2013). De acordo com os autores supracitados, o mel representa uma fonte interessante de macro e micronutrientes, contém aproximadamente 180 compostos, como açúcares, proteínas, aminoácidos livres, vitaminas, enzimas, assim como uma variedade de polifenólicos. O Quadro 5 apresenta a composição química do mel.

O mel é composto, principalmente, de água e açúcares (KHALIL; SULAIMAN; BOUKRAA, 2010), sendo que os carboidratos representam 95% do seu peso seco, sendo a frutose e a glicose os principais carboidratos encontrados (ÁLVAREZ-SUAREZ; GIAMPIERI; BATTINO, 2013). Os mesmo autores afirma que o mel apresenta um conteúdo

variável de minerais, representando aproximadamente 0,2% do peso seco, e que variam de acordo com a região geográfica, tipo de solo e a origem floral e, o teor de vitaminas presentes no mel é baixo. O mel é composto também por proteínas, principalmente enzimas e aminoácidos livres, sendo que as três principais enzimas são a invertase, diastase e a glicose oxidase (BOGDANOV et al., 2008).

Quadro 5 – Composição química do mel (em 100 g de mel)

Principais componentes e Carboidratos		Conteúdo de Minerais		Conteúdo de Vitaminas	
Água (g)	17.1	Cálcio (mg)	4.4-9.20	Ácido ascórbico (C) (mg)	2.2-2.4
Energia (kcal)	304	Potássio (mg)	13.2-16.8	Tiamina (mg)	<0.006
Carboidratos (total) (g)	82.4	Cobre (mg)	0.003-0.10	Riboflavina (mg)	<0.06
Frutose (g)	38.5	Ferro (mg)	0.06-1.5	Niacina (mg)	<0.36
Glicose (g)	31.0	Magnésio (mg)	1.2-3.50	Ácido pantotênico (mg)	<0.11
Maltose (g)	7.20	Manganês (mg)	0.02-0.4	Piridoxina (mg)	<0.32
Sacarose (g)	1.50	Fósforo (mg)	1.9-6.30		
Proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais (g)	0.50	Sódio (mg)	0.0-7.60		
		Zinco (mg)	0.03-0.4		
		Selênio (µg)	1.0-2.91		

FONTE: Adaptado de ÁLVAREZ-SUAREZ; GIAMPIERI; BATTINO (2013).

Uma variedade de compostos fitoquímicos também estão presentes no mel, sendo os polifenóis e ácidos fenólicos a principal classe de compostos fenólicos (ÁLVAREZ-SUAREZ; GIAMPIERI; BATTINO, 2013). Segundo Khalil, Sulaiman e Boukaa (2010), a presença destes compostos varia de acordo com as condições climáticas e geográficas. Os fitoquímicos fenólicos são o maior grupo de fitoquímicos presentes nas plantas e são incorporados ao mel via néctar/pólen de plantas, quando visitadas pelas abelhas (ÁLVAREZ-SUAREZ; GIAMPIERI; BATTINO, 2013).

O mel é importante não apenas por suas propriedades nutricionais, mas também por suas propriedades funcionais e biológicas, atribuídas principalmente a presença dos compostos fenólicos, bem como dos flavonóides (VIUDA-MARTOS et al., 2008).

Diversos artigos de revisão tem mostrado que o mel apresenta propriedades antimicrobinas, antitumoral e anticancerígena (BOGDANOV et al., 2008; ÁLVAREZ-

SUAREZ; GIAMPIERI; BATTINO, 2013; ISRAILI, 2013), anti-inflamatória (BOGDANOV et al., 2008; VIUDA-MARTOS et al., 2008; EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012), antioxidante (BOGDANOV et al., 2008; VIUDA-MARTOS, et al. 2008; EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012; ÁLVAREZ-SUAREZ; GIAMPIERI; BATTINO, 2013; KHALIL; SULAIMAN; BOUKRAA, 2010), atividade imunossupressiva (BOGDANOV et al., 2008), antiulcerosa (VIUDA-MARTOS et al., 2008), além de afetar positivamente os fatores para doença cardiovascular e a resposta glicêmica (ÁLVAREZ-SUAREZ; GIAMPIERI; BATTINO, 2013) e inibir o escurecimento enzimático em frutas e vegetais (VIUDA-MARTOS et al., 2008).

Dentre estas propriedades, de acordo com Viuda-martos et al. (2008), o mel e seus derivados podem ser usados como alimentos funcionais devido a seu elevado potencial antioxidante natural. Tal propriedade tem sido associada com a capacidade de reduzir as reações oxidativas nos sistemas alimentares, resultando em um atrativo benéfico para a saúde humana (ÁLVAREZ-SUAREZ; GIAMPIERI; BATTINO, 2013). De acordo com os mesmos autores, a capacidade antioxidante tem sido proposta como um indicador da presença de compostos bioativos benéficos no mel. Khalil, Sulaiman e Boukraa (2010) afirmam que além dos compostos fenólicos encontrados no mel, a vitamina C e as enzimas também desempenham atividade antioxidante.

O controle de radicais livres pelo mel limita o dano e, conseqüentemente, a disfunção de vários órgãos (SUBRAHMANYAM, 2007). Erejuwa, Sulaiman e Wahab (2012), em sua revisão, mostraram que em diversos estudos *in vivo* realizados indicaram que o mel pode melhorar o estresse oxidativo no TGI, fígado, pâncreas, rim, órgãos reprodutivos e nos fluidos sanguíneos. Em um modelo experimental de ratos com colite induzida com TNBS, mostrou que o mel foi eficaz contra dano colônico, restaurou a peroxidação lipídica e melhorou os parâmetros antioxidantes (PRAKASH et al., 2008). Outro estudo realizado por Mahgoub et al. (2002) mostrou que o mel foi eficaz contra o dano colônico, reduziu as concentrações de glutathione e catalase e restaurou o Malondialdeído (MDA) a níveis normais, em ratos com colite induzida com ácido acético.

Assim com o estresse oxidativo, a inflamação é uma manifestação frequente com um papel importante na etiologia de muitas patologias (EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2012). Bogdanov et al. (2008), em seu artigo de revisão, mostraram que em estudos *in vivo* o mel tem apresentado atividade anti-inflamatória. Bilzel et al. (2002) observaram que o mel foi eficaz em um modelo experimental de ratos com colite, reduzindo significativamente a atividade de MPO, sendo que o mecanismo proposto foi impedindo a formação de radicais

livres no tecido inflamado e, a redução da inflamação pode ter sido devido ao efeito antibacteriano ou anti-inflamatório direto do mel. Outro estudo realizado por Owoyele, Adenekan e Soladoye (2011) que investigou os efeitos do mel nas inflamações aguda e crônica e a produção de ON (Óxido Nítrico) em ratos, observou-se que o mel tem atividade anti-inflamatória, podendo ser parcialmente decorrente da inibição da liberação de ON. Hussein et al. (2012) observaram que o mel apresentou efeito anti-inflamatório em ratos com inflamação induzida, reduzindo o tamanho do edema da pata e inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Devido às propriedades e benefícios apresentados pelo mel, este produto pode ser considerado como um potencial ingrediente em diversos alimentos (VIUDA-MARTOS et al., 2008).

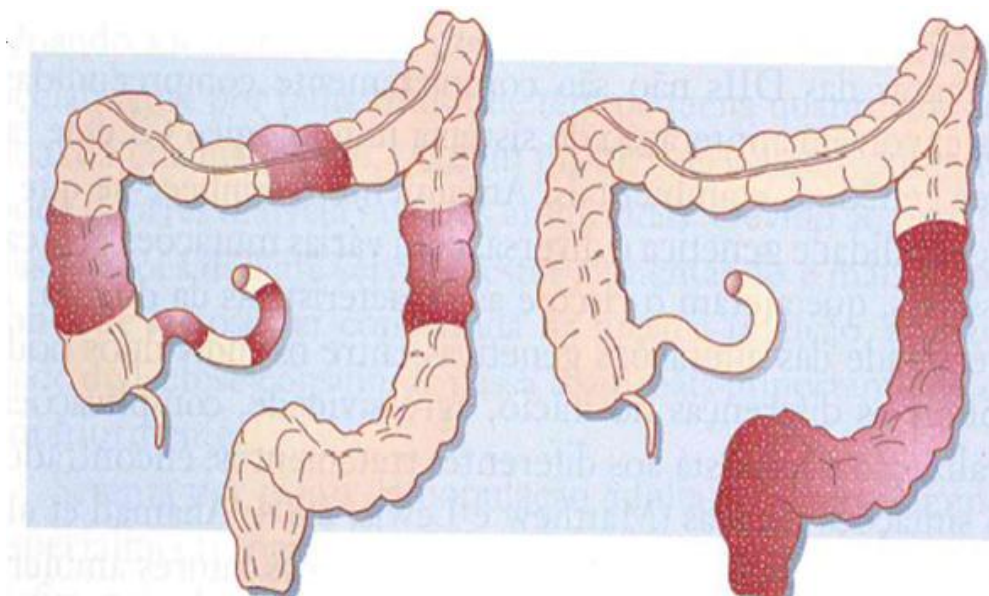
2.4 Doença Inflamatória Intestinal

A DII compreende a DC e a CU e, refere-se a uma doença crônica do trato digestivo, caracterizada por inflamação reincidente, crônica e espontânea (ALGIERI et al., 2013). É um termo utilizado para descrever diversas condições que resulta na inflamação do intestino delgado e/ou grosso (DODDA; CHHAJED; MISHRA, 2014). Viladomiu et al. (2013) afirmam ainda que DII é uma doença debilitante e imunologicamente mediada, caracterizada por respostas inflamatórias excessivas e efetoras da mucosa que levam à destruição do tecido no TGI.

A DC e CU diferem nas regiões do intestino que são afetadas, a profundidade com que a inflamação se estende ao longo da parede intestinal e o padrão das lesões (RUSS, 2013). Na DC, todas as camadas do intestino podem estar envolvidas, no entanto partes saudáveis podem ser encontradas entre as seções do intestino doente (LAKHAN; KIRCHGESSNER, 2010), enquanto que a CU afeta a mucosa e a submucosa do cólon e reto (AWAAD; EL-MELIGY; SOLIMAN, 2013), conforme pode ser observado na Figura 2.

A DII é uma das causas comuns para morbidade e tem um impacto severo na qualidade de vida da população acometida por esta patologia (IOANNIDIS et al., 2011). A DC e a CU são patologias incuráveis, que começam na idade adulta jovem e continuam ao longo da vida (COSNES et al. 2011). Ainda, Dodda, Chhajed e Mishra (2014) afirmam que a DII afeta de igual modo homens e mulheres, sendo a maioria dos casos diagnosticados em adolescentes e adultos jovens de 10-30 anos de idade. O aumento da prevalência de CU contribui para o risco de desenvolvimento de câncer coloretal (SUNG; PARK, 2013).

Figura 2 – Doença de Crohn (esquerda) e Colite Ulcerativa (direita)

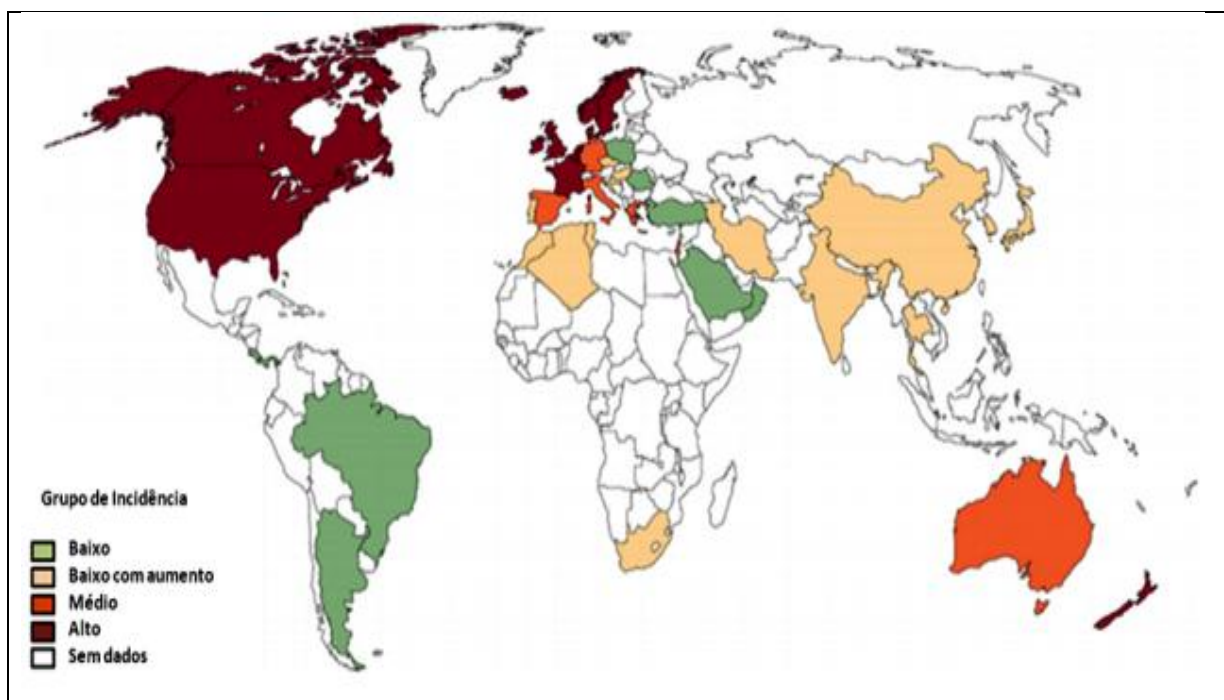


FONTE: BEYER. In: MAHAN; ESCOTT-STUMP (2010), com adaptação de COTRAM KS, KUMAR V, ROBBINS SI: Robbins and Cotran pathologic basis of disease, ed 7, Philadelphia, 2005, Saunders.

Segundo Cosnes et al. (2011), a incidência global da DII pode ser dividida em regiões geográficas: regiões com uma incidência elevada, com incidência moderada, com baixa incidência há 15 anos atrás, mas que tem aumentado constantemente, e as regiões com incidência desconhecida (Figura 3). Ainda de acordo com o mesmo autor, as regiões com incidências elevadas podem indicar fatores etiológicos comuns, enquanto que na África e na América Central e do Sul, os dados não estão disponíveis ou são escassos. Em adição, a maior incidência e prevalência da DII podem ser observadas no norte da Europa e América do Norte e mais baixa na Ásia (AHUJA; TANDON, 2010; DANESE; FIOCCHI, 2011). O estilo de vida ocidentalizado está ligado ao aparecimento de DII, sendo associado com o tabagismo, dietas ricas em gordura e açúcar, uso de medicamentos, estresse e alto nível socioeconômico (DANESE; FIOCCHI, 2011).

A CU é a forma mais comum de DII, a incidência da CU é de 1,2 para 20,3 casos/ 100,000 pessoas no ano, com prevalência de 7,6 para 246,0 casos/ 100,000 por ano, enquanto que a incidência da DC é de 0,03 para 15,6 casos e prevalência de 3,6 para 214,0 casos/ 100,000 por ano (DANESE; FIOCCHI, 2011).

Figura 3 - Mapa global da DII



Vermelho: incidência anual superior a $10/10^5$; Laranja: incidência de $5-10/10^5$; Verde: incidência inferior a $4/10^5$; Amarelo: baixa incidência que está aumentando continuamente; Ausência de cor: ausência de dados.

FONTE: Adaptado de COSNES et al. (2011).

De acordo com Lakhan e Kirchgessner (2010), quando o intestino está inflamado, ocorre um desarranjo da função da barreira intestinal, secreção anormal, mudanças nos padrões de motilidade e sensibilidade visceral, que contribui para a geração dos sintomas. A DC e a CU compartilham de alguns sintomas clínicos, incluindo a diarreia, sangramento, sendo este mais comum na CU, além de febre, perda de peso, anemia, intolerâncias alimentares, desnutrição, deficiência de crescimento e manifestações extraintestinais, como dermatológicas, hepáticas e artrites (BEYER, 2010). Na CU, as manifestações extraintestinais ocorrem de acordo com a evolução da doença; nos casos leves a moderados, as manifestações extraintestinais são menos frequentes, enquanto que nos quadros severos, acontecem em 20 a 30% dos casos (CONSENSUS GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE, 2010).

Os sinais clínicos da CU podem ser leves, quando pacientes apresentam menos de quatro evacuações por dia, com ou sem sangue, sem perturbação sistêmica e taxa de sedimentação de eritrócitos normais; moderados, onde ocorrem mais de quatro evacuações por dia com perturbação sistêmica mínima; e graves, quando os indivíduos apresentam mais de seis evacuações por dia, com a presença de sangue nas fezes, além de evidência de perturbação

sistêmica, como febre, taquicardia, anemia ou taxa de sedimentação de eritrócitos maior do que 30 (AWAAD; EL-MELIGY; SOLIMAN, 2013).

A etiologia da DII ainda não está totalmente elucidada, no entanto Strober, Fuss e Mannon (2007) afirmam que parece estar relacionada, provavelmente, com uma combinação de fatores genéticos e ambientais, em que ocorre uma resposta imune exacerbada anormal do intestino. Isto resulta, segundo Strober e Fuss (2011) no aumento da síntese e liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, incluindo EROs, metabólitos de nitrogênio, os eicosanóides, quimiocinas e citocinas, que contribuem para perpetuar a resposta inflamatória no intestino. Somando-se a isso, Ardizzone e Bianchi Porro (2005) sugerem que desequilíbrios nas citocinas pró-inflamatórias tais como o Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α , o Interferon (IFN)- γ , a Interleucina (IL)-1, IL-6 e IL-12 e citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e IL-11 desempenham um papel central na mediação e modulação da inflamação.

A patogênese da DII inclui distúrbios da imunomodulação da mucosa intestinal, que leva à lesões das células epiteliais causadas pelas células T ativadas e macrófagos mononucleares e, há uma série de indicações sobre o papel crucial da microflora intestinal e distúrbios intestinais da mucosa (IONNIDIS et al., 2011).

Strober, Fuss e Mannon (2007) concluíram que a DII caracteriza-se por uma resposta imunológica anormal da mucosa, mas que os fatores microbianos e anormalidades de células epiteliais podem facilitar esta resposta.

2.4.1 Microbioma Intestinal

O microbioma intestinal é composto por micro-organismos que habitam o intestino e a sua interação com hospedeiro pode ser benéfica ou maléfica (ABRAHAM; CHO, 2009). O intestino humano normalmente abriga cerca de 10^{14} organismos bacterianos de até 1.000 espécies diferentes (OREL; TROP, 2014). O intestino grosso do ser humano contém, aproximadamente, uma concentração de 10^{11} – 10^{12} micro-organismos/ grama de lúmen intestinal (SUNG; PARK, 2013).

Em condições normais, muitos mecanismos protegem o epitélio intestinal contra a invasão microbiana, porém estímulos ambientais combinados com fatores genéticos podem facilitar a proliferação de microflora prejudicial e induzir respostas imunitárias anormais que rompem a barreira mucosa, causando inflamação (SUNG; PARK, 2013). Somando-se a isso, Hisamatsu et al. (2013), afirmam que a simbiose de micro-organismos comensais contribui

para a homeostase imunológica intestinal e proteção contra patógenos, enquanto disbiose de bactérias comensais induz respostas imunológicas anormais e causa inflamação intestinal.

Segundo Orel e Trop (2014), quatro mecanismos têm sido propostos que podem levar à respostas imunológicas patogênicas para antígenos microbianos luminal: patógenos microbianos que induzem a inflamação intestinal, disbiose do microbioma comensal com uma diminuição da proporção de espécies bacterianas proteção/agressivas, defeitos genéticos no hospedeiro para conter o microbioma comensal, e defeito na imunorregulação do hospedeiro.

2.4.2 Barreira Intestinal

O epitélio do intestino associado com o sistema gastrointestinal desempenha um papel fundamental na formação da resposta imune da mucosa, sendo as células epiteliais do intestino uma barreira física contra a entrada excessiva de bactérias e outros antígenos do lúmen intestinal na circulação (ABRAHAM; CHO, 2009). As bactérias patogênicas possuem a característica de invadir e induzir as respostas inflamatórias no epitélio (SANSONETTI, 2008).

Segundo Sung e Park (2013) o epitélio intestinal possui múltiplos sistemas de defesa que protegem o hospedeiro contra as bactérias patogênicas, deste modo, as células epiteliais do intestino são recobertas por glicoproteínas e, as junções estreitas de proteínas selam o espaço entre as células epiteliais; a camada sub-epitelial, abaixo das células epiteliais, contém células apresentadoras de antígenos (CAA) e, por baixo estão as placas de Peyer, onde estão os folículos das células B e as células T; a invasão bacteriana é reconhecida pelos receptores de reconhecimento padrão (RRP) na membrana das células epiteliais do intestino, e os RRP primários são receptores chamados Toll-like; o reconhecimento de bactérias se dá por meio da comunicação entre RRP e os componentes microbianos, tais como lipopolissacarídeos, que é seguido por respostas imunes para destruir os patógenos invasores.

Turner (2006) relata que uma barreira intacta depende de junções intercelulares, que ajudam a vedar o espaço entre as células epiteliais e as junções estreitas, entretanto na DII, a regulação das junções estreitas é defeituosa e o espaço entre as células epiteliais tem a permeabilidade aumentada.

As células epiteliais especializadas, como as células de Goblet e as células de Paneth, constituem uma defesa adicional contra a invasão bacteriana (ABRAHAM; CHO 2009). As células de Paneth são as maiores produtoras de peptídeos e proteínas com atividade antimicrobiana no intestino, sendo os mais abundantes e diversos as chamadas defensinas

(DANN; ECKMANN, 2007), como a α -defensins (ABRAHAM; CHO 2009), enquanto que as células de Globet regulam a produção de muco e dos fatores que contribuem para o reparo epitelial e a regulação da inflamação (TAUPIN; PODOLSKY, 2003; MCVAY et al., 2006; ABRAHAM; CHO, 2009). Na DII, a resposta inflamatória resulta, frequentemente, em lesão contínua do epitélio, o que provoca erosões, ulcerações, e uma diminuição na produção de defensinas (WEHKAMP et al., 2005; SIMMS et al., 2008; ABRAHAM; CHO, 2009). De acordo com Abraham e Cho (2009), o resultado é um aumento da exposição ao microbioma intestinal e a amplificação do processo inflamatório.

Sung e Park (2013) afirmam que o epitélio intestinal consegue distinguir o parasita da bactéria patogênica, o que é importante, pois o intestino requer uma relação simbiótica com o parasita, sem respostas imunes.

2.4.3 Sistema Imune

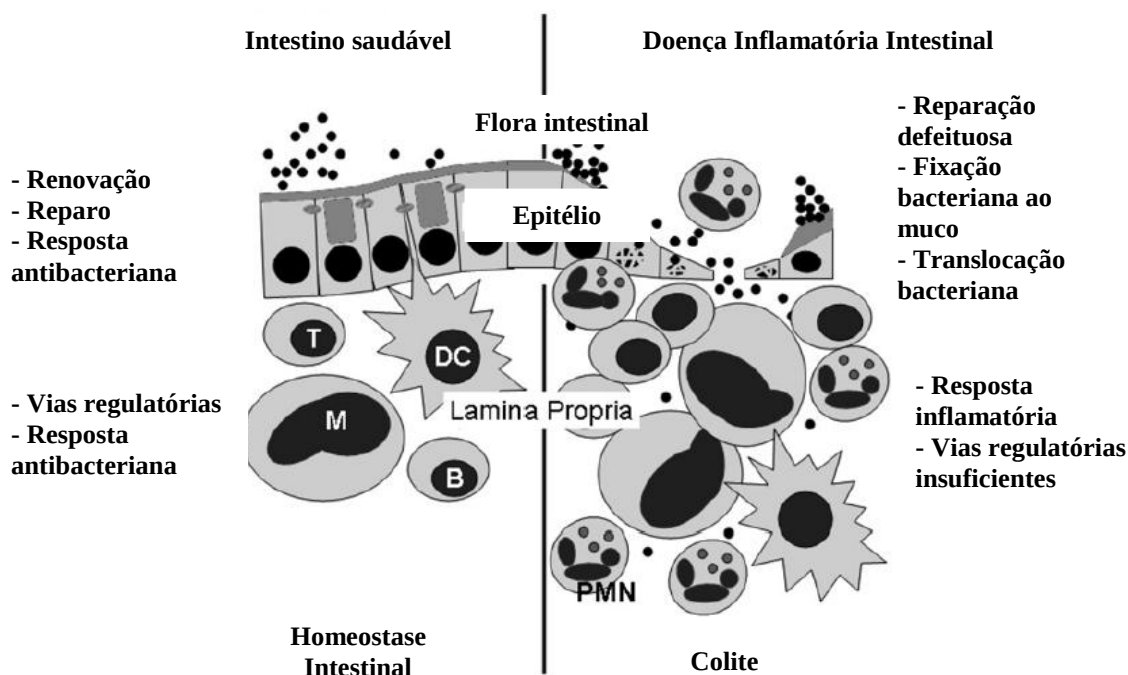
O TGI é crucial para o funcionamento do sistema imune, uma vez que a maioria da função imunológica (75%) ocorre nele (REA; PATEL, 2010; VERMA et al., 2013). Um distúrbio no equilíbrio das respostas imunes pode levar à DII, tendo em vista que a resposta imune inicial para o microbioma intestinal é rigidamente controlada, determinando se a tolerância imunológica ou uma resposta inflamatória defensiva segue (ABRAHAM; CHO, 2009).

O epitélio de revestimento, os linfócitos intraepiteliais e as células da lâmina própria, que incluem os linfócitos T e B, monócitos, macrófagos, células dendríticas e leucócitos polimorfonucleares compõem o sistema imune intestinal e, alguns destes elementos celulares estão organizados em estruturas linfóides chamadas de tecido linfóide associado ao intestino (INCE; ELLIOTT, 2007).

Ince e Elliott (2007) relatam ainda duas formas de respostas imunes intestinais: A primeira é a imunidade inata, na qual as respostas imunes atuam sem exposição prévia aos agentes patogênicos, porém sua especificidade é limitada a estruturas microbianas compartilhadas. A capacidade inata inclui a função da barreira da mucosa, que impede a translocação bacteriana. A segunda forma de resposta imune é a imunidade adquirida ou adaptativa, em que as respostas são específicas do organismo patogênico, e geralmente atuam em circunstâncias em que o sistema imune inato é incapaz de contornar um desafio patogênico. A sua ativação normalmente demora dias, e a resposta específica contra o patógeno é possível devido a receptores dentro das células B e T.

Segundo Abraham e Cho (2009), a infiltração acentuada na lâmina própria de células imunitárias inatas como os neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células T-killer naturais e de células imunes específicas como as células B e células T é uma característica da DII (Figura 4). As células dendríticas ativadas e os macrófagos, conhecidas como CAA, secretam citocinas que regulam a resposta inflamatória na DC e na CU (SANCHEZ-MUÑOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO, 2008).

Figura 4 - Respostas intestinais à flora intestinal durante a homeostase (intestino saudável) e DII.



Regulação imune domina o intestino saudável. A flora intestinal estimula a renovação epitelial, reparação e respostas antibacterianas. DII é caracterizada por danos epiteliais (produção de muco anormal, reparação defeituosa). Uma infiltração inflamatória aguda e crônica impulsionada pela flora intestinal expande a lâmina própria. As células que migram para a lâmina própria incluem células B (B), células T (T), os macrófagos (M), células dendríticas (CD) e leucócitos polimorfonucleares (PMN). Células da lâmina própria produzem citocinas inflamatórias. A regulação imune falha em diminuir esta resposta inflamatória.

FONTE: Adaptado de INCE; ELLIOTT (2007).

Os macrófagos são os maiores produtores de citocinas inflamatórias, sendo, portanto, consideradas células efetoras da colite (INCE; ELLIOTT, 2007). Estudos têm mostrado que Macrófagos M1 (M-M1) e Macrófagos M2 (M-M2) são funcionalmente polarizados em resposta a micro-organismos e mediadores do hospedeiro. M-M1 são caracterizados pela produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como $\text{TNF-}\alpha$, IL-12 e IL-23, enquanto que M-M2 são caracterizados pela produção do fenótipo de IL-10 (MANTOVANI et al., 2004; HISAMATSU et al., 2013). Cruviel et al. (2010) relatam que os macrófagos são responsáveis também por produzirem EROs, como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de

hidrogênio, e intermediários reativos do nitrogênio cujo principal representante é o óxido nítrico (ON).

A DII é largamente influenciada por citocinas (HUR et al., 2012), que são definidas como pequenas proteínas que desempenham um importante papel na DII, pois elas são moléculas-chave de sinalização do sistema imune intestinal, visto que os níveis de citocinas controlam o desenvolvimento, a recorrência e exacerbação do processo inflamatório (NEUMAN, 2007; SANCHEZ-MUÑOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO, 2008; HUR et al., 2012). As citocinas, tais como (TNF)- α , (INF)- γ , IL-1, IL-6, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, IL-23, são conhecidas por serem pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias (SANCHEZ-MUÑOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO, 2008).

Uma vez que as citocinas são secretadas pelas CAA, elas determinam a diferenciação das células T em T-helper (Th)1, Th2, T reguladora (Treg) e Th17, levando a um desequilíbrio (SANCHEZ-MUÑOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO, 2008). A falta de uma regulação adequada de células T, ou um excesso de produção de células T efetoras, participa do desenvolvimento e exacerbação da DII (LEON et al., 2006; SANCHEZ-MUÑOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO, 2008).

Diversas respostas na DII são mediadas pelas citocinas, tais como a regulação da produção de mediadores inflamatórios, metabólitos reativos de oxigênio, ON, leucotrienos, fator de ativação plaquetária, e prostaglandinas, a ativação do fator nuclear kB (NF-kB) e inibição da apoptose (SANCHEZ-MUÑOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO, 2008). No entanto, as citocinas determinam a natureza da resposta imune, na DC e na CU, de formas diferentes: na DC está associado a uma resposta mediada por células Th1, que é caracterizada pelo aumento da produção de (INF)- γ , (TNF)- α e IL-12 e, uma diminuição na geração de IL-4, enquanto que a CU é caracterizado por uma resposta de Th2, devido ao aumento da secreção de IL5 e IL13 (MONTELEONE et al., 2006; INCE; ELLIOTT, 2007; SANCHEZ-MUÑOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO, 2008).

Dentre as citocinas, o (TNF)- α desempenha um importante papel de ativação, que modulam as funções endoteliais (PAIOTTI et al., 2013). Apresenta-se como uma das principais citocinas pró-inflamatórias e sua secreção influencia diretamente os tecidos epiteliais intestinais, rompendo a barreira epitelial, induzindo a apoptose de células epiteliais e a secreção de quimiocinas pelas células epiteliais (CHO et al., 2011). Somando-se a isso, Biondo-Simões et al. (2003) relatam ainda que dentre as funções do (TNF)- α estão a indução

ao acúmulo de neutrófilos, formação de granuloma, aumento da aderência de moléculas nas células endoteliais, efeitos pró-coagulação e aumento da permeabilidade intestinal.

A IL-1 também é importante na patogênese da DII devido as suas atividades pró-inflamatórias e elevada regulação imunológica (SANCHEZ-MUÑOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO, 2008). O sistema da IL-1 consiste na IL-1 α e IL-1 β , as quais são produzidas por várias células, através da iniciação da ciclo-oxigenase (COX) tipo 2, fosfolipase A, e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (DINARELLO, 2002; SANCHEZ-MUÑOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO, 2008). Dinarello (2002) afirma ainda que isto explica a grande quantidade de prostaglandina E2 (PGE2), o fator de ativação de plaquetas e ON produzido por células expostas a IL-1. Aumento dos níveis de IL-1 em pacientes com DII pode ser resultado de estimulação de macrófagos do cólon que podem ativar a enzima conversora de IL-1 e, conseqüentemente, liberar IL-1 β na mucosa do cólon (MCALINDON, HAWKEY; MAHIDA, 1998; SANCHEZ-MUÑOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO, 2008).

As Citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, bem como a expressão de proteínas inflamatórias, como a COX-2 e iNOS, que são expressos durante as primeiras respostas aos mediadores pró-inflamatórios, desempenham um papel importante na DII (HUR, 2012).

A COX, derivada a partir do ácido araquidônico, possui três isoformas: COX-1 que está presente em quase todos os tecidos e, por isso, é denominada enzima constitutiva; COX-2 que está presente nos locais de inflamação, por isso chamada enzima indutiva, é expressa primariamente por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos e monócitos (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006). A COX-3 é uma variação da COX-1 (KIM et al., 2014). Segundo Hilário, Terreri e Len (2006), a COX-2 é induzida pelas citocinas IL-1, IL-2 e TNF- α e outros mediadores nos sítios de inflamação, como fatores de crescimento e endotoxinas. Na DII a expressão da enzima COX-2 está aumentada, serve como um parâmetro de gravidade ou melhora do processo inflamatório no intestino grosso (FILLMANN, 2007). Dessa forma, sua medida vem sendo realizada com o intuito de demonstrar o grau de inflamação, bem como caracterizar a melhora do processo inflamatório com o uso de substâncias que inibam a sua função (MARTIN; VILLEGAS; ALARCÓN DE LA LASTRA, 2005; FILLMANN, 2007).

O ON é sintetizado do aminoácido L-arginina, por uma família de enzimas referidas como óxido nítrico sintetase (NOSs) (KOLIOS; VALATA; WARD, 2004). Existem três isoformas do ON: duas constitutivas (cNOS), presentes nos tecidos neuronal (nNOS) e

endotelial (eNOS) e, a terceira chamada induzida (iNOS) (SZALAI et al., 2014), expressa após a indução por citocinas e produtos bacterianos (KOLIOS; VALATA; WARD, 2004). A produção elevada de ON, via expressão de iNOS é prejudicial para a função intestinal, contribuindo para imunopatologia gastrointestinal de eventos inflamatórios crônicos (PAIOTTI et al., 2013), sendo associados com a iniciação e manutenção da inflamação na DII (KOLIOS; VALATA; WARD, 2004). Em adição, os mesmos autores afirmam, ainda, que citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- α , podem induzir a produção de ON e atividade de iNOS nas células epiteliais colônicas. A atividade da enzima iNOS está aumentada em pacientes portadores de CU e DC (FILLMANN, 2007).

Vale ressaltar, ainda, a atividade da Mieloperoxidase (MPO), que de acordo com Adam et al. (2014), é uma enzima abundantemente expressa nas células imunes, incluindo neutrófilos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos. De acordo com o mesmo autor, a MPO é enzimaticamente capaz de catalisar a geração de EROs e do consumo de ON. A atividade de MPO reflete o grau de infiltração de neutrófilos no processo inflamatório intestinal (ISLAM et al., 2008). Liu e Wang (2011) afirmam ainda que a redução da atividade da MPO pode ser interpretada como uma manifestação do efeito anti-inflamatório de uma substância testada.

2.4.4 Estresse Oxidativo

A liberação das EROs é um importante fator na iniciação e preservação da reação inflamatória na DII, uma vez que as EROs causam o estresse oxidativo (IOANNIDIS et al., 2011). Níveis elevados de EROs, que são produzidos por neutrófilos e macrófagos recrutados no tecido inflamado, assim como uma diminuição da capacidade antioxidante do plasma caracterizam as DII (LARROSA et al., 2010). Em adição, Ionnidis et al. (2011) afirmam que citocinas que promovem a reação inflamatória, como a IL-1 β e TNF- α , estão envolvidas na liberação de radicais livres.

O estresse oxidativo surge quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e sua remoção por antioxidantes (LAKHAN; KIRCHGESSNER, 2010). No estresse oxidativo leve, os tecidos muitas vezes respondem produzindo mais antioxidantes; porém, no estresse oxidativo grave e persistente as reservas de antioxidantes nos tecidos esgotam, ultrapassando sua capacidade de produzir mais antioxidantes, ocasionando baixos níveis de antioxidantes e a lesão tecidual (LAKHAN; KIRCHGESSNER, 2010).

Segundo Ioannidis et al. (2011), durante a progressão do estresse oxidativo, moderadores como o superóxido e o peróxido de hidrogênio, são formados e levam a uma maior produção de radicais tóxicos de oxigênio que podem levar a peroxidação lipídica e, conseqüentemente a danos celulares. Em adição, Liu e Wang (2011) afirmam que o estresse oxidativo e, em consequência, a peroxidação lipídica podem agravar reações em cadeia de radicais livres, afetar a integridade da barreira da mucosa intestinal e ativar mediadores inflamatórios.

A mucosa intestinal normal é equipada com uma rede de enzimas antioxidantes que são capazes de neutralizar EROs, tais como a catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GSH), a glutathiona redutase (GR), a glutathiona-s-transferase (GST), e superóxido dismutase (SOD). As atividades destas enzimas são geralmente equilibradas para manter um nível de estado baixo e contínuo de EROs; no entanto, os níveis destas enzimas são frequentemente empobrecidos em pacientes com DII (CARMEN et al., 2011).

A Glutathiona (GSH) é a defesa intracelular mais importante contra o estresse oxidativo e é essencial para a integridade funcional e estrutural do intestino (RUSS et al., 2010). Para que a atividade protetora da glutathiona expressa pela redução de espécies oxidantes, e consequente oxidação da GSH à glutathiona dissulfeto (GSSG) seja mantida, a GSH precisa ser regenerada através do ciclo catalítico, onde as enzimas glutathiona oxidase (GO) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) catalisam a oxidação de GSH à GSSG, e a GR é responsável pela regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de NADPH (HUBER et al., 2008). O estresse oxidativo pode esgotar a GSH celular (LU, 1999).

O MDA, por sua vez, de acordo com Rajendran et al. (2014), é um dos vários produtos finais de baixo peso molecular formados durante a decomposição induzida por radicais de AGPI. Os níveis de MDA foram frequentemente utilizados como uma indicação de danos oxidativos e como um marcador de peroxidação lipídica induzida por radicais livres (LIU; WANG, 2011).

2.4.5 Tratamento

Os objetivos principais do tratamento da DII são de promover a remissão do ataque agudo e reduzir a incidência de recidivas, sendo utilizados fármacos como os aminossalicilatos, corticóides, imunossupressores e antibióticos (LUCHINI, 2009).

A sulfassalazina, utilizada como base do tratamento da DII há décadas, é uma pró-droga do composto de ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) e sulfapiridina ligados por uma

ligação azo que é fracamente absorvido no estômago e intestino delgado (OZ; CHEN; VILLIERS, 2013). A sulfapiridina atua como molécula transportadora, promovendo a disponibilidade do 5-ASA no cólon, prevenindo sua absorção e metabolismo no intestino delgado (LUCHINI, 2009). O mecanismo de ação da sulfassalazina não está totalmente elucidado, mas tem sido demonstrado efeito modulador sobre a síntese e liberação de leucotrienos (LTB₄) e prostaglandinas (PGE₂), sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL-1 e IL-2) e sobre a produção de EROs (NIKOLAUS; FOLSCN; SCHREIBER, 2000). Em adição, a sulfassalazina atua como um antioxidante contra a geração de EROs e NOS, com efeito quelante de metal que reduz a oxidação (OZ; CHEN; VILLIERS, 2013).

No entanto, apesar do 5-ASA serem amplamente prescritos para o tratamento da CU, uma gama de efeitos adversos são descritos (RANSFORD; LANGMAN, 2002). A molécula de sulfapiridina é responsável pela maioria dos efeitos adversos que ocorrem com a administração da sulfassalazina (LUCHINI, 2009). A sulfassalazina apresenta efeitos adversos graves, incluindo a infertilidade, fibrose pulmonar, a falta de resposta, e em última análise, os pacientes podem necessitar de ressecção intestinal (OZ; CHEN; VILLIERS, 2013), sendo assim, são necessárias novas opções terapêuticas para a DII.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Execução

A elaboração do iogurte caprino foi realizada no Laboratório de Técnica Dietética - Departamento de Nutrição (DN)/ Centro de Ciências da Saúde (CCS), na Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O estudo *in vivo* foi realizado no Laboratório de Nutrição Experimental – DN/ CCS/ UFPB.

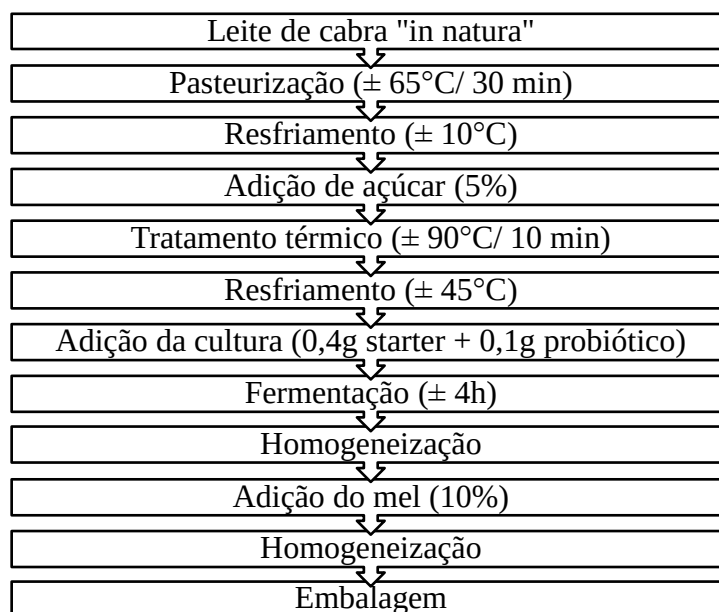
3.2 Leite de Cabra

O leite de cabra “in natura” foi obtido da Cooperativa dos Produtores Rurais de Monteiro Ltda – CAPRIBOM/Monteiro – PB.

3.3 Iogurte Caprino

O produto foi elaborado por Machado et al. (2015), conforme apresentado na Figura 5. As culturas, starter e probiótica, foram obtidas da CHR Hansen. O iogurte apresentou a contagem final de 10^7 UFC/ mL.

Figura 5 – Fluxograma de produção do iogurte caprino



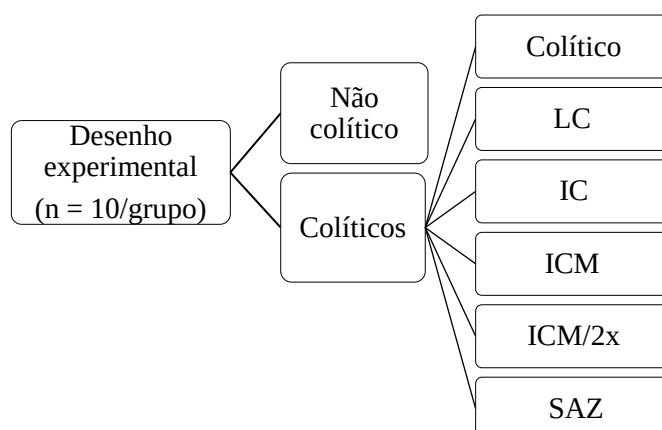
3.4 Animais

Setenta (70) ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), pesando entre 190 a 240 g, provenientes do Biotério Professor Tomas George do Centro de Biotecnologia – Cbiotec/ UFPB. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro/escuro padrão de 12/ 12 h. Os animais tiveram acesso livre à ração Presence-Purina® e água *ad libitum*, atendendo ao protocolo vigente para manutenção de animais de experimentação. O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – CBIOTEC – Centro de Biotecnologia/ UFPB, sob protocolo nº 0109/13 e aprovado, conforme certidão em anexo.

3.5 Desenho Experimental

Os animais foram divididos em 7 grupos experimentais ($n = 10/\text{grupo}$), os quais: Não colítico; Colítico ; Leite de Cabra (LC); Iogurte Caprino (sem mel) (IC); Iogurte Caprino adicionado de Mel (10%) (ICM), Iogurte Caprino adicionado de Mel (10%) duas vezes ao dia (ICM/ 2x) e Sulfassalazina (250 mg/kg) (SAZ). (Figura 6). A administração do produto foi na quantidade de 1 mL, diariamente, via gavagem. A dose diária de 1 mL foi escolhida em conformidade com a literatura, que diz que um produto lácteo deve conter, pelo menos, 10^6 UFC/ mL no momento de seu consumo (SHAH, 2000; PLESSAS et al., 2012). O grupo ICM/ 2x recebeu 1 mL pela manhã e 1 mL à tarde, com o intuito de observar se o reforço da dose do iogurte caprino adicionado de mel melhoraria os parâmetros inflamatórios, em relação ao grupo que recebe apenas 1x ao dia (ICM).

Figura 6 – Desenho Experimental



3.6 Indução da Colite

Para indução da colite foi utilizado o método descrito originalmente por Mac Pherson e Pfeiffer (1978), e posteriormente modificado por Millar et al. (1996), com pequenos ajustes. Os animais foram submetidos a jejum de 24 horas e posteriormente anestesiados com 0,1 mL/ 100 g peso de ketamina e 0,1 mL/ 100 g peso de xilasina.

Ácido acético na concentração de 10% v/v em solução salina 0,9% foi administrado por via retal, utilizado uma sonda retal n.6 de 2 mm de diâmetro que foi introduzida no reto do animal até uma distância de 8 cm e, após administração, o animal foi mantido em posição elevada por 30 segundos e, em seguida, foram devolvidos às suas gaiolas para se recuperar da anestesia. Os ratos do grupo não-colítico (normal) receberam 0,5 mL de solução salina via retal.

Quatorze dias antes da indução da colite foi iniciada a gavagem com os produtos testados e, após 48 horas da indução, os animais foram eutanasiados. Para tanto, a anestesia dos animais foi realizada usando Cloridrato de Ketamina (0,1 mL/ 100 g de peso) e Cloridrato de xilazina (0,1 mL/ 100 g de peso), administrada por via intraperitoneal. Após a sedação, foi realizada laparotomia para exposição do coração e obtenção do cólon para posteriores análises.

3.7 Parâmetros Avaliados

3.7.1 Parâmetros Murinométricos

O peso corporal de cada animal foi verificado semanalmente durante todo o experimento. No último dia, com os animais anestesiados, foram medidos os parâmetros murinométricos, que incluíram o peso corporal, comprimento naso-anal, circunferências abdominal (CA) e torácica (CT) e Índice de Massa Corporal (IMC) (NOVELLI et al., 2007). O IMC foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$\text{IMC} = \text{peso corporal (g)} / \text{comprimento ao quadrado (cm}^2\text{)} \quad (1)$$

3.7.2 Avaliação Bioquímica

O sangue dos animais foi coletado mediante punção cardíaca, transferido para tubos coletores, e centrifugado a 3500 rpm durante 15 minutos. Logo após, foi retirado o soro (sobrenadante) e armazenado em microtubos de 2,0 mL para posteriores dosagens bioquímicas de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), fração lipoprotéica (HDL-c) e Glicemia, utilizando kits bioquímicos Labtest (Minas Gerais, Brasil).

A fração lipoprotéica (LDL-c) foi estimada utilizando a equação de Friedwald (Eq. 2) (FRIEDWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972).

$$\text{LDL-C} = (\text{CT} - \text{HDL-c}) - (\text{TG} / 5) \quad (2)$$

3.7.3 Avaliação do Dano Intestinal

3.7.3.1 Avaliação Macroscópica do Cólon

O cólon dos animais foi removido, colocado em uma placa de petri com gelo, limpo de gordura e mesentérico, pesado e medido o comprimento. Em seguida, foi aberto longitudinalmente, para avaliar a extensão e o dano macroscópico segundo o modelo descrito por Bell, Gall e Wallace (1995), conforme demonstrado no Quadro 6, que avalia a gravidade e a extensão do dano intestinal.

Quadro 6 – Critérios de avaliação da gravidade para o dano macroscópico da colite

Pontuação	Critério
0 ponto	Cólon normal
1 ponto	Hiperemia localizada sem úlceras
2 pontos	Ulceração sem hiperemia ou engrossamento da parede intestinal
3 pontos	Ulceração com até um sítio de inflamação
4 pontos	Dois ou mais sítios de ulceração e inflamação
5 pontos	Grandes sítios de dano com uma extensão > 1cm ao longo do comprimento do cólon
6 - 10 pontos	Grandes sítios de dano com extensão > 2 cm ao longo do comprimento do cólon, com pontuação de um aumento de 1 para cada cm adicional

FONTE: Adaptado de BELL; GALL; WALLACE (1995)

Logo após, o cólon foi dividido em 4 cortes longitudinais e, estes foram destinados para as análises posteriores.

3.7.3.2 Mensuração da Atividade de Mieloperoxidase

A determinação da MPO em tecido colônico foi realizada pelo método descrito por Krawisz, Sharon e Stenson (1984). Após avaliação macroscópica e fragmentação do cólon, uma tira do tecido foi colocada em microtubo de 2,0 mL e levada ao congelamento a uma temperatura de -80 °C. Para se iniciar a determinação da enzima MPO, a tira do tecido foi descongelada e posteriormente pesada. Mediante o peso foi calculada a quantidade do tampão brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) para cada amostra na proporção de 1:20 (p/v). Foi adicionada a cada amostra 1/3 do volume total do tampão HTAB e recortado o tecido com uma tesoura por aproximadamente 15 segundos em meio resfriado. O material fragmentado foi triturado e homogeneizado a frio, sob ação de um triturador (Ultra Stirrer modelo: Ultra 80) e a ele adicionado o restante do tampão HTAB. O homogenato obtido foi submetido à ação de um sonicador (Limp Sonic) durante 1 minuto e, logo em seguida, a um triplo processo de congelamento-descongelamento durante 1-2 dias. Após o último descongelamento, o homogenato foi centrifugado a 8282 rpm por 5 minutos a 4 °C. Em uma microplaca de 96 poços, foi adicionado 100 µL do sobrenadante de cada amostra e 150 µL do reativo de coloração a cada poço da placa e, logo em seguida, foi determinada a absorbância em um comprimento de onda de 450 nm, através de leitor de microplacas (Polaris), nos tempos 0 e 3 minutos, a 37 °C.

A atividade da enzima MPO foi calculada por interpolação em uma curva padrão, realizada com MPO procedente de neutrófilos humanos e com a peroxidase de rábano. Uma unidade de MPO (U) foi considerada como aquela que degrada 1 nmol/min de peróxido de hidrogênio a 25 °C. Os resultados foram expressos em U/g de tecido.

3.7.3.3 Determinação do Conteúdo de Malondialdeído

A determinação do conteúdo de MDA foi realizada pelo método descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). Após fragmentação do cólon, uma tira do tecido foi separada para esta análise, coloca em microtubo de 2,0 mL e levada ao congelamento a uma temperatura de -80 °C. Para se iniciar a determinação do MDA, a tira do tecido foi descongelada e posteriormente pesada. Mediante o peso foi calculada a quantidade de tampão

Tris HCl para cada amostra, utilizando-se a proporção de 1:5 (p/v). O tecido foi picado com uma tesoura por aproximadamente 15 segundos em meio resfriado. O material fragmentado foi triturado e homogeneizado a frio, sob ação de um triturador (Ultra Stirrer modelo: Ultra 80), e a ele adicionado o tampão Tris HCl. O homogenato obtido foi centrifugado a 4950 rpm por 10 minutos a 4 °C e 300 µL sobrenadante foi transferido para um eppendorf, sendo adicionados 750 µL do reativo cromogênico e 225 µL de ácido clorídrico (HCl – 37%). Em seguida, o material foi colocado em banho-maria com agitação a 45° C, durante 40 minutos, e posteriormente levado à uma centrifugação a 4950 rpm durante 5 minutos a 4 °C. 300 µL do sobrenadante foi transferido para microplaca de 96 poços, em duplicata, e levado para leitor de microplacas (Polaris) a um comprimento de onda de 586 nm. O conteúdo de MDA foi calculado através de interpolação em curva padrão com o 1,1,3,3 – tetraetoxipropano, o qual é hidrolisado durante o passo de incubação com HCl a 45 °C, gerando o MDA. Os resultados foram expressos em nmol/g tecido.

3.7.3.4 Determinação do Conteúdo de Glutathiona Total

A determinação do conteúdo de glutathiona total foi realizada pelo método descrito por Anderson (1985). Após fragmentação do cólon, uma tira do tecido colônico foi destinada para a determinação do conteúdo de glutathiona total. O tecido foi imediatamente pesado e levado ao congelamento, a uma temperatura de -80 °C, com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA), a fim de se inibir a degradação da GSH pela gama-glutamyltranspeptidase. Foi calculada a quantidade total de TCA para cada amostra na proporção de 1:20 (p/v). Para determinação deste conteúdo, as amostras foram descongeladas e picadas com uma tesoura, por aproximadamente 15 segundos em meio resfriado. O material fragmentado foi triturado e homogeneizado a frio, sob ação de um triturador (Ultra Stirrer modelo: Ultra 80), e a ele adicionado o restante da solução de TCA. O homogenato obtido foi centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante submetido a uma centrifugação a 10000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Em uma microplaca de 96 poços foi adicionado 20 µL de cada diluição do padrão (duplicata), 20 µL da solução de TCA para o branco (duplicata) e 20 µL do sobrenadante das amostras (duplicata). A cada poço foi adicionada, na seguinte ordem, 15 µL de PBS-EDTA, 20 µL de solução de DTNB e 140 µL de NADPH. Posteriormente cada placa foi incubada, a 30 °C, por 5 minutos, e a cada poço adicionado 15 µL da solução enzimática (GSHred). Foi determinada a absorbância em um comprimento de onda de 412 nm através de leitor de microplacas (Polaris), no tempo de 3 minutos.

O conteúdo de glutathiona total foi calculado através de interpolação em uma curva padrão realizada com GSH. Os resultados foram expressos em nmol/g de tecido.

3.7.3.5 Dosagem de Citocinas – TNF- α e IL1- β

Após a fragmentação do cólon, uma tira do tecido foi colocada em microtubo de 2,0 mL e levada ao congelamento a uma temperatura de -80 °C. Para dosagem de citocinas, o material fragmentado foi descongelado, pesado e, calculada a quantidade do tampão fosfato salino (PBS) 10 mM (pH 7,4) para cada amostra na proporção de 1:5 (p/v). O material foi picado com uma tesoura, por aproximadamente 15 segundos em meio resfriado. Logo após, o material fragmentado foi triturado e homogeneizado a frio, sob ação de um triturador (Ultra Stirrer modelo: Ultra 80), e a ele adicionado tampão fosfato salino (PBS) 10 mM (pH 7,4). O homogenato foi submetido à incubação, sob agitação a 37°C durante 20 minutos e, posteriormente centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi transferido para microtubo de 2,0 mL e a análise foi realizada com rat TNF- α (DY510 R&D System) e rat IL-1 β (DY510 R&D System), conforme instruções do fabricante.

3.7.3.6 Análise Histológica

O material coletado para avaliação histopatológica foi obtido da zona de dano mais representativo (zona de necrose e inflamação). Fragmentos do cólon foram imediatamente acondicionados em solução fixadora de formol tamponado a 10% e líquido de Bouin durante 24 horas, em seguida processados de acordo com a técnica histológica de rotina. Para a inclusão do material, foi utilizada a parafina, neste estudo. Os cortes foram realizados com 5 μ m de espessura utilizando-se micrótomo rotativo manual. A coloração dos cortes foi realizada com a técnica de Hematoxilina de Harris e Eosina (BEÇAK; PAULTE, 1976) montados entre lâmina e lamínula com resina sintética (Entellan-Merck).

As análises histológicas da morfologia do intestino enfatizaram alterações relacionadas à integridade e inflamação da mucosa colônica, edema, presença de úlceras e necrose dos tecidos. Essas alterações foram avaliadas utilizando microscópio ótico acoplado a sistema de captação de imagens.

Os cortes histológicos foram avaliados pelo grau de infiltração leucocitária e sua distribuição no tecido colônico, utilizando-se os parâmetros (Tecido normal, Infiltração leve, Infiltração moderada e Infiltração intensa), além da verificação da presença/ausência de

parâmetros indicadores de um processo inflamatório, como o edema, a perda da citoarquitetura normal do tecido e os pontos de necrose e destruição.

3.7.3.7 Análise Imunohistoquímica de COX-2 e iNOS

Três cortes finos (4 µm) de cólons (3 animais por grupo) foram obtidos com um micrótomo e transferidas para lâminas lâminas silinizadas. Cada corte foi desparafinado e reidratado. Secções de tecido do cólon foram lavadas com 0,3% de Triton X-100 em tampão fosfato, colocado peroxidase endógena (3% de peróxido de hidrogénio), e incubadas durante a noite a 4 °C com os seguintes anticorpos primários: COX-2, 1:600; iNOS, 1:700 (Santa Cruz, USA). Depois, as seccções foram lavadas com tampão fosfato e incubadas com um anticorpo secundário estreptavidina-HRP-conjugada (Biocare Medical, Concord, CA, EUA) durante 30 minutos, e a imunorreactividade de COX-2 e iNOS foi visualizada utilizando um kit de detecção baseada em colorimétrico seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (TrekAvidin-HRP Label + Kit from Biocare Medical, Dako, USA). Controles positivos e negativos foram incluídas em cada grupo. Foi utilizado microscopia planimétrica (Olympus BX50, Departamento de Morfologia/UFRN) com objetiva de alta potência (40x). A intensidade da imunocoloração de células foi determinada e score de 1 a 4 foi atribuído: 1= ausência de células positivas; 2 = pequeno número de células positivas ou células isoladas; 3 = número moderado de células positivas; e 4 = elevado número de células positivas. A intensidade de marcação foi avaliada por dois examinadores previamente treinados, de forma duplo-cego. Foram avaliados três cortes por animal.

3.8 Análise Estatística

As análises das diferenças entre as médias foram avaliadas através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey. Os dados não paramétricos (escore) foram analisados utilizando-se o teste de Mann-Whitney. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 4.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, C.; CHO, J. H. Inflammatory bowel disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, p. 2066-2078, 2009.
- ADAM, M. et al. Red blood cells serve as intracellular carriers of myeloperoxidase. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 74, p. 353-363, 2014.
- AHUJA, V.; TANDON, R. K. Inflammatory bowel disease in the Asia-Pacific area: a comparison with developed countries and regional differences. **Journal of Digestive Disease**, v. 11, p. 134-47, 2010.
- ALFEREZ, M. J. M. et al. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. **Journal of Dairy Research**, n. 68, p. 451-461, 2001.
- ALGIERI, F. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Phlomis purpurea* L. and *Phlomis lychnitis* L. in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 750-759, 2013.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; GIAMPIERI, F.; BATTINO, M. Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n.5, p. 621-638, 2013.
- AMARETTI, A. et al. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 809-817, 2013.
- ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 548-555, 1985.
- ANJO, D. F. C. Functional foods in angiology and vascular surgery. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.
- ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. **Food Quality and Preference**, v. 28, n. 1, p. 348-355, 2013.
- ANVISA, 2008. Comissões Técnico-científicas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista das alegações aprovadas**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso: 20 nov 2013.
- ARDIZZONE, S; BIANCHI PORRO, G. Biologic therapy for inflammatory bowel disease. **Drugs**, v. 65, p. 2253-2286, 2005.
- ATTAIE, R.; RICHTER, R. L. Size distribution of fat globules in goat milk. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 940-944, 2000.

AWAAD, A. S.; EL-MELIGY, R. M.; SOLIMAN, G, A. Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, p. 101-124, 2013.

AZCÁRATE-PERIL, M. A., SIKES, M.; BRUNO-BÁRCENA, J.M. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 301, p. G401-G424, 2011. doi:10.1152/ajpgi.00110.2011

BABAYAN, V. K. Medium chain fatty acids esters and their medical and nutritional application. **Journal of the American Chemists Society**, n. 59, p.49-51, 1981.

BEÇAK, W.; PAULTE, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Livros Técnicos e Científicos. Editora S.A., 1976, 305p.

BELL, C. J.; GALL, D. G.; WALLACE, J. L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. 622-630, 1995.

BEVILACQUA, C. et al. Goats' milk of defective alpha (s1)-casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to beta-lactoglobulin in guinea pigs. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 217-227, 2001.

BEYER, P. L. Tratamento médico nutricional para doenças do trato gastrointestinal inferior. In: MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause – Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 12ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, p.673-706.

BILSEL, Y. et al. Could honey have a place in colitis therapy? Effects of honey, prednisolone and disulfiram on inflammation, nitric oxide and free radical formation. **Digestive Surgery**, v. 19, p. 306-311, 2002.

BIONDO-SIMÕES M. L. P. et al. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 23, p. 172-182, 2003.

BOGDANOV, S. et al. Honey for Nutrition and Health: A Review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 677-689, 2008.

BOŽANIĆ, R, Tratnik Lj and Drgalić. Kozje mlijeko: karakteristike i mogućnosti (Goat's milk: characteristics and possibility). **Mljekarstvo/Dairy**, v. 52, n. 3, p. 207-237, 2002.

CARMEN, S. et al. Potencial application of probiotics in the prevention and treatment of inflammatory bowel diseases. **Ulcers**, v. 2011, p.1-13, 2011.

CEAPA, C. et al. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 27, p. 139-155, 2013.

CHAUHAN, S. V.; CHORAWALA, M. R. Probiotics, prebiotics and synbiotics. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, p. 711-726, 2012.

CHAVES, S.; PERDIGÓN, G.; LeBLANC, A. M. Yoghurt consumption regulates the immune cells implicated in acute intestinal inflammation and prevents the recurrence of the inflammatory process in a mouse model. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 5, p. 801-811, 2011.

CHIODA, T. P. et al. Inhibition of the growth of *Escherichia coli* isolated from 'Minas Frescal' cheese by *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, p. 583-585, 2007.

CHO, E.-J. et al. Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Patrinia scabiosaeifolia* in mice with ulcerative colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 428-435, 2011.

CIORBA, M. A. A gastroenterologist's guide to probiotics. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 9, p. 960-968, 2012.

CONSENSUS GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 47, n. 3, 2010. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000428032010000300019&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 21 Agost. 2013.

COSNES, J. et al. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1785-1794, 2011.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema Imunitário: Parte I- Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, p. 434-461, 2010.

DADDAOUA, A. et al. Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 3, p.672-676, 2006.

DANESE, S.; FIOCCHI, C. Ulcerative Colitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 8, p. 1713-1725, 2011.

DANN, S. M.; ECKMANN, L. Innate immune defenses in the intestinal tract. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 23, p. 115-120, 2007.

DINARELLO, C. A. The IL-1 family and inflammatory diseases. **Clinical and Experimental Rheumatology**, 20 (Suppl. 27), S1-S13, 2002.

DREWNOWSKI, A., FULGONI, V. Nutrient profiling of foods: creating a nutrient-rich food index. **Nutrition Reviews**, v. 66, p. 23-39, 2008

DODDA, D.; CHHAJED, R.; MISHRA, J. Protective effect of quercetin against acetic acid induced inflammatory bowel disease (IBD) like symptoms in rats: Possible morphological and biochemical alterations. **Pharmacological Reports**, v. 66, p. 169-173, 2014.

EISSA, E. A.; BABIKER, E. E.; YAGOUB, A. E. A. Physicochemical, microbiological and sensory properties of Sudanese yoghurt (zabadi) made from goat's milk. **Animal Production Science**, v. 51, p.53-59, 2011.

EREJUWA, O. O.; SULAIMAN, S. A.; Ab WAHAB, M. S. Honey: a novel antioxidant. **Molecules**, v. 17, p. 4400-4423, 2012.

ESTERBAUER, M.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonyldialdehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> , 2013. Acesso em 18 set 2013.

FAO/WHO, Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. 2001. Disponível: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>>. Acesso em 30 Maio 2013.

FILLMANN, H. S. **O efeito protetor da glutamina na colite experimental induzida por ácido acético**. 2007. 91p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative. **Ultracentrifuge**. Clinical Chemistry, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

GARCIA, E. F. et al. Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Science and Nutrition**, Early Online, p. 1-10, 2012.

GARCÍA, V. et al. Improvements in goat milk quality: A review. **Small Ruminant Research**. Article In Press <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.12.034>, 2014.

GARDLIK, R. PALFFY, R.; CELEC, P. Recombinant Probiotic Therapy in Experimental Colitis in Mice. **Folia Biologica (Praha)**, v.58, p. 238-245, 2012.

GOBBATO, N.; RACHID, M.; PERDIGÓN, G. Anti-inflammatory effect of yoghurt in a experimental inflammatory bowel disease in mouse. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 497-504, 2008.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X.; KLAVER, F. A. M. Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. **Journal Dairy Science**, v. 81, p. 2817-2825, 1998.

GONZALEZ, N.J.; ADHIKARI, K.; SANCHO-MADRIZ, M. F. Sensory characteristics of peach-flavored yogurt drinks containing prebiotics and synbiotics. **LWT- Food Science and Technology**, v. 44, p. 158-163, 2011.

GOPAL, P. K. Latic acid bacteria/*Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus*. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2 ed. Academic Press, London, p 91-95, 2011.

GOURBEYRE, P.; DENERY, S.; BODINIER, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, p. 685-695, 2011.

GRAJEK, W., OLEJNIK, A., SIP, A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. **Acta Biochimica Polonica** v. 52, n.3, p. 665-671, 2005.

GUEDES-NETO, L.G. *Lactobacillus acidophilus* e a indústria de laticínios. **Revista Leite e Derivados**, v.66, p.17-23, 2002.

HAENLEIN, G.F.W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v.51, n.2, p.155-163, 2004.

HILÁRIO, M. O. E; TERRERI, T.; LEN, C. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cicloxygenase 2 inhibitors. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. S206-S212, 2006.

HISAMATSU, T. et al. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v.137, p. 283-297, 2013.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

HUR, S, J. et al. Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. **Nutrition Research**, v. 32, p. 801-816, 2012.

HUSSEIN, S. Z. et al. Gelam Honey Inhibits the Production of Proinflammatory Mediators NO, PGE2, TNF- α , and IL-6 in Carrageenan-Induced Acute Paw Edema in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-13, 2012.

INCE, M. N.; ELLIOTT, D. E. Immunologic and molecular mechanisms in inflammatory bowel disease. **Surgical Clinics of North America**, v. 87, p. 681-696, 2007.

IOANNIDIS, O. et al. Nutritional Modulation of the Inflammatory Bowel Response. **Digestion**, v. 84, n. 2, p. 89-101, 2011.

ISLAM, M. S. et al. Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. **British Journal of Pharmacology**, v.154, p. 812-824, 2008.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, p. 299-313, 2004.

ISRAILI, Z. H. Antimicrobial properties of honey. **American Journal of Therapeutics**, p. 1-20, 2013.

JARDIM, W.R. **Criação de caprinos**. São Paulo: Nobel, 1984. 239 p.

JENNESS R. Composition and characteristics of goat milk: Review. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 1605-1627, 1980.

KHALIL, M. I.; SULAIMAN, S. A.; BOUKRAA, L. Antioxidant properties of honey and its role in preventing health disorder. **The Open Nutraceuticals Journal**, v. 3, p. 6-16, 2010.

- KIM, S. H. et al. *Citrus junos* Tanaka peel extract attenuates experimental colitis and inhibits tumour growth in a mouse xenograft model. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 301-108, 2014.
- KOLIOS, G.; VALATAS, V.; WARD, S. G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. **Immunology**, v. 113, p. 427-437, 2004.
- KOTZAMPASSI, K.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, J. Probiotics for infectious diseases: more drugs, less dietary supplementation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 288-296, 2012.
- KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, v. 87, n.6, p. 1344-1350, 1984.
- LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A. Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, p. 1-12, 2010.
- LARA-VILLOSLADA, F. et al. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. **Clinical Nutrition**, v. 25, p. 477-488, 2006.
- LARROSA, M. et al. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p. 717-725, 2010.
- LeBLANC, A. M.; PERDIGÓN, G. The application of probiotic fermented milks in cancer and intestinal inflammation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, p. 421-428, 2010.
- LeBLANC, A.M.; CHAVES, S.A.; PERDIGÓN G. Effect of yoghurt on the cytokine profile using a murine model of intestinal inflammation. **European Journal of Inflammation**, v.7, p. 97-109, 2009.
- LEON, F. et al. Involvement of dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 579, p. 117-132, 2006.
- LIU, X.; WANG, J. Anti-inflammatory effects of iridoid glycosides fraction of *Folium syringae* leaves on TNBS-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 780-787, 2011.
- LU, S.C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 13, n. 10, p. 1169-1183, 1999.
- LUCHINI, A. C. **Avaliação dos efeitos da cumarina e da 4-hidroxi-cumarina e de diferentes associações com a sulfassalazina no modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos**. 2009. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion**, v. 17, n. 2, p. 135-150, 1978.

MADSEN, K. L. et al. Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. **Gastroenterology**, v. 116, n. 5, p. 1107-1114, 1999.

MAHGOUB, A. A. et al. Protective effect of natural honey against acetic acid-induced colitis in rats. **Tropical Gastroenterology**, v. 23, p. 82-87, 2002.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, p. 677-686, 2004.

MARTIN, A. R; VILLEGAS, I; ALARCÓN DE LA LASTRA, C. The COX-2 inhibitor, rofecoxib, ameliorates dextran sulphate sodium induced colitis in mice. **Inflammation Research**, v. 54, n. 4, p. 145-151, 2005.

MARTIN, P. et al. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 42, p. 433-459, 2002.

MARTINEZ-FEREZ, A. et al. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 173-181, 2006.

MCALINDON, M. E., HAWKEY, C.J. , MAHIDA, Y. R. Expression of interleukin 1 beta and interleukin 1 beta converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 42, p. 214-219, 1998.

MCVAY, L.D. et al. Absence of bacterially induced RELMbeta reduces injury in the dextran sodium sulfate model of colitis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.116, n. 11, p. 2914-2923, 2006.

MILLAR, A. D. et al. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease in a rat model of colitis. **Gut**, v. 39, n. 3, p. 407-415, 1996.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – Resolução nº 5 de 13/11/2000 – Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=12695>>. Acesso em 02 Dezembro 2013.

MISHKIN, S. Dairy sensitivity, lactose malabsorption, and elimination diets in inflammatory bowel disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. 564-567, 1997.

MONTELEONE, G. et al. New mediators of immunity and inflammation in inflammatory bowel disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 22, p. 361-364, 2006.

MORELLI, L. Yogurt, living cultures, and gut health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, p. 1248S-1450S, 2014.

MUKDSI, M. C. A. et al. Functional goat milk cheese with feruloyl esterase activity. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 801-809, 2013.

NEUMAN, M. G. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. **Translational Research**, v. 149, n. 3, p. 173-186, 2007.

NIKOLAUS, S., FOLSCN, U., SCHREIBER, S. Immunopharmacology of 5-aminosalicylic acid and glucocorticoids in the therapy of inflammatory bowel disease. **Hepatogastroenterology**, v. 47, p. 71-82, 2000.

NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, p. 111-119, 2007.

OLIVEIRA, M. E. G. et al. Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 6, p. 370-379, 2012.

OREL, R.; TROP, T. K. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 33, p. 11505-11524, 2014.

OWOYELE, B. V. et al. Effects of honey on inflammation and nitric oxide production in wistar rats. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, v. 9, n. 4, p. 447-452, 2011.

OZ, H. S., CHEN, T., VILLIERS, W. J. S. Green tea polyphenols and sulfasalazine have parallel anti-inflammatory properties in colitis models. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1-10, 2013.

PAIOTTI, A. P. R. et al. The anti-inflammatory potential of phenolic compounds in grape juice concentrate (G800™) on 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. **British Journal of Nutrition**, p.1-8, 2013.

PARK, Y. W. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 14, p. 151-159, 1994.

PARK, Y. W. et al. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 88-113, 2007.

PEÑA, J. A.; J. VERSALOVIC, J. Lactobacillus rhamnosus GG decreases TNF- α production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 277-285, 2003.

PERAN, L. et al. A comparative study of the preventative effects exerted by three probiotics, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 836-844, 2007.

PERDIGÓN, G. et al. Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 6, p. 1108-1114, 1999.

PISANU, S. et al. Characterization of size and composition of milk fat globules from Sarda and Saanen dairy goats. **Small Ruminant Research**, v. 109, p. 141-151, 2013.

PLESSAS, S.; BOSNEA, L.; ALEXOPOULOS, A.; BEZIRTZOGLOU, A. Potencial effects of probiotics in cheese and yogurt production: a review. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 4, p. 433-440, 2012.

POSECION, N. C. et al. The development of a goat's milk yogurt. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p.1909-1913, 2005.

PRAKASH, A. et al. Effect of different doses of Manuka honey in experimentally induced inflammatory bowel disease in rats. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 1511-1519, 2008.

RAJENDRAN, P. et al. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332-347, 2014.

RANADHEERA, C. S. et al. Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1411-1418, 2012.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1-7, 2010.

RANSFORD, R. A. J., LANGMAN, M. J. S. Sulphasalazine and mesalazine: serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the Committee on Safety of Medicines. **Gut**, v. 51, p. 536-539, 2002.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208-212, 1963.

ROSS, R. P. et al. Cheese delivering biocultures-probiotic cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2, p. 71-78, 2002.

RUSS, A.-L. E. **Effects of dietary sheep, cow and goat milk solids on colitis in the interleukin-10 gene deficient mouse model of Inflammatory Bowel Disease**. 2013. 251p. Tese de Doutorado. Massey University, Nova Zelândia, 2013.

RUSS, A. et al. Post-weaning effects of milk and milk components on the intestinal mucosa in inflammation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 690, p. 64-70, 2010.

SAAD, N. et al. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 1-16, 2013.

SALVA, S. et al. Development of a fermented goats' milk containing *Lactobacillus rhamnosus*: in vivo study of health benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2355-2362, 2011.

SÁNCHEZ, B. et al. Probiotic fermented milks: Present and future. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 4, p. 472-483, 2009 .

SANCHEZ-MUÑOZ, F.; DOMINGUEZ-LOPEZ, A.; YAMAMOTO-FURUSHO, J. K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 27, p. 4280-4288, 2008.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

SANSONETTI, P. J. War and peace at the intestinal epithelial surface: an integrated view of bacterial commensalism versus bacterial pathogenicity. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, 46 Suppl 1:E6-E7, 2008.

SARTOR, R. B. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v 3, n.7, p. 390-407, 2006.

SERVIN, A. L.; COCONNIER, M.-H. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 741-754, 2003.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 849-907, 2000.

SILANIKOVE, N. et al. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. **Small Ruminant Research**, v. 89, p. 110-124, 2010.

SIMMS, L.A. et al. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. **Gut**, v. 57, p. 903-910, 2008.

SLAČANAC, V. et al. Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 2, p. 171-189, 2010.

STROBER, W., FUSS, I. J. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 140, p. 1756-1767, 2011.

STROBER, W., FUSS, I., MANNON, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 3, p. 514-521, 2007.

SUBRAHMANYAM, M. Topical application of honey for burn wound treatment - an overview. **Annals of Burns and Fire Disasters**, vol. XX, n. 3, p. 137-139, 2007.

SUNG, M. K.; PARK, M. Y. Nutritional modulators of ulcerative colitis: Clinical efficacies and mechanistic view. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, p. 994-1004, 2013.

SZALAI, Z. et al. Anti-inflammatory effect of recreational exercise in TNBS-induced colitis in rats: Role of NOS/HO/MPO system. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-11, 2013.

TAMIME, A. Y. et al. Popular ovine and caprine fermented milks. **Small Ruminant Research**, v. 101, p. 2-16, 2011.

TAUPIN, D.; PODOLSKY, D. K. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, p. 721-732, 2003.

TURNER, J. R. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. **The American Journal of Pathology**, v. 169, n. 6, p. 1901-1909, 2006.

VERMA, G. et al. Immunoinflammatory responses in gastrointestinal tract injury and recovery. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 2, p. 143-140, 2013.

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

VIUDA-MARTOS, M. et al. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. R117-R124, 2008.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; TEIXEIRA F. C. Alimentos funcionais: conceitos básicos. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 20 p. – (**Embrapa Clima Temperado. Documentos, 312**), 2010.

WANG, Y.-C.; YU, R.-C; CHOU, C.-C. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, v. 23, p. 128-135, 2006.

WEHKAMP, J. et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 50, p. 18129-18134, 2005.

APÊNDICE A

Outros Resultados

Parâmetros Murinométricos

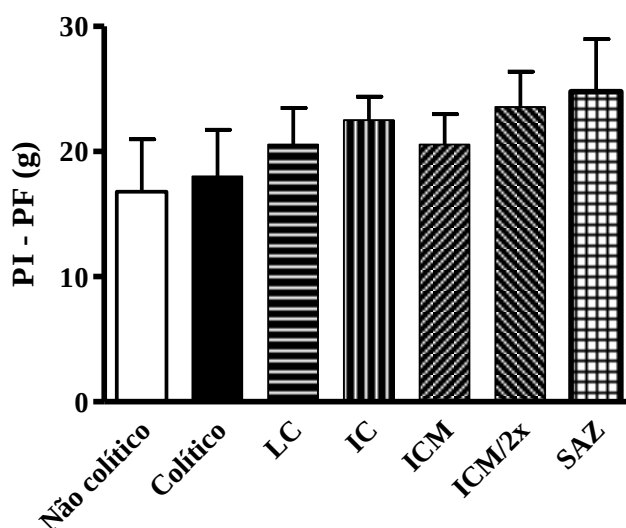


Figura 1 – Variação de peso corporal dos animais do experimento. Dados expressos como média $\pm$ d.p.m. (ANOVA seguida do teste de Tukey; n=10 por grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos. LC: Leite de cabra; IC: Iogurte caprino (sem mel); ICM: Iogurte caprino com mel; ICM/2x: Iogurte caprino com mel (2x ao dia); SAZ: Sulfassalazina; PI: Peso inicial; PF: Peso final

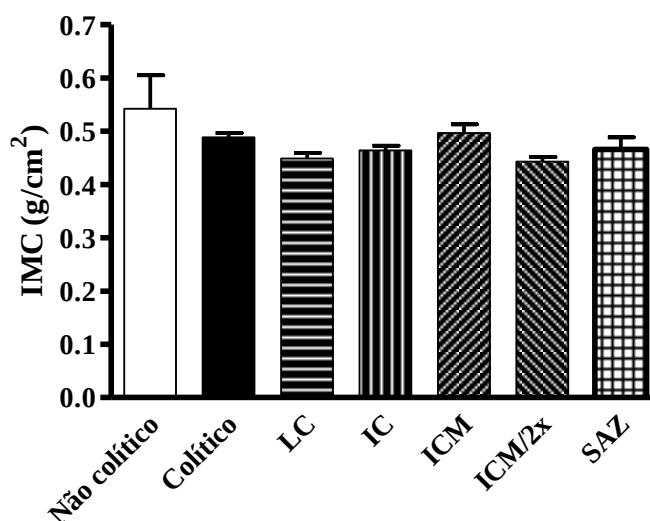


Figura 2 – Índice de Massa Corporal (IMC) dos animais do experimento. Dados expressos como média $\pm$ d.p.m. (ANOVA seguida do teste de Tukey; n=10 por grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos. LC: Leite de cabra; IC: Iogurte caprino (sem mel); ICM: Iogurte caprino com mel; ICM/2x: Iogurte caprino com mel (2x ao dia); SAZ: Sulfassalazina

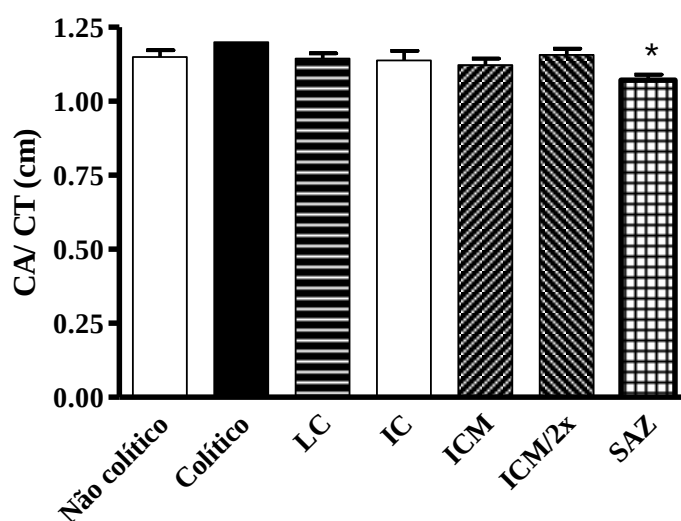


Figura 3 – Circunferência Abdominal (CA)/ Circunferência Torácica (CT) dos animais do experimento. Dados expressos como média $\pm$ d.p.m. (ANOVA seguida do teste de Tukey; $n=10$ por grupo). $^*(p < 0,05)$ vs. Grupo colítico. LC: Leite de cabra; IC: Iogurte caprino (sem mel); ICM: Iogurte caprino com mel; ICM/2x: Iogurte caprino com mel (2x ao dia); SAZ: Sulfassalazina

Parâmetros Bioquímicos

Tabela 1 – Valores médios dos parâmetros bioquímicos em função dos grupos experimentais.

Grupos Experimentais	CT (mg/ dL)	HDL-c (mg/ dL)	TG (mg/ dL)	GLICEMIA (mg/ dL)
Não colítico	58,50 $\pm$ 8,09b	47,80 $\pm$ 8,77b	49,40 $\pm$ 16,74b	160,00 $\pm$ 38,02a
Colítico	69,83 $\pm$ 14,77b	35,67 $\pm$ 9,97b	121,67 $\pm$ 42,76ab	140,50 $\pm$ 32,46a
LC	80,33 $\pm$ 18,66ab	43,33 $\pm$ 7,38b	144,89 $\pm$ 64,26a	130,89 $\pm$ 21,63a
IC	72,50 $\pm$ 14,19b	44,88 $\pm$ 13,12b	126,63 $\pm$ 50,76a	134,63 $\pm$ 36,72a
ICM	72,78 $\pm$ 12,07b	43,78 $\pm$ 9,42b	113,56 $\pm$ 47,96a	132,44 $\pm$ 35,84a
ICM/2x	76,14 $\pm$ 9,55ab	36,43 $\pm$ 6,85b	127,00 $\pm$ 21,88a	122,71 $\pm$ 31,87a
SAZ	95,86 $\pm$ 14,63a	73,71 $\pm$ 15,40a	54,86 $\pm$ 11,54b	104,57 $\pm$ 43,31a

Dados expressos como média $\pm$ d. p. m. (ANOVA seguida do teste de Tukey; $n=10$ por grupo) Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). LC: Leite de cabra; IC: Iogurte caprino (sem mel); ICM: Iogurte caprino com mel; ICM/2x: Iogurte caprino com mel (2x ao dia); SAZ: Sulfassalazina; CT: Colesterol Total; HDL-c: Colesterol HDL; TG: Triglicerídeos.

APÊNDICE B

Artigo: Atividade anti-inflamatória intestinal de leite de cabra e iogurte caprino em modelo de colite induzida com ácido acético em ratos

Periódico: Journal of Functional Foods
Fator de Impacto: 4,480
Qualis: A2

Atividade anti-inflamatória intestinal de leite de cabra e iogurte caprino em modelo de colite induzida com ácido acético em ratos

^aPaloma Oliveira Antonino de Assis, ^cGerlane Coelho Bernardo Guerra, ^aDaline Fernandes de Souza Araújo, ^aTamires Alcântara Dourado Gomes Machado, ^aTamires Alcoforado Sena de Lima, ^bHugo Enrique Mendez Garcia, ^cAurigena Antunes de Araújo, ^dRaimundo Fernandes de Araújo Júnior, ^aLeylliane de Fátima Leal Interaminense de Andrade, ^{a*}Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga

P.O.A. Assis^a, G.C.B. Guerra^c, D.F.S. Araújo^a, T.A.D.G. Machado^a, T.A.S. Lima^a, H.E.M. Garcia^b, A. A. Araújo^c, R. F. A. Júnior^d, L.F.L. Interaminense^a, R.C.R.E. Queiroga^{a*}

^aDepartamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Brasil

^bDepartamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Brasil

^cDepartamento de Biofísica e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil

^dDepartamento de Morfologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil

*Autor Correspondente: rcqueiroga@uol.com.br

Laboratório de Bromatologia, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária – João Pessoa – PB – Brasil – CEP: 58051-900. Telefone: +55 83 32167826; +55 83 88468387

RESUMO

Neste estudo, o efeito anti-inflamatório intestinal do leite e do iogurte caprino adicionado de *Lactobacillus acidophilus*, acrescido ou não de abelhas nativas (*Melipona scutellaris*), foi avaliado em ratos com colite induzida por ácido acético 10%. O pré-tratamento com o leite e iogurte caprino e sulfassalzina, melhorou significativamente a atividade da mieloperoxidase (MPO), os níveis de Interleucina (IL)-1 β e do Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α . Provocou redução significativa do estresse oxidativo, observado pela redução de Malondialdeído (MDA) e elevação de glutatona. Este efeito também foi demonstrado pela preservação da citoarquitetura colônica, diminuição da expressão de Cicloxygenase (COX)-2 e Óxido Nítrico Sintetase Induzida (iNOS). Os resultados sugerem que o leite e o iogurte caprino e a sulfassalazina exerceram efeito preventivo no dano intestinal induzido pelo ácido acético e que o leite e iogurte caprino podem atuar como um potencial alimento funcional na Doença Inflamatória Intestinal (DII).

Palavras-chave: leite de cabra, probiótico, iogurte, mel, colite.

1. Introdução

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) compreende a Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerativa (CU), é uma doença debilitante e imunologicamente mediada, caracterizada por respostas inflamatórias excessivas e efetoras da mucosa que levam à destruição do tecido no trato gastrointestinal (Viladomiu, Hontecillas, Yuan, Lu & Bassaganya-Riera, 2013). A etiologia da DII é desconhecida, mas, uma alteração no sistema imune intestinal contribui para que a inflamação ocorra (Gálvez et al., 2001). Isto resulta no aumento da síntese e liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, incluindo espécies reativas de oxigênio (EROs), metabólitos de nitrogênio, os eicosanóides, quimiocinas e citocinas, que contribuem para perpetuar a resposta inflamatória no intestino (Strober & Fuss, 2011; Gálvez, 2014). Por sua vez, as citocinas como Interleucina (IL)-1 e Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α . podem induzir a expressão de Óxido Nítrico Sintetase Induzida (iNOS) (Kolios, Ronney, Murphy & Westwrick, 1998) e Cicloxigenase (COX)-2 (Stenson, 2008) nas células epiteliais colônicas. A COX-2, enzima indutiva, tem sua expressão aumentada na doença inflamatória intestinal em humanos, bem como em modelo animal (Kountouras, 2005). Como também, a super-regulação de iNOS está correlacionada com a inflamação intestinal e o excesso de óxido nítrico produzido por iNOS pode exacerbar as características clínico-patológicas da DII por citotoxicidade direta, a ativação de neutrófilos (Ribbons et al., 1995), vasodilatação, redução do tônus muscular liso (Middleton, Shorthouse & Hunter, 1995) e aumento da produção de nitrosaminas (Ohshima & Bartsch, 1994).

O leite e seus derivados podem prover o suporte nutricional necessário a pacientes com inflamação intestinal, visto que seus componentes apresentam efeitos benéficos à saúde gastrointestinal, podendo ser úteis como parte da alimentação (Russ et al., 2010). O leite de cabra é um alimento nutricional e terapêutico que possui características únicas e benéficas que são superiores ao leite bovino (Slačanac et al., 2010). É menos alergênico e possui melhor digestibilidade, podendo ser consumido como alternativa para o leite de vaca (García, Rovina, Boutoia & López, 2014). No que diz respeito a alimentos funcionais, evidências tem mostrado que o leite de cabra é uma excelente matriz para o desenvolvimento desses produtos (Silanikove, Leitner, Merin & Prosser, 2010) e os benefícios nutricionais desses produtos lácteos podem ser aprimorados enriquecendo-os com cepas probióticas (Mukdsi, Haro, González & Medina, 2013).

As espécies de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., e *L. casei* são as bactérias ácido lácticas comumente utilizadas em produtos lácteos fermentados (Ashraf, Vasiljevic, Day, Smith & Donkor, 2014). Um produto lácteo deve conter, pelo menos, 10^6 UFC/ mL no momento de seu consumo (Shah, 2000; Plessas, Bosnea, Alexopoulos & Bezirtzoglou, 2012). Os alimentos probióticos proporcionam benefícios à saúde, pois ajudam na manutenção de um bom equilíbrio e composição da flora intestinal, e aumentam a resistência contra a invasão de patógenos (Tripathi & Giri, 2014). O iogurte é um produto lácteo fermentado que transporta bactérias viáveis com efeitos de promoção da saúde (Morelli, 2014). Estudos tem demonstrado o iogurte sendo eficaz em modelos experimentais de DII (Gobbato, Rachid & Perdigón, 2008; LeBlanc, Chaves & Perdigón, 2009). O iogurte de leite de vaca é largamente consumido (Ranadheera, Evans, Adams & Baines, 2012), no entanto, existe uma elevada demanda por alternativas para o leite de vaca, devido a problemas associados com alergenidade, desordens gastrointestinais e desejos por novos produtos lácteos (Haenlein, 2004; Ranadheera, Evans, Adams & Baines, 2012). O iogurte de cabra constitui-se uma matriz adequada para inclusão de ingredientes como frutas cristalizadas, geleias, mel, nozes, que são bem aceitos pelos consumidores (García, Rovina, Boutoial, & López. 2014). Dentre os ingredientes citados, o mel destaca-se por suas propriedades nutricionais, funcionais e biológicas, podendo ser usado como alimento funcional devido a seu elevado potencial antioxidante natural, embora seja mais amplamente utilizado como adoçante (Viuda-martos, Ruiz-Navajas, Fernández,-López & Pérez-Álvarez, 2008). Foi demonstrado que o mel foi eficaz em modelos experimentais de ratos com colite (Mahgoub, el-Medany, Hagar & Sabah, 2002; Prakash et al., 2008).

Evidências sobre a importância nutricional e terapêutica do leite de cabra, bem como, as propriedades funcionais dos probióticos e do mel, levaram a elaboração do iogurte caprino adicionado de mel. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito anti-inflamatório intestinal do leite e do iogurte caprino adicionado de *Lactobacillus acidophilus*, acrescido ou não de mel de abelhas nativas (*Melipona scutellaris*), em ratas com colite induzida.

2. Materiais e Métodos

2.1. Leite de cabra

O leite de cabra “in natura” foi obtido da Cooperativa dos Produtores Rurais de Monteiro Ltda – CAPRIBOM

2.2. Iogurte

O iogurte caprino foi elaborado de acordo com Machado et al. (2015). O leite de cabra “in natura” foi pasteurizado (65 °C/ 30min), resfriado, adicionado o açúcar, submetido a tratamento térmico (90 °C/ 15min), resfriado (45°C) e, acrescidas as culturas starter (0,4 g/ litro) e probiótica (0,1 g/ litro) (CHR Hansen). Logo após, foi fermentado (4hrs), refrigerado e adicionado o mel (10%), envasado e armazenado sob refrigeração. O produto final apresentou contagem de 10^7 UFC/ mL.

2.3. Drogas e reagentes

Todos os reagentes foram obtidos da Sigma Chemicals (São Paulo), ácido acético e etanol (Química Nova), anticorpo óxido nítrico sintetase e cioxigenase foram obtidos da Santa Cruz Biotecnologia (Santa Cruz, USA) e kits para citocinas, TNF- α e IL-1 β , foram obtidos da R&D System (Minneapolis, USA).

2.4. Animais

Ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus albinus*), (190-240 g) foram fornecidas pelo Centro de Biotecnologia – Cbiotec/UFPB, mantidas em temperatura ambiente de 22°C $\pm$ 2 °C, ciclo claro/escuro de 12/12 h, com livre acesso à ração Presence-Purina® e água. Uso aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Cbiotec/UFPB), protocolo n° 0109/13.

2.5. Desenho experimental

Ratos Wistar fêmeas foram divididos aleatoriamente em 7 grupos (n=10): Não colítico; Colítico; Leite de Cabra (LC); Iogurte Caprino sem mel (IC); Iogurte Caprino adicionado de

Mel (10%) (ICM), Iogurte Caprino adicionado de Mel (10%) duas vezes ao dia (ICM/2x) e Sulfassalazina (250 mg/kg) (SAZ). Todos os grupos, exceto o ICM/2x, foi administrado 1 mL do produto, diariamente, via oral, durante catorze dias antes da indução da colite e 24 horas depois.

2.6. Indução da colite

A colite foi induzida pelo método descrito originalmente por Mac Pherson e Pfeiffer (1978), e posteriormente modificado por Millar et al. (1996). Os animais submetidos a jejum de 24 horas, posteriormente anestesiados com ketamina/xilazina e, foi administrado, via retal, ácido acético (0,5 mL de 10% v/v em solução salina 0,9%) por meio de cânula de 2 mm de diâmetro introduzida 8 cm de profundidade. Após administração, o animal foi mantido em posição elevada por 30 segundos e em seguida, devolvidos às suas gaiolas para se recuperar da anestesia. O grupo não-colítico recebeu 0,5 mL de solução salina via retal. Dois dias depois os animais foram eutanasiados, sob anestesia (ketamina/xilazina), e os seus cólons foram removidos para a avaliação do dano macroscópico, histopatológico e parâmetros bioquímicos.

2.7. Avaliação macroscópica do cólon

O cólon dos animais foi limpo de gordura e mesentérico, pesado e medido o comprimento, em seguida aberto longitudinalmente para avaliar a extensão e a severidade do dano macroscópico, em uma escala de 0-10, segundo o modelo descrito por Bell, Gall e Wallace (1995). Em seguida, o cólon foi dividido, longitudinalmente, em quatro partes e congelado a -80°C até a análise. O fragmento destinado à determinação de glutathione foi pesado e congelado a -80 °C com 1 mL de 5% (p/v) de ácido tricloroacético.

2.8. Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

A determinação da MPO em tecido colônico foi realizada pelo método descrito por Krawisz, Sharon e Stenson (1984); os resultados foram expressos em U/g de tecido e uma unidade de MPO (U) foi considerada como aquela que degrada 1 nmol/min de peróxido de hidrogênio a 25 °C.

2.9. Conteúdo de Malondialdeído (MDA)

A determinação do conteúdo de MDA foi realizada pelo método descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990) e os resultados expressos em nmol/g tecido.

2.10. Conteúdo de Glutathiona Total

A determinação do conteúdo de glutathiona total foi realizada pelo método descrito por Anderson (1985) e os resultados foram expressos em nmol/g de tecido.

2.11. Dosagem de citocinas

Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α e Interleucina (IL)-1 β foram quantificados por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando kit ELISA (DY510, R&D System), conforme instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em ng/g de tecido.

2.12. Análise histológica

O material coletado para avaliação histopatológica foi obtido da zona de dano mais representativo e foram imediatamente fixados em formol tamponado a 10%. Os fragmentos do cólon foram selecionados, incluídos em parafina e realizados cortes com 5 μ m de espessura e, logo após, foram corados com hematoxilina e eosina. Segmentos equivalentes foram obtidos do grupo não-colítico. Os cortes histológicos foram avaliados pelo grau de infiltração leucocitária e sua distribuição no tecido colônico, utilizando-se os parâmetros (Tecido normal, Infiltração leve, Infiltração moderada e Infiltração intensa), além da verificação da presença/ausência de parâmetros indicadores de um processo inflamatório, como o edema, a perda da citoarquitetura normal do tecido e os pontos de necrose e destruição.

2.13. Análise imunohistoquímica de COX-2 e iNOS

Três cortes finos (4 μ m) de cólons (3 animais por grupo) foram obtidos com um micrótomo e transferidas para lâminas lâminas silinizadas. Cada corte foi desparafinado e reidratado. Secções de tecido do cólon foram lavadas com 0,3% de Triton X-100 em tampão fosfato,

colocado peroxidase endógena (3% de peróxido de hidrogénio), e incubadas durante a noite a 4 °C com os seguintes anticorpos primários: COX-2, 1:600; iNOS, 1:700 (Santa Cruz, USA). Depois, as seccções foram lavadas com tampão fosfato e incubadas com um anticorpo secundário estreptavidina-HRP-conjugada (Biocare Medical, Concord, CA, EUA) durante 30 minutos, e a imunorreatividade de COX-2 e iNOS foi visualizada utilizando um kit de detecção baseada em colorimétrico seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (TrekAvidin-HRP Label + Kit from Biocare Medical, Dako, USA). Controles positivos e negativos foram incluídas em cada grupo. Foi utilizado microscopia planimétrica (Olympus BX50, Departamento de Morfologia/ UFRN) com objetiva de alta potência (40x). A intensidade da imunocoloração de células foi determinada e score de 1 a 4 foi atribuído: 1= ausência de células positivas; 2 = pequeno número de células positivas ou células isoladas; 3 = número moderado de células positivas; e 4 = elevado número de células positivas. A intensidade de marcação foi avaliada por dois examinadores previamente treinados de forma duplo-cego. Foram avaliados três cortes por animal.

2.14. Análise estatística

As análises das diferenças entre as médias foram avaliadas através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Tukey. Os dados não paramétricos (escore) foram analisados utilizando-se o teste de Mann-Whitney. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$, utilizando o programa estatístico GraphPad Prisma 4.

3. Resultados

3.1. Efeito do leite e iogurte caprino na avaliação macroscópica do dano colônico

O dano induzido pela instilação intra-retal de ácido acético (0,5 mL de 10% v/v) em ratos caracteriza-se por ulceração e grave inflamação ao longo do tecido do cólon, ao contrário dos ratos que receberam solução salina que estavam sem inflamação. A administração do leite, do iogurte caprino e sulfassalazina (250 mg/kg) durante quatorze dias antes da indução da colite mostrou proteção significativa contra o dano ($p < 0,01$), com consequente redução da extensão e gravidade da inflamação colônica em comparação com o grupo colítico, não havendo diferença entre os grupos tratados (Tabela 1). Além disso, os segmentos do cólon apresentaram espessamento da parede do intestino; foi observado um aumento significativo na

relação peso/comprimento do cólon, em comparação com os animais do grupo não-colítico ($p < 0,05$) (Tabela 1). Em contrapartida, o grupo SAZ diferiu de todos os grupos experimentais ($p < 0,01$) (Não apresentado).

Tabela 1 – Efeito da administração do leite e iogurte caprino no dano macroscópico intestinal induzido com ácido acético

Grupos experimentais	Score do dano	Relação Peso/Comprimento (mg/cm)
Não colítico	0 (0)	85,55±6,76
Colítico	8 (7-9)	173,73±37,18 [#]
LC	5 (4-6) ^{**}	154,25±14,13 [#]
IC	4,5 (2-6) ^{**}	136,71±13,89 [#]
ICM	4 (4-5) ^{**}	143,52±20,38 [#]
ICM/2X	4 (4-5) ^{**}	135,44±13,93 [#]
SAZ	4,5 (4-5) ^{**}	252,2±51,81 [#]

Dados do score foram expressos em mediana, n=10. Relação peso/comprimento foi expressa em média±DPM, n=10. LC: Leite de cabra; IC: Iogurte caprino sem mel; ICM: Iogurte caprino com mel; ICM/2x: Iogurte caprino com mel (2x ao dia); SAZ: Sulfassalazina

^{**} $p < 0,01$ vs grupo colítico

[#] $p < 0,05$ vs grupo não colítico

3.2. Efeito do leite e iogurte caprino na atividade de MPO, MDA e Glutathione

A atividade colônica da MPO se mostrou elevada nos animais do grupo colítico em comparação com o não colítico ($p < 0,01$) (Fig. 1A). A administração do leite de cabra, o iogurte caprino e sulfassalazina (250 mg/kg) antes da indução da colite provocou significativa redução da MPO ($p < 0,01$), em relação ao grupo colítico, porém, não houve variação entre os grupos tratados (Fig. 1A).

Como consequência do processo inflamatório, uma alteração no estado oxidativo colônico foi registrado, conforme apresentado na Fig. 1, os animais do grupo colítico apresentaram aumento nos níveis de MDA em comparação com o não colítico ($p < 0,01$) (Fig. 1B) e uma significativa redução nos níveis de glutathione foi notado ($p < 0,01$) (Fig. 1C). Em adição, houve uma redução nos níveis de MDA (Fig 1B) e a prevenção da depleção de glutathione (Fig. 1C), em comparação com o grupo colítico, nos animais que receberam tanto o leite de cabra quanto o iogurte caprino e sulfassalazina (250 mg/kg), o que se associa com a melhora do estresse oxidativo ($p < 0,01$). O grupo LC diferiu do grupo SAZ ($p < 0,05$) para MDA (não apresentado), e o grupo SAZ diferiu dos grupos LC, IC e ICM/2x ($p < 0,01$) para a determinação de glutathione (Dados não apresentados).

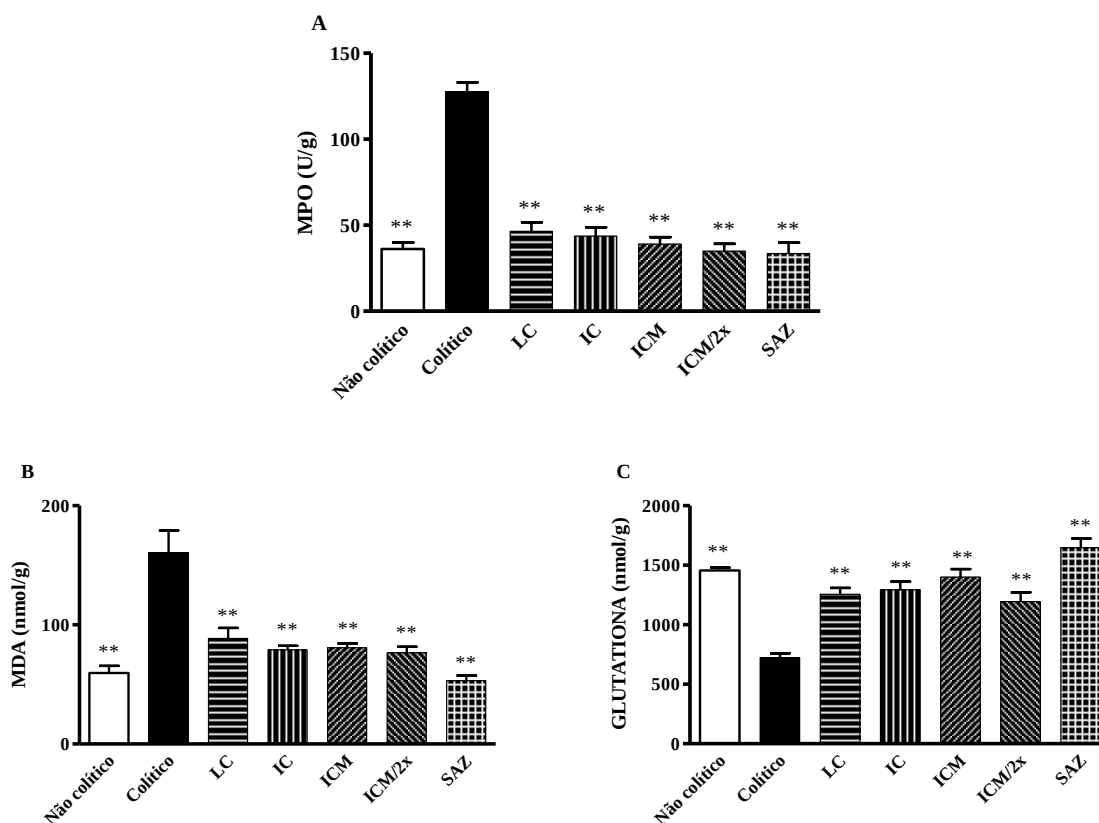


Fig. 1 – Efeito da administração do leite e iogurte caprino na atividade da MPO (A) e nos níveis de MDA (B) e Glutathione (C) na inflamação intestinal induzida com ácido acético. Dados foram expressos em média $\pm$ DPM, n=10. LC: Leite de cabra; IC: Iogurte caprino sem mel; ICM: Iogurte caprino com mel; ICM/2x: Iogurte caprino com mel (2x ao dia); SAZ: Sulfassalazina
****P <0,01 vs grupo colítico**

3.3. Efeito do leite e iogurte caprino nos níveis das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL1- β)

Um aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (Fig. 2A) e IL1- β (Fig. 2B) foi observado nos animais do grupo colítico, em comparação com os animais do grupo não colítico ($p < 0,01$). Houve uma redução nos níveis das citocinas nos animais que receberam tanto o leite de cabra quanto o iogurte caprino e sulfassalazina (250 mg/kg) em relação ao grupo colítico ($p < 0,01$). (Fig 2) O Grupo Sulfassalazina diferiu dos grupos não colíticos, LC, ICM e ICM/2x ($p < 0,01$) para TNF- α (Não apresentado). O mesmo não foi observado para IL1- β , não havendo diferença entre os grupos tratados (Fig. 2B).

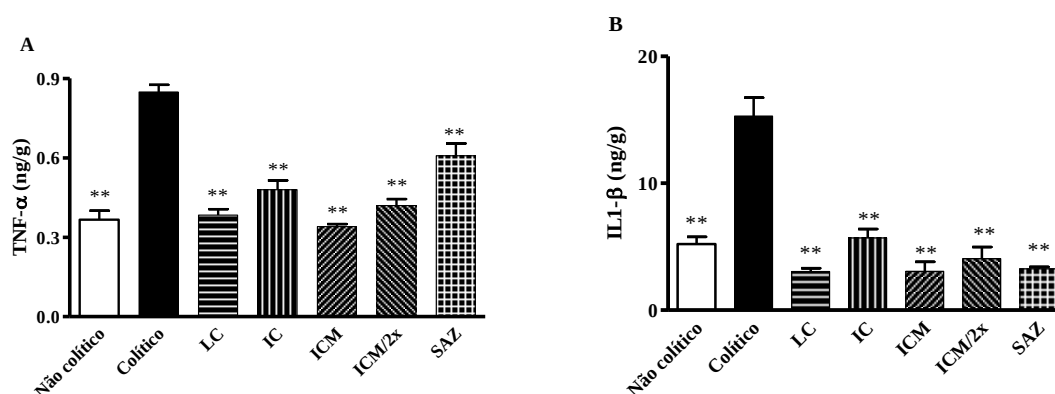


Fig. 2 – Efeito da administração do leite e iogurte caprino nos níveis de TNF- α (A)/ IL1- β (B) na inflamação intestinal induzida com ácido acético. Dados foram expressos em média $\pm$ DPM, n=10. LC: Leite de cabra; IC: Iogurte caprino sem mel; ICM: Iogurte caprino com mel; ICM/2x: Iogurte caprino com mel (2x ao dia); SAZ: Sulfassalazina

****** $p < 0,01$ vs grupo colítico

3.4. Efeito do leite e iogurte caprino nos achados histopatológicos

A avaliação histológica do cólon dos animais do grupo colítico revelou infiltração intensa, perda da arquitetura tecidual, com destruição do epitélio e consequente destruição das células caliciformes e presença de hemorragia (Fig. 3b). O LC apresentou infiltração leve, preservação do epitélio e todas as camadas do órgão, presença de hemorragia com vasodilatação (Fig. 3c). Infiltração moderada com presença de polimorfonucleares e discreta hemorragia foram notadas no IC (Fig. 3c). No ICM foi observada infiltração moderada, presença de vasodilatação e congestão sanguínea nas criptas, seguido de estase sanguínea na submucosa (Fig. 3e), enquanto que uma infiltração leve com polimorfonucleares e presença de leve hemorragia na submucosa foram encontrados no ICM/2x (Fig. 3f). Por fim, o grupo SAZ apresentou estruturas morfológicas preservadas e discretos infiltrados inflamatórios de polimorfonucleares na lâmina própria e submucosa (Fig. 3g). O cólon dos animais do grupo não-colítico revelou-se um tecido normal com preservação total do órgão e ausência de processo inflamatório (Fig. 3a).

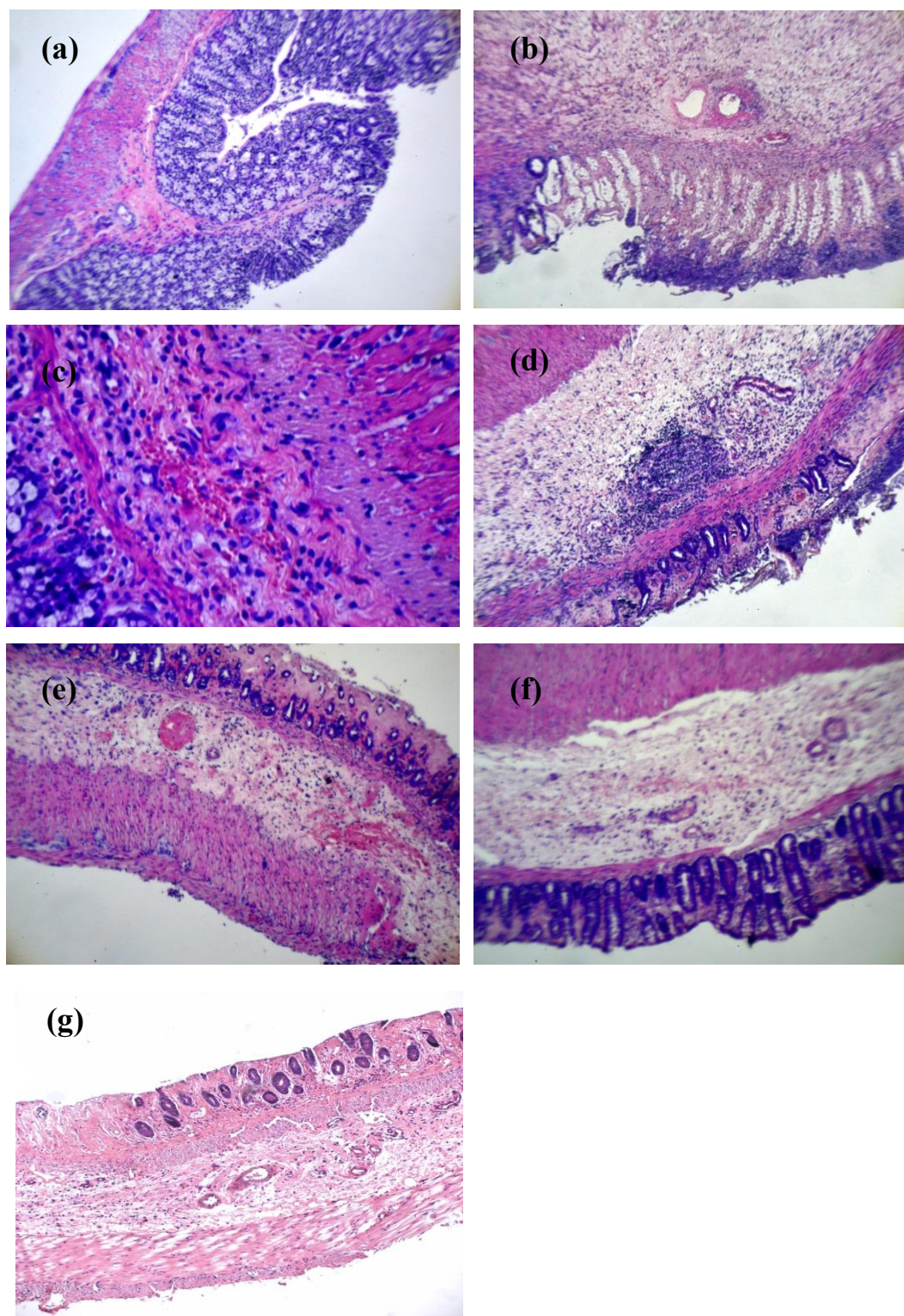
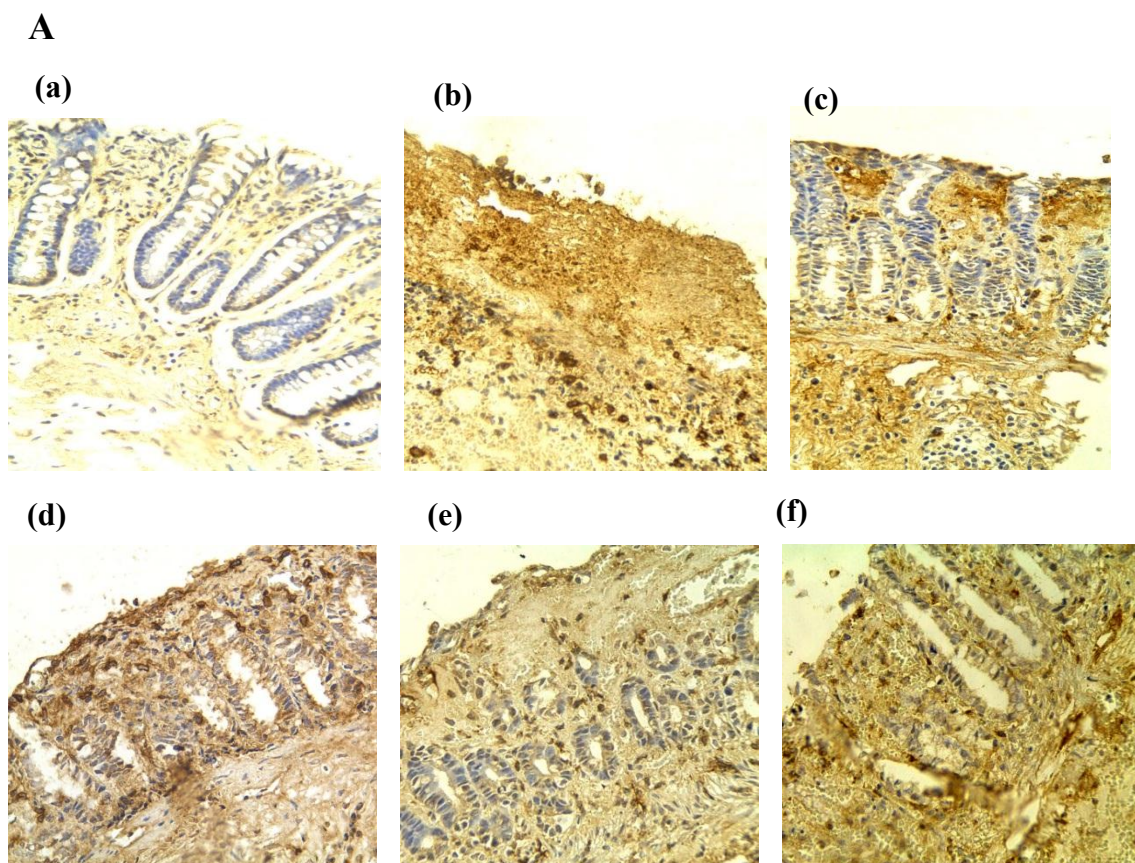


Fig. 3 – Microfotografia de corte histológico examinado e corado com H/E, apresentando fragmento do cólon cortado no sentido longitudinal. (a) Não colítico (b) Colítico (c) LC (d) IC (e) ICM (f) ICM/2x (g) SAZ. Aumento total 100x. LC: Leite de cabra; IC: Iogurte caprino sem mel; ICM: Iogurte caprino com mel; ICM/2x: Iogurte caprino com mel (2x ao dia); SAZ: Sulfassalazina

3.5. Efeito do leite e iogurte caprino na análise imunohistoquímica

O grupo não-colítico apresentou baixa marcação para mediadores COX-2 e iNOS (Fig.4A e 4B; Fig. 5A e 5B, respectivamente). A análise imunohistoquímica revelou que a administração do LC, ICM e ICM2x reduziu significativamente a marcação das enzimas COX-2 e iNOS nas áreas de tecido ($p < 0,05$) (Fig. 4A e 4B; Fig. 5A e 5B, respectivamente). O grupo colítico era fortemente positivo para os mediadores avaliados, COX-2 e iNOS ($p < 0,05$) (Fig. 4A e 4B; Fig. 5A e 5B, respectivamente), em comparação com o grupo não-colítico.



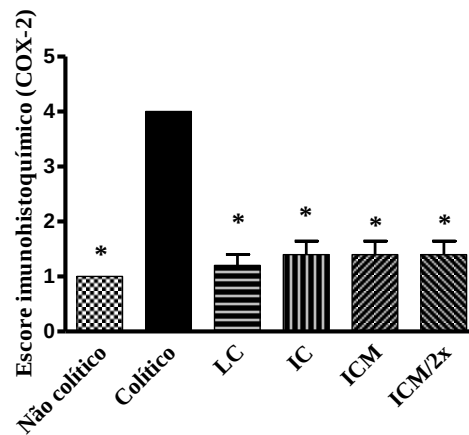
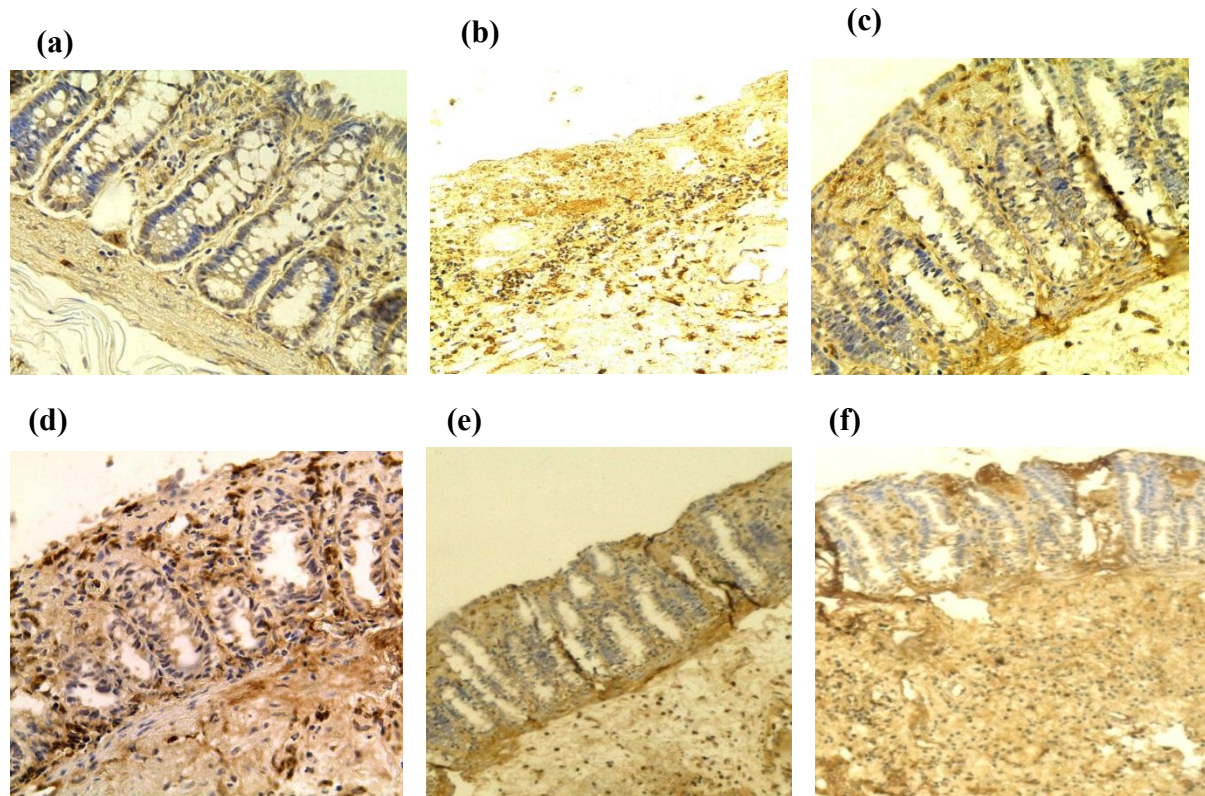
B

Fig. 4 – (A) Efeito do leite e iogurte caprino sobre a COX-2. Para cada antígeno, três seções imunomarcadas foram analisadas por animal ($n = 3/$ grupo). Ampliação de 40 vezes, escala bar = 100 μ m. (a) Não colítico (b) Colítico (c) LC (d) IC (e) ICM (f) ICM/2x. LC: Leite de cabra; IC: Iogurte caprino sem mel; ICM: Iogurte caprino com mel; ICM/2x: Iogurte caprino com mel (2x ao dia). **(B)** amostras representativas apresentadas em gráficos que resumem pontuação média do grupo, mostrando imunoreatividade a COX-2. Expresso em mediana (três seções por animal; $n=3/$ grupo).

* $p < 0,05$ vs grupo colítico

A

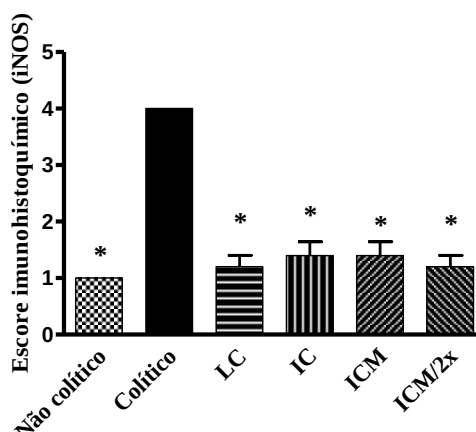
B

Fig. 5 – (A) Efeito do leite e iogurte caprino sobre o iNOS. Para cada antígeno, três seções imunomarcadas foram analisadas por animal (n = 3/ grupo). Ampliação de 40 vezes, escala bar = 100 mm. (a) Não colítico (b) Colítico (c) LC (d) IC (e) ICM (f) ICM/2x. LC: Leite de cabra; IC: Iogurte caprino sem mel; ICM: Iogurte caprino com mel; ICM/2x: Iogurte caprino com mel (2x ao dia). (B) amostras representativas apresentadas em gráficos que resumem pontuação média do grupo, mostrando imunoreatividade ao iNOS. Expressa em média±DPM (três seções por animal; n=3/ grupo).

* $p < 0,05$ vs grupo colítico

4. Discussão

DII são condições crônicas caracterizadas por super-regulação de mediadores pró-inflamatórios e resposta imune descontrolada. Nesta patologia, a mucosa intestinal apresenta inflamação permanente resultante da ativação de células do sistema imunológico e infiltração de células inflamatórias da circulação (Podolsky, 2002). A ativação dessas células é eventualmente acompanhada pelo aumento de mediadores inflamatórios, como o TNF- α e IL1- β , principais citocinas imunomoduladoras que ativam uma cascata de eventos e células do sistema imunológico (Abraham & Cho, 2009). Estes compostos pró-inflamatórios levam ao recrutamento de mais células inflamatórias ao local da lesão, produzindo EROs. O processo inflamatório na DII está associado com o desenvolvimento de importante estresse oxidativo (Buffinton & Doe, 1995; Ioannidis, Varnalidis, Paraskevas & Botsios, 2011), que pode ser evidenciado nos modelos experimentais de colite (Guerra et al., 2015, Dodda, Chhajed & Mishra, 2014; Algieri et al., 2013, Gálvez et al., 2001). Como consequência da infiltração de neutrófilos no intestino inflamado, ocorre a liberação de mieloperoxidase, enzima responsável pela superprodução de EROs que provoca diminuição das defesas antioxidantes intestinais, como a glutatona e a peroxidação de lipídeos, gerando Malondialdeído, produto final do

processo de peroxidação lipídica, que pode ser detectado em amostras biológicas e é amplamente utilizado para se avaliar o estresse oxidativo (Opara, 2006). Tem sido relatado que a produção de EROs é consideravelmente aumentada na biópsia do cólon de pacientes com DII em comparação com a mucosa normal (Lih-Brody et al., 1996).

Os resultados obtidos com este estudo demonstram o efeito preventivo do leite e do iogurte caprino no modelo agudo de colite induzida com ácido acético. A administração do leite, do iogurte caprino e da sulfassalazina provocou uma marcante redução do dano colônico macroscópico, com diminuição da inflamação ao longo do tecido do cólon dos animais, que foi também evidenciada no estudo histológico, com a redução da infiltração leucocitária e preservação da arquitetura tecidual do órgão, com consequente preservação do epitélio. O efeito inibitório da infiltração de células na mucosa colônica exercido tanto pelo leite quanto pelo iogurte caprino e sulfassalazina foi corroborado pela redução da atividade de MPO.

O estresse oxidativo foi avaliado pelos níveis de MDA, produto da peroxidação lipídica, levando a dados oxidativos no tecido intestinal. Tanto o leite como o iogurte caprino e a sulfassalazina provocou melhoras neste marcador. Além disso, a glutathione, que atua como a primeira linha de defesa contra o dano oxidativo, foi determinada para avaliar a integridade do sistema de defesa antioxidante e teve seus níveis substancialmente diminuídos em ratos com colite induzida por ácido acético. No entanto, tanto a administração do leite, quanto do iogurte caprino e da sulfassalazina elevou níveis de glutathione para a normalidade. Estes dados estão em concordância com outros autores que mostraram que a suplementação de glutathione no modelo experimental de colite induzida por TNBS, foi capaz de contribuir para a recuperação da lesão da mucosa (Loguercio et al., 2003).

O leite é relatado por ser uma boa fonte de antioxidantes, sendo o leite de cabra particularmente rico em cisteína (Russ et al., 2010) e glutathione peroxidase, um ingrediente importante do leite, pois faz parte de um sistema de defesa contra micro-organismos indesejáveis (Slačanac et al. 2010). Além disso, as proteínas do leite de cabra podem ser mais facilmente digeridas e, por este motivo, o leite caprino pode ser utilizado como um alimento alternativo para a dieta de pacientes com úlcera e colite ulcerativa (Park, 1994; Slačanac et al., 2010).

A atividade antiinflamatória intestinal também pôde ser evidenciada pela diminuição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias, pois os grupos que receberam o leite e o iogurte caprino e sulfassalazina apresentaram uma importante redução nos níveis colônicos de TNF- α e IL1- β . O envolvimento do TNF- α na DII é um fator bastante relevante, o qual pode ser verificado em estudos que procuraram avaliar a aplicação de tratamentos voltados para sua

diminuição na mucosa intestinal, assim como verificado por Blandino et al. (2001), que comprovaram a efetividade de um composto orgânico sintético, inibidor da produção de TNF- α e IL- β , como um importante atenuante do dano causado na mucosa colônica por modelo de indução da colite com ácido acético.

A COX-2, enzima indutiva presente nos locais de inflamação, tem sua produção estimulada pelo TNF- α , IL1 e outros mediadores (Stenson, 2008). A medida da COX-2 vem sendo realizada com o intuito de demonstrar o grau de inflamação, bem como caracterizar a melhora do processo inflamatório (Martin, Villegas & Alarcón de la Lastra, 2005). Assim como a COX-2, citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , podem induzir a atividade de iNOS com consequente aumento na produção de óxido nítrico nas células epiteliais colônicas, sendo associados com a iniciação e manutenção da inflamação na DII (Kolios, Valata & Ward, 2004). No presente trabalho, a redução de TNF- α e IL- β foi acompanhada de significativa redução na expressão de COX-2 e iNOS nos grupos que receberam o leite e iogurte caprino.

O leite de cabra é considerado uma fonte natural de oligossacarídeos, podendo ser aplicados na nutrição humana, devido tanto a sua composição como sua concentração (Martinez-Ferez et al., 2006). Os oligossacarídeos do leite caprino foram demonstrados por serem eficazes em ratos com modelo experimental de colite induzida com TNBS (Daddaoua et al., 2006) e sulfato de sódio dextran (DSS) (Lara-Villoslada et al., 2006), possuindo efeitos anti-inflamatórios, com redução do dano intestinal e melhora de marcadores inflamatórios e expressão de alguns genes, podendo ser útil na DII. Em adição, o perfil de micro-organismos presentes no leite exerce efeito direto na saúde dos consumidores de produtos lácteos, em função de diversos compostos formados, destacando-se que, no leite de cabra cru os *Firmicutes*, especialmente, bactérias ácido lácticas e outras bactérias clássicas do leite formam apenas uma pequena parte do perfil bacteriano total do leite caprino, sendo que o *Actinobacteria* e *Proteobacteria* compõe a maior parte do microbioma (McInnis, Kalanetra, Mills & Maga, 2015). O iogurte é conhecido por suas propriedades terapêutica, nutricional e sensorial (Gonzalez, Adhikari & Sancho-madriz, 2011), sendo amplamente aceito pelos consumidores. LeBlanc e Perdígón (2010) afirmam que o iogurte modula a resposta imune pela estimulação da produção de citocinas e regulando esta produção, a fim de evitar uma exacerbação da resposta imune inflamatória. Estudo realizado por LeBlanc, Chaves e Perdígón (2009) mostrou que a administração de iogurte convencional, antes e depois da inoculação com TNBS, exerceu efeito anti-inflamatório, reduzindo o dano colônico, aumentando os níveis de IL-10 no tecido intestinal, enquanto que houve diminuição nos

níveis de citocinas pró-inflamatórias. No presente estudo, as propriedades do leite de cabra foram preservadas no iogurte caprino, visto que, a elaboração deste produto, com a adição de probiótico e mel, não alterou os parâmetros avaliados, quando comparado ao leite caprino.

O mel, por sua vez, é relatado por apresentar propriedades anti-inflamatórias (Bogdanov, Jurendic, Sieber & Gallman, 2008; Alvarez-Suarez, Giampieri & Battino, 2013) e os compostos fenólicos, a vitamina C e as enzimas presentes no mel desempenham atividade antioxidante (Khalil, Sulaiman & Boukraa, 2010). Bilsel et al. (2002) demonstraram que a administração de mel foi tão eficaz quanto o tratamento com prednisolona em um modelo inflamatório da colite, sendo que o mecanismo proposto foi impedindo a formação de radicais livres no tecido inflamado. Porém, no presente trabalho, não foi observada diferença entre os grupos com iogurte caprino adicionado ou não de mel para os parâmetros inflamatórios ou de estresse oxidativo, talvez devido à concentração utilizada, pois, o mel foi adicionado para melhorar a palatabilidade do produto, tendo em vista que o leite de cabra apresenta um sabor peculiar.

Em conclusão, tanto o leite de cabra quanto o iogurte caprino e a sulfassalazina possuem atividade anti-inflamatória intestinal, quando administrado como um pré-tratamento no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos. Este resultado foi evidenciado pela redução do dano do tecido colônico, com preservação da citoarquitetura do tecido, diminuição dos mediadores pró-inflamatórios, acompanhado pela melhoria do estresse oxidativo. Portanto, estes produtos lácteos caprinos podem ser uma alternativa valiosa aos medicamentos tradicionais e um potencial alimento funcional para a prevenção da DII.

Agradecimentos

Os autores são gratos a CAPES e ao CNPq (Processo: 403020/2013-1 Edital: Chamada N° 39/2013 MCTI/ CT – AGRONEGÓCIO/ CNPq/ LINHA 2: Produto Lácteo) pelo suporte financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

Referências

- Abraham, C., & Cho, J. H. (2009). Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine*, 361, 2066–2078.
- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., & Battino, M. (2013). Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 20(5), 621–638.
- Algieri, F., Zorrilla, P., Rodriguez-Nogales, A., Garrido-Mesa, N., Bañuelos, O., González-Tejero, M. R., Casares-Porcel, M., Molero-Mesa, J., Zarzuelo, A., Utrilla, M. P., Rodriguez-Cabezas, M. E., & Galvez, J. (2013). Intestinal anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Phlomis purpurea* L. and *Phlomis lychnitis* L. in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Journal of Ethnopharmacology*, 146, 750–759.
- Anderson, M. E. (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology*, 113, 548–555.
- Asharaf, R., Vasiljevic, T., Day, S. L., Smith, S. C., & Donkor, O. N. (2014). Lactic acid bacteria and probiotic organisms induce different cytokine profile and regulatory T cells mechanisms. *Journal of Functional Foods*, 6, 395–409.
- Bell, C. J., Gall, D. G., & Wallace, J. L. (1995). Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *American Journal of Physiology*, 268, 622–630.
- Bilsel, Y., Bugra, D., Yamaner, S., Bulut, T., Cevikbas, U., & Turkoglu, U. (2002). Could honey have a place in colitis therapy? Effects of honey, prednisolone and disulfiram on inflammation, nitric oxide and free radical formation. *Digestive Surgery*, 19, 306–311.
- Blandino, I. I., Otaka, M., Jin, M., Komatsu, K., Odashima, M., Konishi, N., Sato, T., Kato, S., & Watanabe, S. (2001). FR167653, a potent suppressant of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α production, ameliorates colonic lesions in experimentally induced acute colitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 16(10), 1105–1111.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallman, P. (2008) Honey for Nutrition and Health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677–689.
- Buffinton, G. D., & Doe, W. F. (1995). Depleted mucosal antioxidant defenses in inflammatory bowel disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 19, 911–918.
- Daddaoua, A., Puerta, V., Requena, P., Martínez-Férez, A., Guadix, E., Medina, F. S., Zarzuelo, A., Suárez, M. D., Boza, J. J., & Martínez-Augustin, O. (2006). Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *The Journal of Nutrition*, 136(3), 672–676.
- Dodda, D., Chhajed, R., & Mishra, J. (2014). Protective effect of quercetin against acetic acid induced inflammatory bowel disease (IBD) like symptoms in rats: Possible morphological and biochemical alterations. *Pharmacological Reports*, 66, 169–173.
- Esterbauer, M., & Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonyldialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186, 407–421.
- Gálvez, J. (2014). Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. *ISRN Inflammation*, 2014, 928461. doi:10.1155/2014/928461.
- Gálvez, J., Coelho, G., Crespo, M. E., Cruz, T., Rodríguez-Cabezas, M. E., Concha, A., Gonzalez, M., & Zarzuelo, A. (2001). Intestinal anti-inflammatory activity of morin on chronic experimental colitis in the rat. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 15, 2027–2039.
- García, V., Rovina, S., Boutoia, K., & López, M. B. (2014). Improvements in goat milk quality: A review. *Small Ruminant Research* (in press). <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.12.034>

- Gobbato, N., Rachid, M., & Perdigón, G. (2008). Anti-inflammatory effect of yoghurt in a experimental inflammatory bowel disease in mouse. *Journal of Dairy Research*, 75, 497-504.
- Gonzalez, N.J., Adhikari, K., & Sancho-madriz, M. F. (2011). Sensory characteristics of peach-flavored yogurt drinks containing prebiotics and synbiotics. *LWT- Food Science and Technology*, 44, 158-163.
- Guerra, G. C. B., Araújo, A. A., Lira, G. A., Melo, M. N., Souto, K. K. O, Fernandes, D., Silva, A. L., & Júnior, R. F. A. (2015). Telmisartan decreases inflammation by modulating TNF- α , IL-10, and RANK/RANKL in a rat model of ulcerative colitis. *Pharmacological Reports* (in press). <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2014.12.011>
- Haenlein, G. F. W. (2004). Goat milk in a human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51, 155–163.
- Ioannidis, O., Varnalidis, I., Paraskevas, G., & Botsios, D. (2011). Nutritional Modulation of the Inflammatory Bowel Response. *Digestion*, 84(2), 89–101.
- Khalil, M. I.; Sulaiman, S. A.; Boukraa, L. (2010). Antioxidant properties of honey and its role in preventing health disorder. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3, 6–16.
- Kolios, G., Rooney, N., Murphy, C. T., Robertson, D. A. F., & Westwick, J. (1998). Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. *Gut*, 43, 56–63.
- Kolios, G., Valatas, V., & Ward, S. G. (2004). Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*, 113, 427–437.
- Kountouras, J. (2005). Cyclooxygenase-2 inhibitors and inflammatory bowel disease. *Annals of Gastroenterology*, 18(1), 14-15.
- Krawisz, J. E., Sharon, P., & Stenson, W. F. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*, 87 (6), 1344–50.
- Lara-Villoslada, F., Debras, E., Nieto, A., Concha, A., Gálvez, J., López-Huertas, E., Boza, J., Obled, C., & Xaus, J. (2006). Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Clinical Nutrition*, 25, 477–488.
- LeBlanc, A. M. Chaves, S. A., & Perdigón, G. (2009). Effect of yoghurt on the cytokine profile using a murine model of intestinal inflammation. *European Journal of Inflammation*, 7, 97–109.
- LeBlanc, A. M., & Perdigón, G. (2010). The application of probiotic fermented milks in cancer and intestinal inflammation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69, 421–428.
- Lih-Brody L., Powell, S. R., Collier, K. P., Reddy, G. M., Cerchia, R., Kahn, E., Weissman, G. S., Katz, S., Floyd, R. A., McKinley, M. J., Fisher, S. E., & Mullin, G. E. (1996). Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Science*, 41, 2078–2086.
- Loguercio, C., D'Argenio, G., Cave, M. D., Cosenza, V., Valle, N. D., Mazzacca, G., & Blanco, C. D. V. (2003). Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. *Digestive and Liver Disease*, 35(9), 635–641.
- MacPherson, B. R., & Pfeiffer, C. J. (1978). Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion*, 17(2), 135–150.
- Mahgoub, A. A., el-Medany, A. H., Hagar, H. H., & Sabah, D. M. (2002). Protective effect of natural honey against acetic acid-induced colitis in rats. *Tropical Gastroenterology*, 23, 82–87.
- Martin, A. R., Villegas, I., & Alarcón de la Lastra, C. (2005). The COX-2 inhibitor, rofecoxib, ameliorates dextran sulphate sodium induced colitis in mice. *Inflammation Research*, 54(4), 145–151.

- Martinez-Ferez, A., Rudloff, S., Guadix, A., Henkel, C. A., Pohlentz, G., Boza, J. J., Guadix, E. M., & Kunz, C. (2006). Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. *International Dairy Journal*, 16, 173–181.
- McInnis, E. A., Kalanetra, K. M., Mills, D. A., & Maga, E. A. (2015). Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. *Food Microbiology*, 46, 121–131.
- Middleton S. J., Shorthouse M., & Hunter J. O. (1993). Relaxation of distal colonic circular smooth muscle by nitric oxide derived from human leukocytes. *Gut*, 34, 814–817.
- Millar, A. D., Rampton, D. S., Chander, C. L., Claxson, A. W., Blade, S., Coumbe, A., Panetta, J., Morries, C. J., & Blake, D. R. (1996). Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease in a rat model of colitis. *Gut*, 39(3), 407–415.
- Morelli, L. (2014). Yogurt, living cultures, and gut health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99, 1248S–1450S.
- Mukdsi, M. C. A., Haro, C., González, S. N., & Medina, R. B. (2013). Functional goat milk cheese with feruloyl esterase activity. *Journal of Functional Foods*, 5, 801–809.
- Ohshima H., & Bartsch, H. (1994). Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Research*, 305, 253–264.
- Opara, E. C. (2006). Oxidative stress. *Disease-a-month*, 52, 183–198.
- Park, Y. W. (1994). Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Research*, 14, 151–159.
- Plessas, S., Bosnea, L., Alexopoulos, A., & Bezirtzoglou, A. (2012). Potencial effects of probiotics in cheese and yogurt production: a review. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 433–440.
- Podolsky, D. K. (2002). Inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine*, 347(6), 417–429.
- Prakash, A., Medhi, B., Avti, P. K., Saikia, U. N., Pandhi, P., & Khanduja, K. L. (2008). Effect of different doses of Manuka honey in experimentally induced inflammatory bowel disease in rats. *Phytotherapy Research*, 22, 1511–1519.
- Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2012). Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. *Food Chemistry*, 135, 1411–1418.
- Ribbons, K. A., Xiao-Jing Zhang, X.-J., Thompson, J. H., Greenberg, S. S., Moore, W. M., Kornmeier, C. M., Currie, M. G., Lerche, N., Blanchard, J., Clark, D. A., & Miller, M. J. S. (1995). Potential role of nitric oxide in a model of chronic colitis in rhesus macaques. *Gastroenterology*, 108, 705–711.
- Russ, A., Barnett, M., McNabb, W., Anderson, R., Reynolds, G., & Roy, N. (2010). Post-weaning effects of milk and milk components on the intestinal mucosa in inflammation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 690, 64–70.
- Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83, 849–907.
- Silanikove, N., Leitner, G., Merin, U., & Prosser, C. G. (2010). Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research*, 89, 110–124.
- Slačanac, V., Božanić, R., Hardi, J., Szabó, J. R., Lucan, M. & Krstanovic, V. (2010). Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *International Journal of Dairy Technology*, 63 (2), 171–189.

- Stenson, W. F. (2008). What Is the Function of Cyclooxygenases in the Normal and Inflamed Intestine? *Inflammatory bowel disease*, 14(S2), S104–S105.
- Strober, W., & Fuss, I. J. (2011). Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140, 1756–1767.
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225–241.
- Viladomiu, M., Hontecillas, R., Yuan, L., Lu, P., & Bassaganya-Riera, J. (2013). Nutritional protective mechanisms against gut inflammation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 929–939.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *Journal of Food Science*, 73(9), R117–R124.

APÊNDICE C

Article: Intestinal anti-inflammatory activity of goat milk and goat yogurt in the acetic acid model of rat colitis

Periodic: Journal of Functional Foods
Impact factor: 4,480
Qualis: A2

Intestinal anti-inflammatory activity of goat milk and goat yogurt in the acetic acid model of rat colitis

^aPaloma Oliveira Antonino de Assis, ^cGerlane Coelho Bernardo Guerra, ^aDaline Fernandes de Souza Araújo, ^aTamires Alcântara Dourado Gomes Machado, ^aTamires Alcoforado Sena de Lima, ^bHugo Enrique Mendez Garcia, ^cAurigena Antunes de Araújo, ^dRaimundo Fernandes de Araújo Júnior, ^aLeylliane de Fátima Leal Interaminense de Andrade, ^{a*}Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga

P.O.A. Assis^a, G.C.B. Guerra^{c*}, D.F.S. Araújo^a, T.A.D.G. Machado^a, T.A.S. Lima^a, H.E.M. Garcia^b, A. A. Araújo^c, R. F. A. Júnior^d, L.F.L. Interaminense^a, R.C.R.E. Queiroga^a

^aDepartment of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Brazil

^bDepartamen of Morphology, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Brazil

^cDepartment of Biophysical and Pharmacology, Biosciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte, Brazil

^dDepartamen of Morphology, Federal University of Rio Grande do Norte, Brazil

*Corresponding author: rcqueiroga@uol.com.br

Laboratório de Bromatologia, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária – João Pessoa – PB – Brasil – CEP: 58051-900. Telefone: +55 83 32167826; +55 83 88468387

ABSTRACT

In this study, the intestinal anti-inflammatory effect of goat milk and goat yogurt with addition of *Lactobacillus acidophilus*, with or without native bee honey (*Melipona scutellaris*) was evaluated in rats with 10% acetic acid-induced colitis. The pre-treatment with either goat milk, goat yogurt or sulfasalazine significantly improved the Myeloperoxidase (MPO) activity, levels of Interleukin (IL)-1 β and Tumor Necrosis Factor (TNF)- α . It also promoted a significant reduction in oxidative stress that could be seen by the reduction in Malondialdehyde (MDA) and the increase in glutathione. The benefit of the pre-treatments was also demonstrated in the preservation of colonic cytoarchitecture and the decreased expression of Cyclooxygenase (COX) -2 and Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS). These results suggest that goat milk, goat yogurt and sulfasalazine exert protective effects on intestinal damage induced by acetic acid and that goat milk and goat yogurt may act as functional foods in inflammatory bowel disease (IBD).

Keywords: goat milk, probiotic, yogurt, honey, colitis

1. Introduction

Inflammatory Bowel Disease (IBD), which comprises Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), is a debilitating and immunologically-mediated disease characterized by excessive inflammatory and effector mucosal responses; these responses leads to tissue destruction in the gastrointestinal tract (Viladomiu, Hontecillas, Yuan, Lu & Bassaganya-Riera, 2013). The etiology of IBD is unknown, but alterations in the intestinal immune system contribute to inflammation (Gálvez et al., 2001). This results in an increased synthesis and release of various proinflammatory mediators, including reactive oxygen species, nitrogen metabolites, eicosanoids, cytokines and chemokines, all of which contribute to the perpetuation of the inflammatory response in the intestine (Strober & Fuss, 2011; Gálvez, 2014). In turn, cytokines such as Interleukin (IL)-1 and tumor necrosis factor (TNF)- α can induce the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Kolios, Rooney, Murphy & Westwrick, 1998) and Cyclooxygenase (COX) -2 (Stenson, 2008) in colonic epithelial cells. COX-2 is an inducible enzyme that is increased in inflammatory bowel disease in humans and in animal models (Kountouras, 2005). Additionally, the upregulation of iNOS is correlated with intestinal inflammation and excess nitric oxide production by iNOS, which can exacerbate the clinicopathological features of IBD by direct cytotoxicity, activation of neutrophils (Ribbons et al., 1995), vasodilation, reduced smooth muscle tone (Middleton, Shorthouse & Hunter, 1995) and increased production of nitrosamines (Ohshima & Bartsch, 1994).

Milk and dairy products can provide nutritional support for patients with intestinal inflammation because their components confer benefits to gastrointestinal health and may be useful as part of the diet (Russ et al., 2010). Goat milk is a nutritional and therapeutic food that has unique beneficial features that are superior to bovine milk (Slačanac et al., 2010). It can be consumed as an alternative to cow's milk because it is less allergenic and has better digestibility (García, Rovina, Boutoial & López, 2014). With regard to functional foods, research has shown that goat milk (Silanikove, Leitner, Merin & Prosser, 2010), and the nutritional benefits of goat dairy products can be improved by enriching them with strains of probiotics (Mukdsi, Haro, González & Medina, 2013).

Lactobacillus acidophilus, *Bifidobacterium spp.*, and *L. casei* are lactic acid bacteria commonly used in fermented dairy products (Ashraf, Vasiljevic, Day, Smith & Donkor, 2014). A dairy product must contain at least 10^6 CFU/ ml bacteria at the time of its

consumption (Shah, 2000; Plessas, Bosnea, Alexopoulos & Bezirtzoglou, 2012). Probiotic foods provide health benefits because they help maintain a good balance and composition of intestinal flora and increase resistance against the invasion of pathogens (Tripathi & Giri, 2014). Yogurt is a fermented dairy product that contains viable bacteria with health-promoting effects (Morelli, 2014). Studies have demonstrated that yogurt is effective at reducing inflammation in experimental models of IBD (Gobbato, Rachid & Perdígón, 2008; LeBlanc, Chaves & Perdígón, 2009). Although yogurt from cow milk is largely consumed (Ranadheera, Evans, Adams & Baines, 2012), there is a high demand for alternatives to cow's milk due to problems associated with allergenic and gastrointestinal disorders and a desire for new dairy products (Haenlein, 2004; Ranadheera, Evans, Adams & Baines, 2012). Goat yogurt constitutes an appropriate matrix for the inclusion of ingredients such as candied fruit, jam, honey, nuts, which are well liked by consumers (García, Rovina, Boutoial, & López, 2014). Among the above ingredients, honey stands out for its nutritional, functional and biological properties and can be used as functional food due to its high natural antioxidant potential, although it is widely used as a sweetener (Viuda-martos, Ruiz-Navajas, Fernández, López, Pérez-Álvarez, 2008). It has been shown that honey was effective in experimental models of rats with colitis (Prakash et al, 2008; Bilsel et al., 2002).

Research on the nutritional and therapeutic importance of goat milk, as well as the functional properties of probiotics and honey, has led to the development of goat yogurt with honey. Therefore, this study aimed to evaluate the intestinal anti-inflammatory effect of goat milk and goat yogurt with addition of *Lactobacillus acidophilus*, with or without native bee honey (*Melipona scutellaris*), in rats with induced colitis.

2. Materials and methods

2.1. Goat milk

Goat milk "in natura" was obtained from the Cooperativa dos Produtores Rurais de Monteiro Ltda – CAPRIBOM – Brazil.

2.2. Goat yogurt

Goat yogurt was prepared in accordance with Machado et al., 2015. Goat milk "in natura" was pasteurized (65 °C/ 30 min), cooled, sugar was added, subjected to heat treatment (90 °C/

15 min), cooled (45 °C). The starter culture (0.4 g/ liter) and probiotic (0.1 g/ liter) were then added. Cultures were obtained from CHR Hansen. Next, the yogurt was fermented (4 h), cooled, and honey (10%) was added. The yogurt was packed and stored under refrigeration. The final product had a 10^7 CFU/ ml count.

2.3. Drugs and chemicals

All the reagents were obtained from Sigma Chemicals (São Paulo, Brazil). The acetic acid and ethanol were obtained from Nova Chemicals. The nitric oxide synthase and cyclooxygenase antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA), and the kits for the cytokines TNF- α and IL -1 β were obtained from R&D Systems (Minneapolis, USA).

2.4. Animals

Female Wistar rats (190–240 g) were provided by the Centro de Biotecnologia – Cbiotec/UFPB), housed at a temperature of 22 °C $\pm$ 2 °C under a 12 h/12 h light/dark cycle with free access to water and food (Purina®). The protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use (Cbiotec/UFPB), protocol n° 0109/13.

2.5. Experimental design

Female Wistar rats were randomized into 7 groups (n=10): Non-colitic; Colitic; Goat milk (GM); Goat yogurt (without honey) (GY); Goat yogurt with honey (10%) (GYH); Goat yogurt with honey (10%) twice a day (GYH/2x), and Sulfasalazine (250 mg/kg) (SAZ). All the groups, except the GYH/2x group, were orally administered 1 ml of their respective product daily for fourteen days before the colitis induction and 24 hours after the induction.

2.6. Colitis induction

Colitis was induced by the method originally described by Mac Pherson and Pfeiffer (1978) and subsequently modified by Millar et al. (1996) with minor adjustments. The animals were fasted 24 hours and then anesthetized with ketamine/xylazine. They were rectally administered acetic acid (0.5 ml 10% v/v in saline 0.9%) by 2 mm diameter cannula 8 cm

deep. After the administration, the animals were kept in a head-down position for 30 seconds and then returned to their cages to recover from anesthesia. The rats in the non-colitic group received 0.5 ml saline intracolonicallly. Two days later, the animals were sacrificed (under ketamine/xylazine anesthesia), and their colons were removed to assess the macroscopic damage and histological and biochemical parameters.

2.7. Macroscopic assessment of colonic damage

The colons of the animals were removed, placed on an ice-cold plate, cleaned of fat and mesentery, weighed, and the lengths were measured. The colon was opened longitudinally and evaluated for the extent and severity of macroscopic damage on a scale of 0-10 according to the model described by Bell, Gall and Wallace (1995). Then, the colon was divided longitudinally into four sections and frozen at -80 °C until analysis. The fragment for the determination of glutathione was weighed and frozen at -80 °C with 1 ml of 5% (w/v) trichloroacetic acid.

2.8. Myeloperoxidase activity (MPO)

The determination of MPO in the colonic mucosa was performed by the method described by Krawisz, Sharon and Stenson (1984). The results were expressed as U/g of wet tissue, and one unit of myeloperoxidase activity was defined as that degrading 1 nmol/min hydrogen peroxide at 25 °C.

2.9. Malonyldialdehyde content (MDA)

Colonic MDA content was evaluated according to the method proposed by Esterbauer and Cheeseman (1990) and expressed as nmol/ g wet tissue.

2.10. Total glutathione content

The total glutathione content determination was performed by the method described by Anderson (1985), and the results were expressed as nmol/ g tissue.

2.11. Cytokine assay

TNF- α and IL-1 β were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an ELISA kit (DY510, R&D System) according to the manufacturer's protocol. The results were expressed as ng/ g wet tissue.

2.12. Histological analysis

The material collected for the histopathologic evaluation was obtained from the most representative damage zone and was immediately fixed in 10% buffered formalin. Colon fragments were selected, embedded in paraffin, and 5 μ m thick slices were obtained. Shortly after, the slides were stained with hematoxylin and eosin. Equivalent colonic segments were also obtained from the non-colitic group. The histological sections were evaluated for the degree of leukocyte infiltration, leukocyte distribution in the colonic tissue using the parameters (normal tissue, light infiltration, moderate infiltration and intense infiltration), and the presence/absence of the indicators of an inflammatory process such as edema, loss of normal tissue and cytoarchitecture points of necrosis and destruction.

2.13. Immunohistochemical analysis of COX-2 and iNOS

Three thin sections of colon (4 μ m) (3 animals per group) were obtained with a microtome and transferred to gelatin-coated slides. Each tissue section was then deparaffinized and rehydrated. The colon tissue slices were washed with 0.3% Triton X-100 in phosphate buffer, quenched with endogenous peroxidase (3% hydrogen peroxide), and incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: COX-2, 1:600 and iNOS, 1:700 (Santa Cruz, USA). After the slices were washed with phosphate buffer, they were incubated with a streptavidin-HRP-conjugated secondary antibody (Biocare Medical, Concord, CA, USA) for 30 minutes. Immunoreactivity to COX-2 and iNOS was visualized using a colorimetric-based detection kit following the protocol provided by the manufacturer (TrekAvidin-HRP Label + Kit from Biocare Medical, Dako, USA). Known positive and negative controls were included in each batch. Using planimetry microscopy (Olympus BX50, Morphology Department/UFRN) with a high-power objective (40 $\times$). The intensity of immunostaining was determined, and scores from 1 to 4 were given: 1 = absence of positive cells; 2 = small

number of positive cells or isolated cells; 3 = moderate number of positive cells; and 4 = large number of positive cells. The labeling intensity was evaluated by two previously trained examiners in a double-blind fashion. Three sections per animal were evaluated.

2.14. Statistical analysis

All results are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. The differences between means were tested for statistical significance using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test. Nonparametric data (score) are expressed as the median (range) and were analyzed using the Mann-Whitney test. Statistical significance was set at $P < 0.05$ using the statistical program GraphPad Prism 4.

3. Results

3.1. Effect of goat milk and goat yogurt on macroscopic assessment of colonic damage

The damage induced by intrarectal instillation of acetic acid (0.5 ml of 10% v/v) in rats was characterized by severe inflammation and ulceration along the colonic tissue. The control rats given saline did not exhibit inflammation. The administration of goat milk, goat yogurt or sulfasalazine (250 mg/kg) for fourteen days prior to the induction of colitis showed significant protection against damage ($p < 0.01$) with a consequent reduction in the extent and severity of colonic inflammation compared to the colitic group and no differences between the treatment groups (Table 1). In addition, the colonic segments showed bowel wall thickening and a significant increase in the colonic weight/length ratio in comparison with the non-colitic animals ($p < 0.05$) (Table 1). In contrast, the SAZ group differed from all the experimental groups (not shown).

Table 1 –Effects of goat milk, goat yogurt and sulfasalazine (SAZ) on colonic macroscopic score and weight/length ratio in acetic acid rat colitis. Data (n = 10 per group) are expressed as means $\pm$ SDM.

Experimental groups	Damage score	Weight/length ratio (mg/cm)
Non-colitic	0 (0)	85,55 $\pm$ 6,76
Colitic	8 (7-9)	173,73 $\pm$ 37,18 [#]
GM	5 (4-6) ^{**}	154,25 $\pm$ 14,13 [#]
GY	4,5 (2-6) ^{**}	136,71 $\pm$ 13,89 [#]
GYH	4 (4-5) ^{**}	143,52 $\pm$ 20,38 [#]
GYH/2x	4 (4-5) ^{**}	135,44 $\pm$ 13,93 [#]
SAZ	4,5 (4-5) ^{**}	252,2 $\pm$ 51,81 [#]

Scores are expressed as median (range). Weight/length ratio data are expressed as mean $\pm$ S.D.M, n=10. GM: Goat milk; GY: Goat yogurt; GYH: Goat yogurt with honey; GYH/2x: Goat yogurt with honey (twice a day); SAZ: Sulfasalazine

^{**} $p < 0.01$ vs colitic group

[#] $p < 0.05$ vs non-colitic group

3.2. Effect of goat milk and goat yogurt on MPO, MDA and glutathione

Colonic MPO activity was high in the colitic group compared with the non-colitic group ($p < 0.01$) (Fig. 1A). The administration of goat milk, goat yogurt or sulfasalazine (250 mg/kg) before the colitis induction caused a significant reduction in MPO ($p < 0.01$) compared to the colitic group. However, there was no change between the treated groups (Fig. 1A).

As a consequence of inflammation, a change in oxidative status in the colon was recorded (Fig. 1). The animals from the colitic group showed an increase in the MDA levels in comparison with the non-colitic group ($p < 0.01$) (Fig. 1B), as well as a significant reduction in the glutathione levels ($p < 0.01$) (Fig. 1C). In addition, compared to the colitic group, the animals receiving either goat milk, goat yogurt or sulfasalazine (250 mg/ kg) were associated with an improvement in oxidative stress ($p < 0.01$) measured by a reduction in the MDA levels (Fig. 1B) and the prevention of glutathione depletion (Fig. 1C). The LC group differed from the SAZ group ($p < 0.05$) in MDA (not shown), and the SAZ group differed from the GM, GY and GYH/2x groups ($p < 0.01$) in glutathione (data not shown).

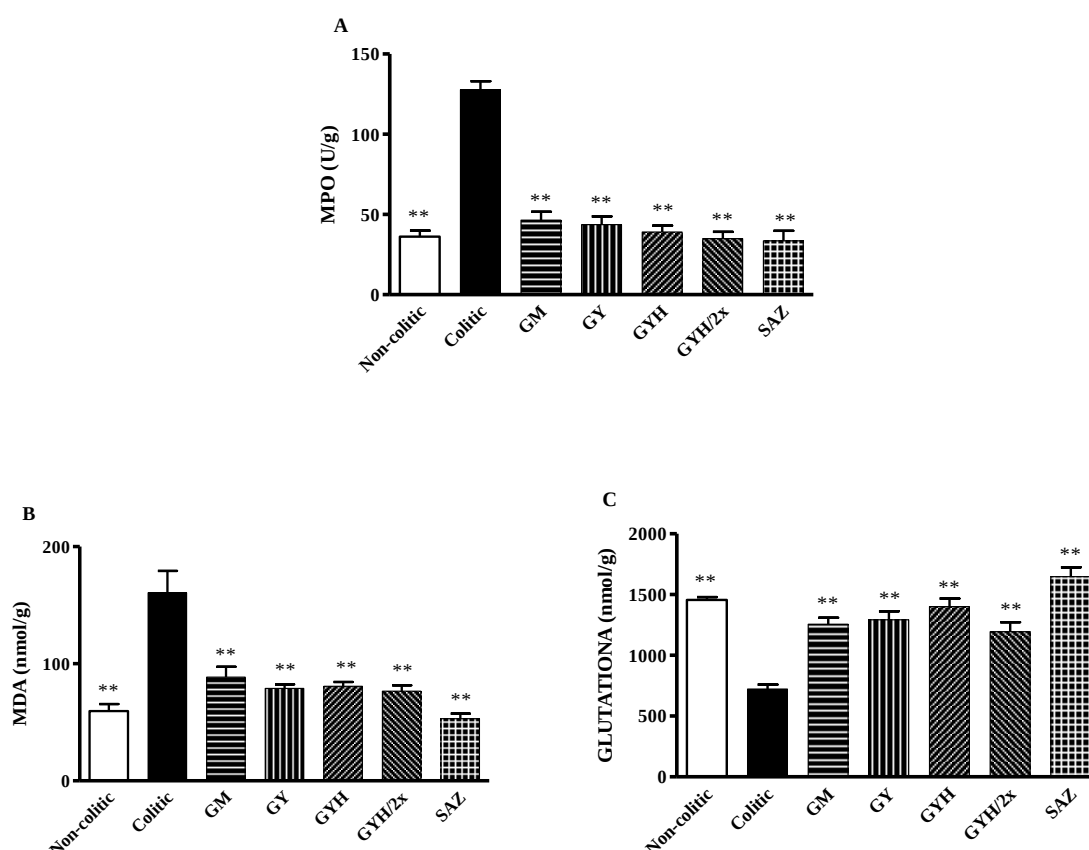


Fig. 1 – Effects of goat milk, goat yogurt and sulfasalazine (SAZ) on MPO activity (A) MDA levels (B) and glutathione content (C) in colonic tissue in acetic acid rat colitis. Data are expressed as mean $\pm$ S.D.M, n=10. GM: Goat milk; GY: Goat yogurt; GYH: Goat yogurt with honey; GYH/2x: Goat yogurt with honey (twice a day); SAZ: Sulfasalazine

**** $p < 0.01$ vs colitic group**

3.3. Effect of goat milk and goat yogurt on pro-inflammatory cytokines levels (TNF- α and IL1- β)

An increase in the levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α (Fig. 2A) and IL1- β (Fig. 2B) was observed in the animals in the colitic group compared with the animals in the non-colitic group ($p < 0.01$). There was a reduction in the cytokine levels in the animals receiving goat milk, goat yogurt or sulfasalazine (250 mg/kg) compared to the colitic group ($p < 0.01$). (Fig 2) The SAZ group differed from the non-colitic, GM, GYH and GYH/2x groups ($p < 0.01$) in TNF- α levels (not shown).

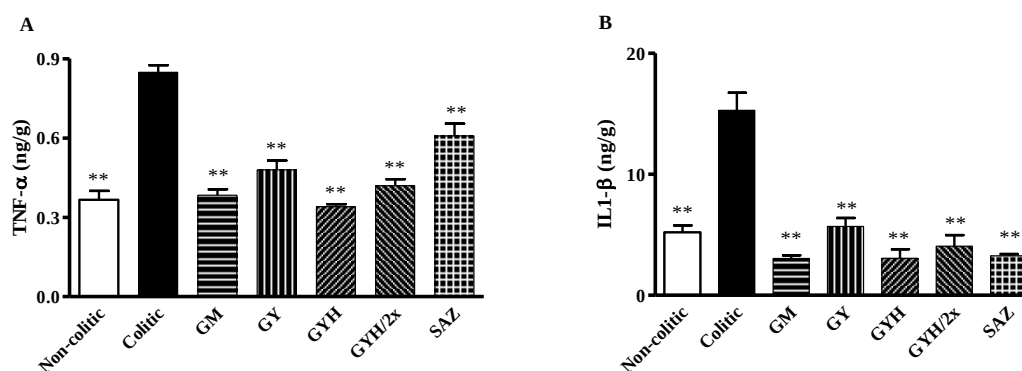


Fig. 2 – Effects of goat milk, goat yogurt and sulfasalazine (SAZ) on TNF- α (A) or IL1- β (B) levels in colonic tissue in acetic acid rat colitis. Data are expressed as mean $\pm$ S.D.M, n=10. GM: Goat milk; GY: Goat yogurt; GYH: Goat yogurt with honey; GYH/2x: Goat yogurt with honey (twice a day); SAZ: Sulfasalazine

**** $p < 0.01$ vs colitic group**

3.4. Effect of goat milk and goat yogurt on histopathological findings

The histological analysis of the colons of the animals in the colitic group revealed an intense leukocyte infiltration, loss of tissue architecture with the destruction of the epithelium and the consequent destruction of goblet cells, and the presence of hemorrhage (Fig. 3b). The GM group showed a mild infiltration, preservation of the epithelium and all the layers of the organ and presence of hemorrhage with vasodilation (Fig. 3c). A moderate infiltration with the presence of polymorphonuclear and slight hemorrhage were noted in the GY group (Fig. 3d). In the GYH group, a moderate infiltration, the presence of vasodilation and blood congestion in the crypts, followed by blood stasis in the submucosa were observed (Fig. 3e). A slight infiltration with polymorphonuclear cells and the presence of mild hemorrhage in the submucosa were found in the GYH/2x group (Fig. 3f). Finally, the SAZ group presented with preserved morphological structures and discrete inflammatory infiltrates of polymorphonuclear in the lamina propria and submucosa (Fig. 3 g). The colons of the animals in the non-colitic group had normal tissue with full organ preservation and an absence of inflammatory processes (Fig. 3a).

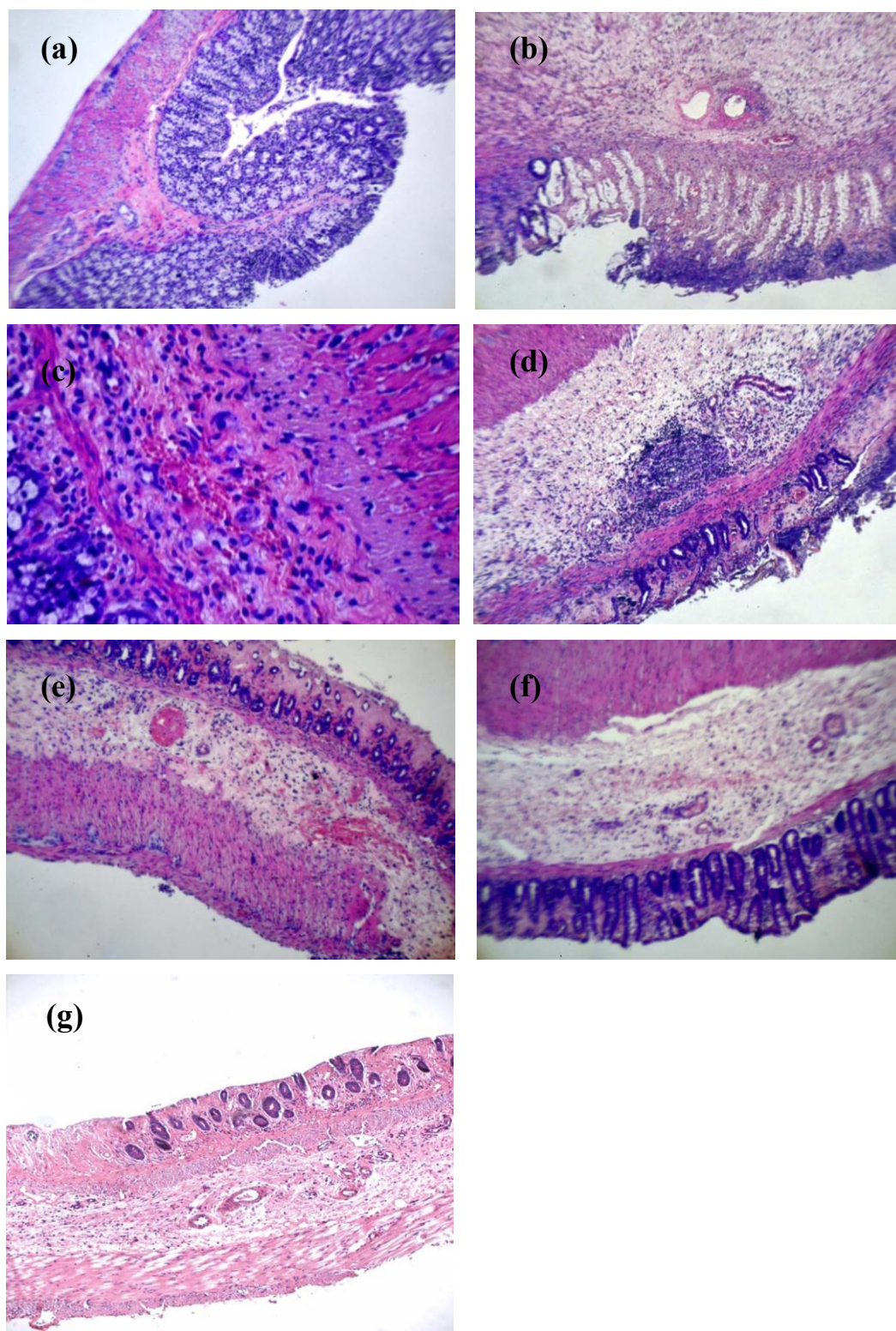
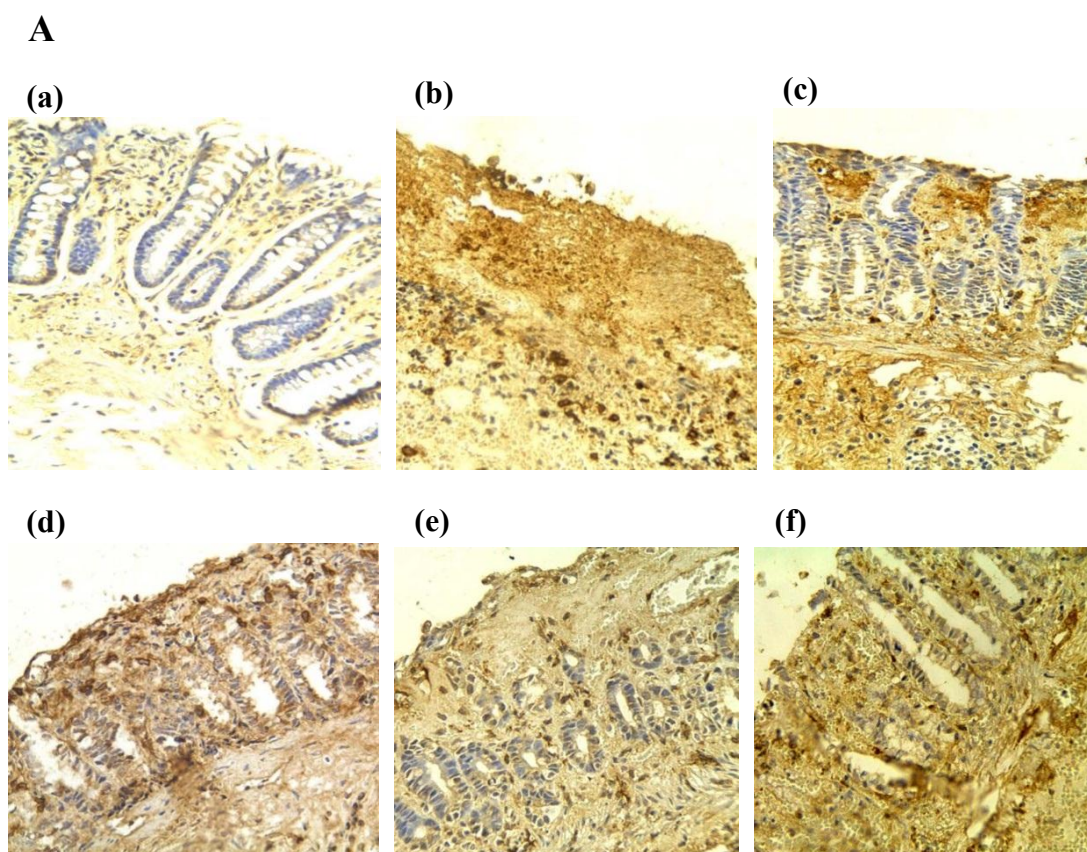


Fig. 3 – Histological sections of colonic tissue stained with haematoxylin and eosin showing the effects of goat milk, goat yogurt and sulfasalazine (SAZ) in acetic acid rat colitis. (a) Non-colitic (b) Colitic (c) GM (d) GY (e) GYH (f) GYH/2x (g) SAZ. Total increase 100x. GM: Goat milk; GY: Goat yogurt; GYH: Goat yogurt with honey; GYH/2x: Goat yogurt with honey (twice a day); SAZ: Sulfasalazine

3.5. Effect of goat milk and goat yogurt on immunohistochemical analysis

The non-colitic group exhibited a low expression of the mediators COX-2 and iNOS (Fig. 4A e 4B; Fig. 5A e 5B, respectively). The immunohistochemical analysis revealed that treatment with GYH and GYH/ 2x significantly reduced the expression of COX-2 and iNOS in the tissue ($p < 0.05$) (Fig. 4A and 4B; Fig. 5A and 5B, respectively). The colitic group was strongly positive for the COX-2 and iNOS mediators evaluated ($p < 0.05$) (Fig. 4A and 4B; Fig. 5A and 5B, respectively) compared to the non-colitic group.



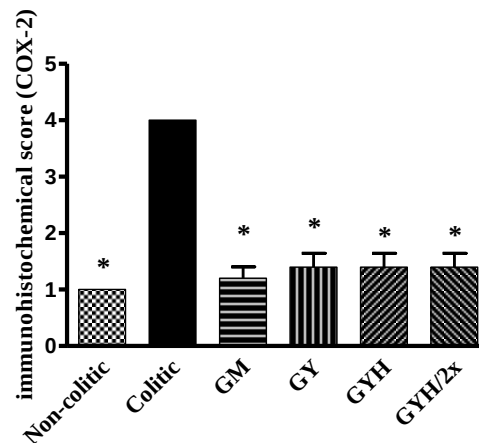
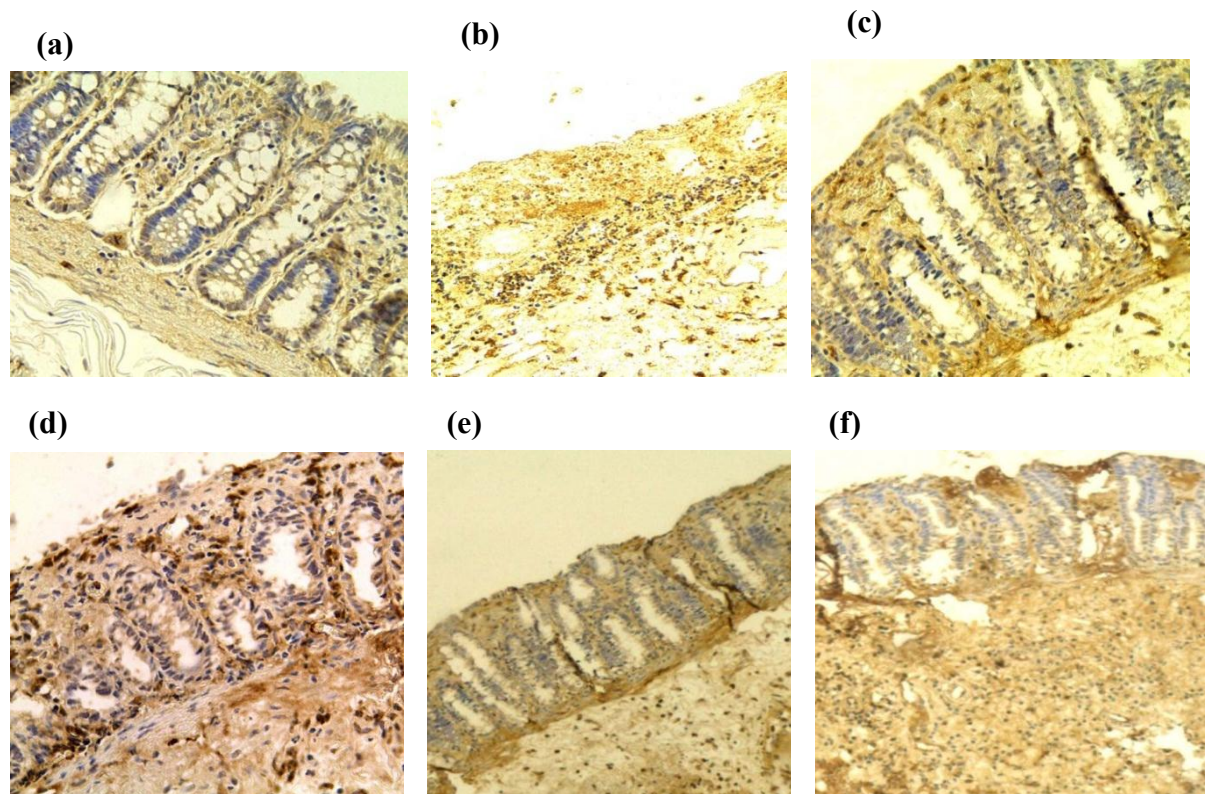
B

Fig. 4 – (A) Effect of goat milk and goat yogurt on COX-2 immunohistochemical analysis in acetic acid rat colitis. For each antigen, three immunolabeled sections were analyzed per animal (n = 3/group). Magnification 40×, scale bar = 100 μm. (a) Non-colitic (b) Colitic (c) GM (d) GY (e) GYH (f) GYH/2x GM: Goat milk; GY: Goat yogurt; GYH: Goat yogurt with honey; GYH/2x: Goat yogurt with honey (twice a day). **(B)** Representative samples from treatment groups are shown with graphs summarizing each group's mean score and showing immunoreactivity to COX-2. Expressed as median (range) (3 sections/animal; n=3/group).

* $p < 0.05$ vs colitic group

A

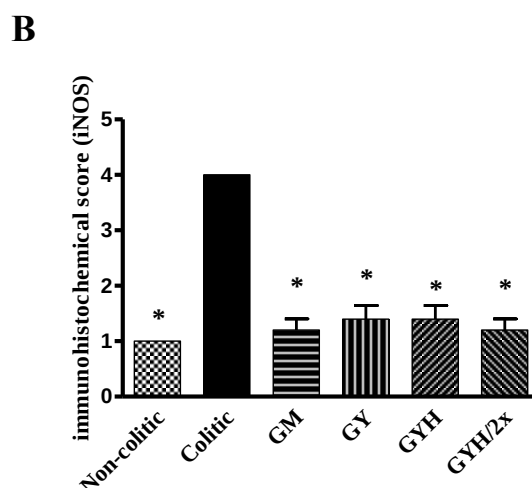


Fig. 5 – (A) Effect of goat milk and goat yogurt on iNOS immunohistochemical analysis in acetic acid rat colitis. Magnification 40×, scale bar = 100 μm. (a) Non-colitic (b) Colitic (c) GM (d) GY (e) GYH (f) GYH/2x GM: Goat milk; GY: Goat yogurt (without honey); GYH: Goat yogurt with honey; GYH/2x: Goat yogurt with honey (twice a day). (B) Representative samples from treatment groups are shown with graphs summarizing each group's mean score and showing immunoreactivity to iNOS. Expressed as median (range) (3 sections/animal; n=3/group). * $p < 0.05$ vs colitic group

4. Discussion

IBD is a chronic condition characterized by an upregulation of pro-inflammatory mediators and uncontrolled immune responses. In this disease, the intestinal mucosa has permanent inflammation resulting from immune cell activation and infiltration from the circulation (Podolsky, 2002). The activation of these cells is sometimes accompanied by an increase in inflammatory mediators such as TNF- α and IL1- β , which are the main immunomodulating cytokines that activate an inflammatory cascade of events and cells of the immune system (Abraham & Cho, 2009). These pro-inflammatory compounds lead to the recruitment of additional inflammatory cells to the site of injury to produce ROS. The inflammatory process of IBD is associated with the development of severe oxidative stress (Buffinton & Doe, 1995; Ioannidis, Varnalidis, Paraskevas & Botsios, 2011) that can be demonstrated in experimental models of colitis (Dodda, Chhajer & Mishra, 2014; Zorrilla et al., 2014; Guerra et al., 2015). As a result of neutrophil infiltration in the inflamed gut, myeloperoxidase is released. This enzyme is responsible for the overproduction of ROS, causing a decrease in intestinal antioxidant defenses, such as glutathione and lipid peroxidation, and leading to the production of Malondialdehyde (MDA), the final product of lipid peroxidation. MDA can be detected in biological samples and is widely used to evaluate the oxidative stress (Opara, 2006). It has

been reported that ROS production is significantly increased in colonic biopsies from patients with IBD compared to normal mucosa samples (Lih-Brody et al., 1996).

The results of this study demonstrate the prophylactic effect of goat milk and goat yogurt in an acute acetic acid colitis model. The administration of goat milk, goat yogurt or sulfasalazine caused a marked reduction in the macroscopic colonic damage, decreased the inflammation along the colonic tissue of the animals, which was demonstrated in the histological study, reduced the leukocyte infiltration and preserved the tissue architecture of the organ, with consequent preservation of the epithelium. Cellular infiltration into the colonic mucosa was inhibited by the goat milk, goat yogurt and sulfasalazine, which was confirmed by a reduction in MPO activity.

Oxidative stress in the intestinal tissue was evaluated using the MDA levels from the tissue because MDA is a lipid peroxidation product. Goat milk, goat yogurt and sulfasalazine caused improvements in this marker. Additionally, glutathione, which acts as the first line of defense against oxidative damage, was used to evaluate the integrity of the antioxidant defense system and was significantly reduced in the rats with colitis induced by acetic acid. However, the administration of goat milk, goat yogurt or sulfasalazine increased the glutathione levels to normal. These data are in agreement with other authors who have shown that the supplementation of glutathione in experimental models of colitis induced by TNBS is capable of contributing to the recovery from mucosal injury (Loguercio et al., 2003). Goat milk is reported to be a good source of antioxidants and is particularly rich in cysteine (Russ et al., 2010). Glutathione peroxidase, an important ingredient in goat milk, is part of a defense system against undesirable microorganisms (Slačanac et al. 2010). Moreover, goat milk proteins may be more easily digested, and for this reason, goat milk can be used as an alternative food in diets of patients with ulcerative colitis and ulcers (Park, 1994; Slačanac et al., 2010).

The intestinal anti-inflammatory activity of goat milk and yogurt could also be demonstrated by the decreased levels of pro-inflammatory cytokines. The groups that received goat milk, goat yogurt or sulfasalazine showed a significant reduction in colonic TNF- α and IL-1- β . The involvement of TNF- α in IBD is a very important factor that is shown by studies of treatments that decrease TNF- α in the intestinal mucosa, such as the study by Blandino et al. (2001), that proved the effectiveness of a synthetic organic compound that inhibited TNF- α and IL-1- β by demonstrating the attenuation of colonic mucosa damage in an acetic acid colitis model.

The colonic inflammatory status was also characterized by increased colonic iNOS and COX-2 expression in comparison with non colitic animals. The COX-2 enzyme present in the inductive sites of inflammation is stimulated by TNF- α , IL-1 and other mediators (Stenson, 2008). The expression of COX-2 has been performed in order to demonstrate the degree of inflammation and down-regulation to characterize the improvement of the inflammatory process (Martin, Villegas & Alarcon de la Lastra, 2005). As COX-2, pro-inflammatory cytokines such as TNF- α can induce iNOS activity and cause an increase in nitric oxide production in colonic epithelial cells, which is associated with the initiation and maintenance of inflammation in IBD (Kolios, Valata & Ward, 2004). Thus, the pretreatment of colitic rats with goat milk, goat yogurt or sulphasalazine downregulated iNOS and COX-2 expression in colonic tissue.

Goat milk is considered a natural source of oligosaccharides and can be applied in human nutrition because of its composition and concentration of oligosaccharides (Martinez-Ferez et al., 2006). Goat milk oligosaccharides have been shown to be effective in rats with experimental model of colitis induced by TNBS (Daddaoua et al., 2006) and dextran sulfate sodium (DSS) (Lara-Villoslada et al., 2006) by having anti-inflammatory effects, reducing the intestinal damage and improving the expression of inflammatory markers and some genes, may be useful in IBD. In addition, the profile of microorganisms in the milk has a direct effect on the health of its consumers. In raw goat milk *Firmicutes*, lactic acid bacteria and other classic milk bacteria form only a small part of the total bacterial profile of goat milk. *Actinobacteria* and *Proteobacteria* makes up most of the bacterial composition (McInnis, Kalanetra, Mills & Maga, 2015). Yogurt is known for its nutritional, sensory and therapeutic properties (Gonzalez, Adhikari & Sancho-madriz, 2011) and is widely accepted by consumers. LeBlanc and Perdígón (2010) report that yogurt modulates the immune response by stimulating the production of cytokines and regulating this production in order to avoid exacerbating the inflammatory immune response. A study conducted by LeBlanc, Chaves and Perdígón (2009) showed that conventional yogurt administration, before and after TNBS inoculation, exerted anti-inflammatory effects and reduced colonic damage by increasing IL-10 levels in the intestinal tissue and reducing pro-inflammatory cytokine levels. In the present study the goat milk properties were preserved in goat yogurt, since the preparation of this product, with the addition of probiotic and honey, did not alter these parameters when compared to goat milk.

Honey is reported to have anti-inflammatory properties (Bogdanov, Jurendic, Sieber & Gallman, 2008; Alvarez-Suarez, Giampieri & Battino, 2013). The phenolic compounds,

vitamin C and enzymes present in honey have antioxidant activity (Khalil, Sulaiman & Boukraa, 2010). Bilsel et al. (2002) that has been demonstrated. The administration of honey has been shown to be as effective as prednisolone in an inflammatory colitis model by preventing the formation of free radicals in the inflamed tissue. However, in the present study, no differences in the inflammatory or oxidative stress parameters were observed between the goat yogurt groups with or without honey. This discrepancy was perhaps due to the concentration used, because honey was added to improve the palatability of the product, or the view that goat milk has a peculiar flavor.

In conclusion, goat milk and goat yogurt have intestinal anti-inflammatory activity when given as a pretreatment in the acetic acid-induced colitis model in rats. This result was shown in the reduction in colonic tissue damage, preservation of the cytoarchitecture of the tissue, and decrease in pro-inflammatory mediators accompanied by the improvement of oxidative stress. Therefore, these goat dairy products may be a valuable alternative to traditional medications and a potential functional food for the prevention of IBD.

Acknowledgments

The authors are grateful to CAPES and CNPq (Processo: 403020/2013-1 Edital: Chamada N° 39/2013 MCTI/ CT – AGRONEGÓCIO/ CNPq/ LINHA 2: Produto Lácteo) for financial support for the development of this research.

References

- Abraham, C., & Cho, J. H. (2009). Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine*, 361, 2066–2078.
- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., & Battino, M. (2013). Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 20(5), 621–638.
- Anderson, M. E. (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology*, 113, 548–555.
- Asharaf, R., Vasiljevic, T., Day, S. L., Smith, S. C., & Donkor, O. N. (2014). Lactic acid bacteria and probiotic organisms induce different cytokine profile and regulatory T cells mechanisms. *Journal of Functional Foods*, 6, 395–409.
- Bell, C. J., Gall, D. G., & Wallace, J. L. (1995). Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *American Journal of Physiology*, 268, 622–630.
- Bilsel, Y., Bugra, D., Yamaner, S., Bulut, T., Cevikbas, U., & Turkoglu, U. (2002). Could honey have a place in colitis therapy? Effects of honey, prednisolone and disulfiram on inflammation, nitric oxide and free radical formation. *Digestive Surgery*, 19, 306–311.

- Blandino, I. I., Otaka, M., Jin, M., Komatsu, K., Odashima, M., Konishi, N., Sato, T., Kato, S., & Watanabe, S. (2001). FR167653, a potent suppressant of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α production, ameliorates colonic lesions in experimentally induced acute colitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 16(10), 1105–1111.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallman, P. (2008) Honey for Nutrition and Health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677–689.
- Buffinton, G. D., & Doe, W. F. (1995). Depleted mucosal antioxidant defenses in inflammatory bowel disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 19, 911–918.
- Daddaoua, A., Puerta, V., Requena, P., Martínez-Férez, A., Guadix, E., Medina, F. S., Zarzuelo, A., Suárez, M. D., Boza, J. J., & Martínez-Augustin, O. (2006). Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *The Journal of Nutrition*, 136(3), 672–676.
- Dodda, D., Chhajed, R., & Mishra, J. (2014). Protective effect of quercetin against acetic acid induced inflammatory bowel disease (IBD) like symptoms in rats: Possible morphological and biochemical alterations. *Pharmacological Reports*, 66, 169–173.
- Esterbauer, M., & Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonyldialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186, 407–421.
- Gálvez, J. (2014). Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. *ISRN Inflammation*, 2014, 928461. doi:10.1155/2014/928461.
- Gálvez, J., Coelho, G., Crespo, M. E., Cruz, T., Rodríguez-Cabezas, M. E., Concha, A., Gonzalez, M., & Zarzuelo, A. (2001). Intestinal anti-inflammatory activity of morin on chronic experimental colitis in the rat. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 15, 2027–2039.
- García, V., Rovina, S., Boutoia, K., & López, M. B. (2014). Improvements in goat milk quality: A review. *Small Ruminant Research* (in press). <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.12.034>
- Gobbato, N., Rachid, M., & Perdigon, G. (2008). Anti-inflammatory effect of yoghurt in a experimental inflammatory bowel disease in mouse. *Journal of Dairy Research*, 75, 497–504.
- Gonzalez, N.J., Adhikari, K., & Sancho-madriz, M. F. (2011). Sensory characteristics of peach-flavored yogurt drinks containing prebiotics and synbiotics. *LWT- Food Science and Technology*, 44, 158–163.
- Guerra, G. C. B., Araújo, A. A., Lira, G. A., Melo, M. N., Souto, K. K. O, Fernandes, D., Silva, A. L., & Júnior, R. F. A. (2015). Telmisartan decreases inflammation by modulating TNF- α , IL-10, and RANK/RANKL in a rat model of ulcerative colitis. *Pharmacological Reports* (in press). <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2014.12.011>
- Haenlein, G. F. W. (2004). Goat milk in a human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51, 155–163.
- Ioannidis, O., Varnalidis, I., Paraskevas, G., & Botsios, D. (2011). Nutritional Modulation of the Inflammatory Bowel Response. *Digestion*, 84(2), 89–101.
- Khalil, M. I.; Sulaiman, S. A.; Boukraa, L. (2010). Antioxidant properties of honey and its role in preventing health disorder. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3, 6–16.
- Kolios, G., Rooney, N., Murphy, C. T., Robertson, D. A. F., & Westwick, J. (1998). Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. *Gut*, 43, 56–63.
- Kolios, G., Valatas, V., & Ward, S. G. (2004). Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*, 113, 427–437.
- Kountouras, J. (2005). Cyclooxygenase-2 inhibitors and inflammatory bowel disease. *Annals of Gastroenterology*, 18(1), 14–15.

- Krawisz, J. E., Sharon, P., & Stenson, W. F. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*, 87 (6), 1344–50.
- Lara-Villoslada, F., Debras, E., Nieto, A., Concha, A., Gálvez, J., López-Huertas, E., Boza, J., Obled, C., & Xaus, J. (2006). Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Clinical Nutrition*, 25, 477–488.
- LeBlanc, A. M. Chaves, S. A., & Perdígón, G. (2009). Effect of yoghurt on the cytokine profile using a murine model of intestinal inflammation. *European Journal of Inflammation*, 7, 97–109.
- LeBlanc, A. M., & Perdígón, G. (2010). The application of probiotic fermented milks in cancer and intestinal inflammation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69, 421–428.
- Lih-Brody L., Powell, S. R., Collier, K. P., Reddy, G. M., Cerchia, R., Kahn, E., Weissman, G. S., Katz, S., Floyd, R. A., McKinley, M. J., Fisher, S. E., & Mullin, G. E. (1996). Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Science*, 41, 2078–2086.
- Loguercio, C., D'Argenio, G., Cave, M. D., Cosenza, V., Valle, N. D., Mazzacca, G., & Blanco, C. D. V. (2003). Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. *Digestive and Liver Disease*, 35(9), 635–641.
- MacPherson, B. R., & Pfeiffer, C. J. (1978). Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion*, 17(2), 135–150.
- Mahgoub, A. A., el-Medany, A. H., Hagar, H. H., & Sabah, D. M. (2002). Protective effect of natural honey against acetic acid-induced colitis in rats. *Tropical Gastroenterology*, 23, 82–87.
- Martin, A. R., Villegas, I., & Alarcón de la Lastra, C. (2005). The COX-2 inhibitor, rofecoxib, ameliorates dextran sulphate sodium induced colitis in mice. *Inflammation Research*, 54(4), 145–151.
- Martinez-Ferez, A., Rudloff, S., Guadix, A., Henkel, C. A., Pohlentz, G., Boza, J. J., Guadix, E. M., & Kunz, C. (2006). Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. *International Dairy Journal*, 16, 173–181.
- McInnis, E. A., Kalanetra, K. M., Mills, D. A., & Maga, E. A. (2015). Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. *Food Microbiology*, 46, 121–131.
- Middleton S. J., Shorthouse M., & Hunter J. O. (1993). Relaxation of distal colonic circular smooth muscle by nitric oxide derived from human leukocytes. *Gut*, 34, 814–817.
- Millar, A. D., Rampton, D. S., Chander, C. L., Claxson, A. W., Blade, S., Coumbe, A., Panetta, J., Morries, C. J., & Blake, D. R. (1996). Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease in a rat model of colitis. *Gut*, 39(3), 407–415.
- Morelli, L. (2014). Yogurt, living cultures, and gut health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99, 1248S–1450S.
- Mukdsi, M. C. A., Haro, C., González, S. N., & Medina, R. B. (2013). Functional goat milk cheese with feruloyl esterase activity. *Journal of Functional Foods*, 5, 801–809.
- Ohshima H., & Bartsch, H. (1994). Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Research*, 305, 253–264.
- Opara, E. C. (2006). Oxidative stress. *Disease-a-month*, 52, 183–198.
- Park, Y. W. (1994). Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Research*, 14, 151–159.

- Plessas, S., Bosnea, L., Alexopoulos, A., & Bezirtzoglou, A. (2012). Potencial effects of probiotics in cheese and yogurt production: a review. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 433–440.
- Podolsky, D. K. (2002). Inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine*, 347(6), 417–429.
- Prakash, A., Medhi, B., Avti, P. K., Saikia, U. N., Pandhi, P., & Khanduja, K. L. (2008). Effect of different doses of Manuka honey in experimentally induced inflammatory bowel disease in rats. *Phytotherapy Research*, 22, 1511–1519.
- Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2012). Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. *Food Chemistry*, 135, 1411–1418.
- Ribbons, K. A., Xiao-Jing Zhang, X.-J., Thompson, J. H., Greenberg, S. S., Moore, W. M., Kornmeier, C. M., Currie, M. G., Lerche, N., Blanchard, J., Clark, D. A., & Miller, M. J. S. (1995). Potential role of nitric oxide in a model of chronic colitis in rhesus macaques. *Gastroenterology*, 108, 705–711.
- Russ, A., Barnett, M., McNabb, W., Anderson, R., Reynolds, G., & Roy, N. (2010). Post-weaning effects of milk and milk components on the intestinal mucosa in inflammation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 690, 64–70.
- Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83, 849–907.
- Silanikove, N., Leitner, G., Merin, U., & Prosser, C. G. (2010). Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research*, 89, 110–124.
- Slačanac, V., Božanić, R., Hardi, J., Szabó, J. R., Lucan, M., & Krstanovic, V. (2010). Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *International Journal of Dairy Technology*, 63 (2), 171–189.
- Stenson, W. F. (2008). What Is the Function of Cyclooxygenases in the Normal and Inflamed Intestine? *Inflammatory bowel disease*, 14(S2), S104–S105.
- Strober, W., & Fuss, I. J. (2011). Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140, 1756–1767.
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225–241.
- Viladomiu, M., Hontecillas, R., Yuan, L., Lu, P., & Bassaganya-Riera, J. (2013). Nutritional protective mechanisms against gut inflammation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 929–939.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *Journal of Food Science*, 73(9), R117–R124.
- Zorrila, P., Rodriguez-Nogales, A., Algieri, F., Garrido-Mesa, N., Olivares, M., Rondón, D., Zarzuelo, A., Utrilla, M. P., Galvez, J., & Rodriguez-Cabezas, M. E. (2014). Intestinal anti-inflammatory activity of the polyphenolic-enriched extract Amanda® in trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Journal of Functional Foods* II, 449–459.

ANEXO

Certidão - Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

João Pessoa, 4 de novembro de 2013.

CEUA N° 0109/13

Ilmo(a). **Profa. Dra. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga**
Departamento **Nutrição - CCS - UFPB**

Orientando(a): **Paloma Oliveira Antonino de Assis, (Mestrado)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **01/11/2013** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **Efeito anti-inflamatório e antioxidante de leite acidófilo caprino adicionado de mel em ratos com colite.**

Com previsão de empregar **36 Ratos WISTAR;**
BIOTÉRIO Prof. Thomas George.

- ANIMAIS DO

Para serem utilizados no período de **13/01/2014 a 13/12/2014**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB