



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estudo comparativo do potencial anti-inflamatório e antioxidante da cianidina-3-glucósido e do ácido protocatecuico em células intestinais

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Teresa Dinis (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Margarida Castro (Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra)

Ricardo Jorge Cruz Oliveira

2014

Índice

Índice.....	3
Agradecimentos.....	6
Resumo	8
Abstract.....	10
Abreviaturas	12
Capítulo 1: Introdução	15
1.1 - Doenças Inflamatórias do Intestino	15
1.1.1 - Barreira intestinal.....	16
1.1.2 - Doença de Crohn e Colite Ulcerosa.....	17
1.1.3 - Papel das citocinas e quimocinas nas DII	18
1.1.4 - Papel do Fator Nuclear KB nas DII.....	20
1.1.5 - Óxido Nítrico e Inflamação.....	21
1.1.6 - <i>Stress</i> Oxidativo.....	23
1.1.7 - Glutatião.....	24
1.2 - Polifenóis	26
1.2.1 - Efeitos Biológicos	28
1.2.2 - Biodisponibilidade.....	28
1.3 - Antocianinas	30
1.3.1 - Distribuição e Efeitos Biológicos das Antocianinas	33
1.3.2 - Ácido protocatecuico	36
1.3.3 - Antocianinas e Inflamação	37
Objetivo do Trabalho	38

Capítulo 2: Materiais e Métodos 39

2.1 - Reagentes	39
2.2 - Avaliação da Atividade Antioxidante	40
2.3 - Cultura Celular	41
2.4 - Viabilidade Celular	41
2.5 - Medida da Produção de Óxido Nítrico.....	42
2.6 - Quantificação intracelular de Glutatião.....	42
2.7 - Avaliação Intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio	43
2.8 - Análise Estatística.....	44

Capítulo 3: Resultados e Discussão 45

3.1 - O Ácido Protocatecuico apresenta menor capacidade antioxidante que a Cianidina-3-glucósido	47
3.2 - O ácido protocatecuico não apresenta toxicidade em células HT-29	50
3.3 - O ácido protocatecuico contrariamente à cianidina-3-glucósido apresenta-se pouco eficaz na inibição da produção de NO.....	53
3.4 - Efeito do Ácido Protocatecuico e da Cianidina-3-glucósido nos níveis intracelulares de Glutatião	57
3.5 - O ácido protocatecuico tal como a cianidina-3-glucósido inibe a formação de espécies reativas de oxigênio intracelulares induzidas após incubação das células com a mistura de citocinas	64

Conclusão 69

Referências 72

Take the first step in faith. You don't have to see
the whole staircase, just take the first step.

Martin Luther King, Jr

Agradecimentos

Este é o fim de mais uma etapa, o último passo para mais uma realização pessoal que é acabar o Mestrado em Bioquímica, e resta-me apenas agradecer a todas as pessoas que me ajudaram a chegar aqui.

Começo por agradecer às pessoas que mais diretamente me ajudaram na realização deste trabalho. À Professora Doutora Teresa Dinis por me ter orientado e ajudado imenso ao longo destes dois anos e à Professora Doutora Margarida Castro por ter sido o elo de ligação entre a Faculdade de Farmácia e o Departamento de Ciências da Vida tornando assim possível a concretização do meu trabalho na Faculdade de Farmácia.

A todas as pessoas com quem partilhei o laboratório e trabalharei comigo, onde me ajudaram tanto na fase inicial, onde precisava de ajuda para encontrar os reagentes até ao longo do trabalho onde sempre estiveram dispostas a responder às minhas dúvidas e a ajudar-me no que fosse preciso.

E agradeço também a todas as técnicas e empregadas do 2º piso da Faculdade de Farmácia por todos os favores chatos que fui pedindo, e por conseguirem sempre manter a alegria naquele edifício e retirar-me um sorriso naqueles dias mais difíceis.

Quero agora agradecer a todas as pessoas que me ajudaram ao longo destes 6 anos de vida académica, e mesmo antes disso, àqueles que me ajudaram a crescer e a ser uma pessoa melhor.

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais que me forneceram os meios e o amor necessários para que chegasse aqui, à minha irmã que sempre esteve presente e pronta para me ajudar. Aos meus avós, tios e primos que sempre estiveram muito presentes na minha vida, não fôssemos nós uma família muito unida.

Às pessoas que estão ao meu lado desde o primeiro ano em Engenharia Química, à Filipa, à Joana, à Sara, à Salomé e à Daniela, obrigado por me ajudarem a superar o ano de caloiro.

Àqueles que me deram a maior ajuda desde que entrei em Bioquímica, desde a passar ótimos cafés e a serem mais do que amigos, a estarem sempre presentes mesmo quando eu era a pessoa menos simpática e o *bitch* que todos conhecem. À Daniela, à Margarida, ao Paulo, à Paula, ao Tiago, ao Caramelo, à Susana, à Isabel, e mais tarde à Carla, à Inês, ao Beta, à Mickie e à Anna vocês sabem que fizeram e sempre farão parte da minha vida e obrigado por tudo.

Ao grande grupo de amigos que fiz no mestrado, e que sem vocês nunca teria sido tão bom continuar a estudar. À Tânia, à Sara, ao Mário, ao Telmo, ao João, ao Teixo, ao Santos e ao Sales.

Agradeço aos meus grandes amigos que fiz em Coimbra e levo comigo sempre, ao Rodrigo, à Ana Filipa, ao grande grupo da rede (vocês sabem) que tornou a estadia em Coimbra bastante mais acolhedora e ainda à grande companhia e ocupação do meu tempo livre e calmante de muitas alturas que foram as danças latinas, uma paixão que nasceu, cresceu e estará sempre ligada a Coimbra.

E por fim, agradeço à Joana, por estar presente há mais de 6 anos, por aparecer sempre nas alturas certas e por ser a amiga que toda a gente merecer ter.

Por fim, um agradecimento geral a todos, obrigado por todos os conselhos, palavras amigas, e ajudas para continuar a ter força e superar todas as dificuldades que se foram metendo no meu caminho.

Resumo

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são um grupo de doenças crônicas do trato gastrointestinal (GI) com elevada incidência a nível mundial. Estas doenças são caracterizadas por uma excessiva produção de mediadores pro-inflamatórios, excessiva ativação do fator de transcrição NF- κ B e disfunção na barreira intestinal para além de, um aumento do *stress* oxidativo. Hoje em dia ainda não existe um tratamento específico para as DII e os fármacos usados para o tratamento estão associados a vários efeitos secundários. A falta de um tratamento e os efeitos secundários associados às terapias usadas criam a necessidade de investigar novas estratégias de tratamento mais eficazes e seguras.

Os polifenóis, nomeadamente as antocianinas, são compostos abundantes na alimentação, e mostram possuir uma grande variedade de efeitos benéficos na saúde humana. Estes são conhecidos pela sua grande capacidade antioxidante e anti-inflamatória e, apesar da extensa biotransformação e baixa biodisponibilidade, as antocianinas mostram ser uma boa forma para tratamento e prevenção das DII.

A cianidina-3-glucósido é uma antocianina descrita como um composto com grande capacidade antioxidante e anti-inflamatória, sendo metabolizada ao longo do trato gastrointestinal. O principal metabolito resultante dessa metabolização é o ácido protocatecuico. Este ácido fenólico, devido à presença de grupos hidroxilo ligados ao anel aromático, possui uma grande capacidade redutora de radicais, podendo estar envolvido nos efeitos benéficos da cianidina-3-glucósido.

Este trabalho foi idealizado com o objetivo de realizar um estudo comparativo entre a cianidina-3-glucósido e o ácido protocatecuico relativamente aos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios em células epiteliais do intestino, células HT-29, estimuladas com uma mistura de citocinas pro-inflamatórias, a IL-1 α , o TNF- α e o IFN- γ .

Inicialmente, num ensaio sem células, tanto o ácido protocatecuico como a cianidina-3-glucósido mostraram ser bons agentes redutores de radicais livres, possuindo uma atividade antioxidante superior à do Trolox. No entanto, em termos comparativos a cianidina-3-glucósido foi mais eficiente como composto antioxidante que o ácido protocatecuico.

Relativamente aos ensaios em células, nem a cianidina-3-glucósido nem o ácido protocatecuico foram tóxicos para as células numa concentração até 25 μM , mas também não as protegeram da citotoxicidade induzida pela mistura de citocinas.

A mistura de citocinas é capaz de desencadear a produção de diversos marcadores inflamatórios, nomeadamente, de óxido nítrico pelas células intestinais que foi, no entanto, fortemente contrariada quando as células foram pré-incubadas com a cianidina-3-glucósido 25 μM . Por outro lado, a pré-incubação com ácido protocatecuico 25 μM não conferiu uma proteção significativa.

As citocinas induziram também uma alteração no estado redox das células, avaliado em termos de glutatião intracelular assim como de formação de espécies reativas de oxigénio. No primeiro caso, nem a cianidina-3-glucósido nem o ácido protocatecuico, 25 μM , contrariaram o efeito das citocinas, mas no segundo, conferiram alguma proteção, particularmente quando se avaliou a formação de espécies oxidantes por microscopia de fluorescência.

Palavras-chave: Doenças Inflamatórias Intestinais; Polifenóis; Antocianinas; Cianidina-3-glucósido; Ácido protocatecuico; Atividade anti-inflamatória; Atividade antioxidante; Óxido Nítrico; Glutatião; Espécies reativas de oxigénio.

Abstract

Inflammatory Bowel Diseases (IBD) are a group of chronic inflammatory diseases of the gastrointestinal tract with a high incidence worldwide. These diseases are characterized by an excessive production of pro-inflammatory mediators, excessive activation of the transcription factor NF- κ B, dysfunction of intestinal barrier in addition to an increase in oxidative stress. Nowadays, there is still no specific treatment for IBD, and the drugs used are associated with various side effects. The lack of treatment and side effects associated to the therapies used creates the need to investigate new, safer and more effective therapeutic strategies.

Polyphenols, including anthocyanins, are compounds largely available in the diet and they show a wide variety of beneficial effects on human health. These are known for its high antioxidant and anti-inflammatory activities and, despite the extensive biotransformation and low bioavailability, anthocyanins show to be a good strategy for the treatment and prevention of IBD.

Cyanidin-3-glucoside is an anthocyanin with antioxidant and anti-inflammatory capacity, highly metabolized in the gastrointestinal tract being the protocatechuic acid the major metabolite formed. This phenolic acid, due to the presence of hydroxyl groups attached to the aromatic ring, possesses a great capacity to reduce radicals and may be involved on the health benefits observed by cyanidin-3-glucoside.

This study was idealized with the aim to conduct a comparative study between cyanidin-3-glucoside and protocatechuic acid and its antioxidant and anti-inflammatory effects on intestinal epithelial cells, the cell line HT-29, stimulated with a pro-inflammatory cytokines mixture, IL-1 α , TNF- α and IFN- γ .

Initially, with a cell-free assay, both protocatechuic acid and cyanidin-3-glucoside have shown to be good free radical reducing agents, having a higher antioxidant activity than Trolox. However, in comparative terms, cyanidin-3-glucoside was more efficient as antioxidant than protocatechuic acid.

In cell studies, neither cyanidin-3-glucoside nor protocatechuic acid were toxic in concentrations up to 25 μ M, but failed to protect cells from cytokines-induced cytotoxicity.

The mixture of proinflammatory cytokines also induced a significant increase in nitric oxide production by intestinal cells which was strongly counteracted when cells were pre-incubated with cyanidin-3-glucoside 25 μ M.

Cytokines also induced a change in the redox state of the cells evaluated in terms of intracellular glutathione as well as the formation of reactive oxygen species. Pre-incubation of the cells with cyanidin-3-glucoside or protocatechuic acid (25 μ M) did not protect cells from glutathione depletion but have shown some protection against reactive oxygen species when assessed by fluorescence microscopy.

Keywords: Inflammatory Bowel Diseases; Polyphenols; Anthocyanins; Cyanidin-3-glucoside; Protocatechuic acid; Anti-inflammatory activity; Antioxidant activity; Nitric oxide; Glutathione; Reactive oxygen species.

Abreviaturas

Abreviação	Nome Completo
5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico
ABTS	2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AP	Ácido Protocatecuico
ATP	Adenosina Trifosfato
BSO	L-butiona S,R-sulfoximina
C3G	Cianidina-3- α - β Glucósido; Cianidina-3-glucósido
CaM	Calmodulina
DMEM	Meio de cultura (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
eNOS	Óxido Nítrico sintase endotelial
FBS	Soro Fetal de Bovino
GCL	γ -glutamilcisteinil Ligase
GI	Gastrointestinal
GPx	Glutatião Peroxidase
Grx	Glutaredoxinas
GSH	Glutatião Reduzido
GSSG	Glutatião Oxidado
GST	Glutatião-S-Transferase
IFN- γ	Interferão γ
I κ B	Inibidor do NF- κ B

IKK	I κ B cinase
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico sintase indutível
LOOH	Hidroperóxido Lipídico
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difenil-tetrazolio
NEM	N-etilmaleimida
NEMO	Proteína Modeladora de IKK
NF- κ B	Fator Nuclear κ B
NOS	Óxido Nítrico sintase
nNOS	Óxido Nítrico sintase neuronal
OPT	<i>Orto</i> -ftaldeído
PBS	Tampão Fosfato-salino
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
ROS	Espécies reativas de Oxigênio
rpm	rotações por minuto
SOD	Superóxido Dismutase
t-BHP	<i>Tert</i> -butilhidroperóxido
TEAC	Atividade Antioxidante Equivalente a Trolox
TNF- α	Factor de Necrose Tumoral α
Th	Linfócitos T Auxiliares
Trolox	Ácido 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxil
Trx	Tioredoxina Reduzida
TrxSS	Tioredoxina Oxidada

UV

Ultravioleta

Capítulo 1: Introdução

Os alimentos que consumimos beneficiam todo o nosso organismo providenciando os nutrientes e minerais essenciais (Fraga et al. 2010).

Uma dieta rica em frutas, vegetais e outras plantas comestíveis tem vindo a demonstrar que ajuda a prevenir o risco de desenvolvimento de várias doenças, tais como doenças cardiovasculares, cancro e doenças inflamatórias (Quideau et al. 2011).

Embora alguns micronutrientes como vitaminas ou minerais desempenhem um papel importante nesta prevenção das doenças, outros componentes das plantas, como é o caso dos polifenóis, contribuem também para os efeitos benéficos observados do consumo de vegetais e frutos na saúde humana (Fraga et al. 2010, Quideau et al. 2011).

1.1 - Doenças Inflamatórias do Intestino

O processo inflamatório é um tipo de resposta imunitária não-específica que defende o indivíduo contra a constante ameaça de organismos e substâncias químicas do ambiente circundante. Devido a esta permanente pressão antigénica, a mucosa intestinal está adaptada para funcionar sob intensas, ainda que fisiológicas, condições que dependem de mecanismos de controlo celular e molecular. Em alguns indivíduos, este estado no organismo é alterado, tornando-se excessivo, criando doenças inflamatórias crónicas (Romier et al. 2009).

A inflamação crónica gastrointestinal pode influenciar o correto funcionamento da mucosa intestinal, e ainda alterar a habilidade da mucosa de resistir a danos, bem como de proceder à reparação dos mesmos, uma vez causados (Wallace and Ma 2001).

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são um grupo de doenças caracterizadas por um estado contínuo de inflamação no trato gastrointestinal (GI), que incluem várias condições com diferentes sintomas e manifestações em diferentes secções do trato gastrointestinal.

Devido à sua grande incidência e prevalência, as DII são reconhecidas como um grande problema de saúde em países desenvolvidos, incluindo Portugal (Romier et al. 2009). De acordo com a Associação Portuguesa da Doença Inflamatória do Intestino,

existem 14 mil portugueses afetados por estas doenças e a sua incidência tem vindo a aumentar com 140 novos casos por ano.

Estas doenças podem ter um grande impacto na qualidade de vida de um indivíduo, o que acentua a necessidade científica de otimizar uma terapia anti-inflamatória no combate e prevenção destas doenças.

As DII, que incluem a doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerosa (CU), são caracterizadas por processos inflamatórios inesperados no intestino, causando uma inflamação crónica, levando a danos epiteliais (Neuman 2007).

Existem várias características patológicas e clínicas diferentes entre as duas doenças, mostrando que estas representam entidades clínicas diferentes (Neuman 2007).

As DII são frequentemente associadas à infiltração de células do sistema imunológico e inflamatório, sendo caracterizadas por uma desregulação na síntese e libertação de vários mediadores pro-inflamatórios. Estes mediadores incluem as citocinas, as espécies reativas de oxigénio (ROS) e o óxido nítrico (\bullet NO), resultando numa rutura da barreira epitelial, danos excessivos nos tecidos e um estado contínuo de inflamação (Scaldaferri and Fiocchi 2007).

1.1.1 - Barreira intestinal

A barreira intestinal é uma estrutura dinâmica e complexa que mantém a homeostasia intestinal separando o conteúdo intestinal dos tecidos do hospedeiro. Esta barreira realiza a absorção e digestão de nutrientes essenciais, regula a secreção de eletrólitos e macromoléculas, permitindo ainda interações entre a flora bacteriana residente e o sistema imunitário da mucosa (Roda et al. 2010).

Esta barreira é constituída por:

- Uma camada mucosa grossa que contém produtos antimicrobianos, agindo como uma barreira química para invasão de patógenos, considerada como a camada superior da barreira intestinal;

- Uma monocamada de células epiteliais do intestino, que servem como células imunofetoras devido à sua capacidade de libertar citocinas, quimocinas e outras moléculas envolvidas na captação de antígenos e defesa imunitária, exercendo as

funções de absorção de nutrientes, barreira protetora, e reconhecimento e transdução de sinais exteriores;

- E ainda por um conjunto de várias células, como células mesenquimatosas, dendríticas, linfócitos e macrófagos que constituem a camada inferior da barreira intestinal (Roda et al. 2010, Shimizu 2010).

Esta proteção conferida pela barreira intestinal é necessária devida à elevada expressão de citocinas, quimocinas e metabolitos provenientes da microflora intestinal ou do hospedeiro (Neuman 2007).

1.1.2 - Doença de Crohn e Colite Ulcerosa

Como já foi dito anteriormente, a Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerosa (CU) representam duas entidades diferentes com patologias distintas, possuindo também características distintas nas células afetadas (figura 1).

A Colite Ulcerosa pode ser distinguida da doença de Crohn por se limitar a uma inflamação localizada nas camadas superiores da mucosa do colon, não envolvendo toda a parede do trato GI onde se localiza. Esta é caracterizada por uma inflamação severa e pela produção de uma mistura complexa de mediadores inflamatórios com o desenvolvimento de uma extensa ulceração da superfície da mucosa (Baumgart and Sandborn 2007).

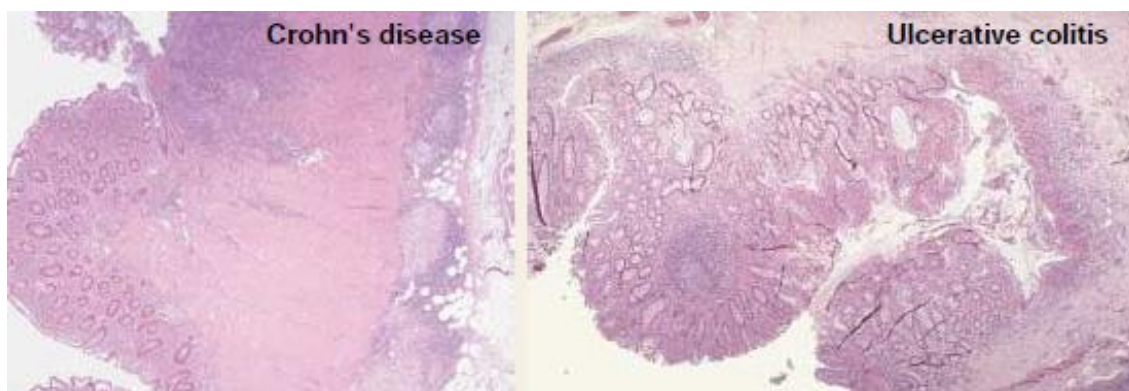


Figura 1. Marca histológica de Doenças Inflamatórias Intestinais. Imagem da esquerda, fotomicrografia histológica tirada de um paciente com doença de Crohn. Pode-se observar que a inflamação envolve toda a espessura da parede desde a mucosa até à submucosa. Observam-se granulomas na superfície da submucosa. Imagem da direita, fotomicrografia histológica de um paciente de Colite Ulcerosa a uma ampliação baixa para se conseguir observar a inflamação na mucosa e a erosão. Uma maior ampliação poderia mostrar a presença de células de inflamação aguda em criptas, e conseqüentemente pequenos abscessos. (Bouma and Strober 2003)

Na doença de Crohn, ocorre igualmente uma inflamação severa, no entanto esta afeta todas as camadas da parede do trato GI, podendo afetar todo o trato GI. A DC é caracterizada por uma acumulação de macrófagos que frequentemente formam granulomas (Baumgart and Sandborn 2007).

O padrão de inflamação das duas doenças também tende a ser distinto. Na Colite Ulcerosa a inflamação é contínua por toda a zona inflamada, enquanto que na Doença de Chron a inflamação pode ocorrer em pequenas secções em uma ou mais secções do trato GI (Baumgart and Sandborn 2007).

As duas doenças também diferem entre si na sua regulação. Na doença de Crohn, a inflamação é mediada por linfócitos T auxiliares 1 (Th1) que são caracterizados pela produção de IL-1, IL-6, IFN- γ e TNF- α . Na colite ulcerosa ocorre uma resposta mediada por linfócitos T auxiliares 2 (Th2) e pela secreção de interleucinas, nomeadamente a IL-4, a IL-5 e a IL-10 (Neuman 2007, Monteleone and Caprioli 2010).

1.1.3 - Papel das citocinas e quimocinas nas DII

Já se encontra demonstrado que mediadores pro-inflamatórios, como as citocinas, desempenham um papel crucial na patogénese das DII. As citocinas são pequenas proteínas ou peptídeos (4-15 kDa) produzidas por células imunitárias que facilitam a comunicação entre as células, estimulam a proliferação de efetores celulares específicos, de antigénios e medeiam as manifestações locais e sistémicas de inflamação em tecidos endócrinos, autócrinos e parácrinos (Neuman 2007).

Num estado de inflamação crónica, como é o caso das DII, ocorre uma grande alteração dos níveis de citocinas na mucosa intestinal, resultando num desequilíbrio entre citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias. Desta desregulação resulta uma excessiva entrada de células efetoras na mucosa intestinal, induzindo assim danos nos tecidos devido à produção excessiva de, por exemplo, óxido nítrico e de mediadores inflamatórios, criando um aumento do estado inflamatório das células (Atreya and Neurath 2010).

O fator de necrose tumoral α (TNF- α), o interferon γ (IFN- γ) e a interleucina 1 (IL-1) são as três principais citocinas envolvidas na patogênese das DII (Xavier and Podolsky 2007).

O TNF- α exerce o seu efeito pro-inflamatório através do aumento da produção de IL-1 β e IL-6, da expressão de moléculas de adesão, da proliferação de fibroblastos e de fatores de pro-coagulação, bem como a iniciação de citotoxicidade apoptótica. O TNF- α parece exercer um efeito estimulador nas células, produzindo IFN- γ , que por sua vez vai ligar-se a recetores específicos das células resultando na ativação de várias cascatas de sinalização intracelular, conseqüentemente levando à síntese de proteínas que medeiam respostas antivirais, inibição de crescimento e modelação imunitária. Estas duas citocinas pro-inflamatórias, TNF- α e IFN- γ , também estão associadas a um aumento na permeabilidade das *tight junctions* das células epiteliais (Al-Sadi and Ma 2007, Atreya and Neurath 2010).

Para além dos efeitos pro-inflamatórios do TNF- α e do IFN- γ , a IL-1 parece ser também bastante importante na patogênese das DII devido à sua grande atividade na regulação do sistema imunitário durante o desenvolvimento de, por exemplo, a inflamação, a infeção, a diferenciação celular, a remodelação de tecido e a morte celular. O sistema da IL-1 consiste em três membros, a IL-1 α , a IL-1 β e o antagonista do recetor da IL-1 (IL-1ra).

O antagonista do recetor da IL-1 é produzido por células epiteliais do intestino e pode inibir as ações pro-inflamatórias da citocina IL-1. O antagonista do recetor liga-se a recetores de IL-1 (IL-1R1) de células alvo e vai impedir a ligação da IL-1 α e IL-1 β ao recetor IL-1R1. Um desequilíbrio na mucosa intestinal entre a IL-1 β e o antagonista do recetor, IL-1Ra, é observado em pacientes com DII, sugerindo que a produção insuficiente endógena de IL-1Ra de forma a contrariar o excesso da citocina pro-inflamatória IL-1 α pode ser um importante defeito patológico (Al-Sadi and Ma 2007).

1.1.4 - Papel do Fator Nuclear κ B nas DII

O fator nuclear κ B (NF- κ B) é um fator de transcrição bastante importante na resposta inflamatória. Este regula a expressão de vários genes que codificam citocinas e quimocinas pro-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1, IL-8, etc.), bem como moléculas de adesão, factores de crescimento e enzimas tais como a cicloxigenase-2 (COX-2) e a óxido nítrico sintase indutível (iNOS) (Baldwin 1996).

O NF- κ B existe no citosol das células como dímero numa forma inativa, estando complexado com o seu inibidor, a proteína I κ B (incluindo I κ B- α e outros). Após um estímulo, como por exemplo radicais livres, citocinas pro-inflamatórias, lipopolissacarídeos bacterianos e radiação UV, ocorre a ativação da I κ B cinase (IKK), que é um complexo constituído por subunidades de cinases catalíticas (IKK α e/ou IKK β) e uma proteína modeladora, NEMO. A IKK vai induzir a fosforilação do inibidor I κ B e consequentemente este vai degradar-se, permitindo assim a translocação do dímero NF- κ B ativo para o núcleo. O NF- κ B posteriormente liga-se a locais específicos do DNA e induz a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória (figura 2) (Schreiber et al. 1998, Gilmore 2006).

A ativação constante e em excesso de NF- κ B é frequentemente observada em pacientes com DII, desempenhando assim um papel bastante importante no desenvolvimento das doenças inflamatórias. Assim sendo, as DII estão associadas a uma desregulação da via intracelular de ativação do NF- κ B levando a uma ação excessiva deste fator transcripcional. A inibição desta via a qualquer momento do processo de ativação do NF- κ B vai reprimir a produção das proteínas expressas através do NF- κ B, modelando localmente a inflamação e podendo ser um bom alvo para o tratamento das DII (Mueller et al. 2010).

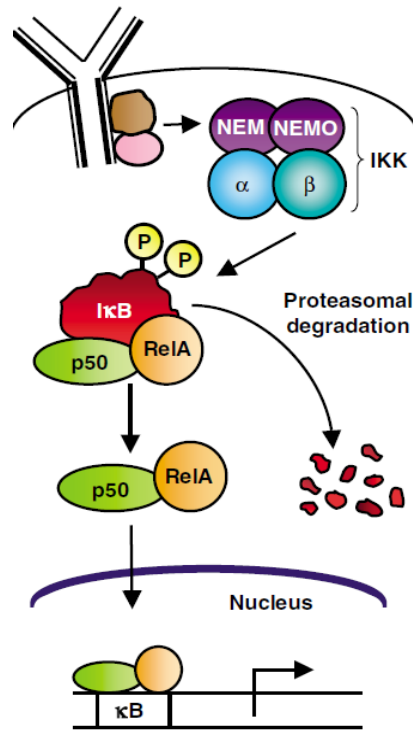


Figura 2. Via clássica da transdução de sinal do NF-κB. Os dímeros de NF-κB (p50/RelA) são mantidas no citoplasma por interações com uma molécula independente IκB. Em muitos casos, a ligação de ligando a um recetor celular que se encontra na superfície da célula vai recrutar o complexo IKK (que contém as subunidades catalíticas α e β e duas moléculas proteicas reguladoras NEMO). A agregação destas moléculas no receptor vai ativar o complexo IKK que por sua vez vai induzir a fosforilação do IκB em dois resíduos de serina. Uma vez ativo, o dímero NF-κB entra no núcleo para se ligar aos locais específicos e proceder à transdução dos genes. A imagem é adaptada de Gilmore (2006).

1.1.5 - Óxido Nítrico e Inflamação

O óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) é reconhecido atualmente como um modelador celular versátil envolvido numa grande variedade de processos fisiológicos e patológicos como a resposta imunitária, a vasodilatação e a neuromodulação (Forstermann and Sessa 2012).

O óxido nítrico, apesar de participar em diversas atividades biológicas, é uma molécula bastante simples que contém um átomo de nitrogénio ligado covalentemente a um átomo de oxigénio com um eletrão livre. Sendo uma molécula pequena hidrofóbica consegue atravessar a membrana celular sem a ajuda de canais ou recetores, conseguindo difundir através de distâncias consideráveis (Palmer et al. 1987).

A síntese do $\bullet\text{NO}$ pode ocorrer de forma enzimática e não-enzimática. A óxido nítrico sintase (NOS) é considerada a fonte principal de $\bullet\text{NO}$ nos sistemas biológicos, existindo três isoformas diferentes, a NOS indutível (iNOS), que é aquela que produz os

maiores níveis de $\bullet\text{NO}$ por longos períodos de tempo, a NOS endotelial (eNOS) e a NOS neuronal (nNOS), sendo estas duas expressas constitutivamente e tendo a sua atividade regulada pelas concentrações intracelulares de cálcio, pelo que produzem menores quantidades de $\bullet\text{NO}$ e por períodos de tempo mais curtos (Alderton et al. 2001).

A óxido nítrico sintase, na sua forma ativa é dimérica e cada monómero encontra-se associado a uma molécula de calmodulina (CaM). Devido à grande variedade de processos biológicos em que estas enzimas estão envolvidas, a sua regulação é complexa. A atividade, expressão e localização são reguladas por interações proteína-proteína, *splicing* alternativo de mRNA e modificações covalentes (Alderton et al. 2001).

A síntese não-enzimática de $\bullet\text{NO}$ pode ser feita através dos aniões inorgânicos nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), pois em condições bastante acídicas, que ocorrem muito no estômago, o nitrito consegue produzir $\bullet\text{NO}$ e outras espécies reativas de nitrogénio (Lundberg et al. 1994).

O $\bullet\text{NO}$ é capaz de surtir efeitos tanto anti-inflamatórios como pro-inflamatórios. Esta inconsistência pode ser explicada pelas várias ações celulares que esta molécula exerce e pelo nível e local a que a sua produção acontece.

Em pequenas quantidades, o $\bullet\text{NO}$ é capaz de exercer atividades anti-inflamatórias, conferindo propriedades anti-aderentes ao endotélio e inibindo assim a adesão de leucócitos e plaquetas, diminuindo a expressão de seletina-P pelas plaquetas, inibindo a agregação e trombose microvascular, a proliferação de linfócitos e diminuindo a produção de oxidantes pelos fagócitos e de citocinas pelos macrófagos (Clancy et al. 1998).

No entanto, quando ocorre uma produção excessiva de citocinas inflamatórias, estas são responsáveis pela indução da iNOS, que produz assim grandes quantidades de $\bullet\text{NO}$. Este aumento de óxido nítrico foi descrito em doenças como a colite ulcerosa e sepsia. Por esse motivo, a sobreprodução de $\bullet\text{NO}$ é um indicativo de um estado imunológico ativo nos quais citocinas inflamatórias e outros mediadores vão ativar a iNOS em vários tecidos. Grandes quantidades de $\bullet\text{NO}$ produzidas pelas células em resposta às citocinas podem destruir os tecidos hospedeiros e alterar as respostas celulares (Clancy et al. 1998).

Para além dos efeitos celulares já mencionados anteriormente, este radical desempenha outras funções no trato gastrointestinal, tendo efeitos na secreção gastrointestinal, onde contribui para a secreção de muco gástrico, na permeabilidade, e no fluxo sanguíneo atuando como um potente vasodilatador (Sharma et al. 2007).

1.1.6 - Stress Oxidativo

O *stress* oxidativo é um mecanismo de danos celulares presente em muitas doenças, como diabetes, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, doenças inflamatórias do intestino e cancro. Este mostra-se assim um ótimo alvo de estudo para terapia e prevenção destas doenças (Willcox et al. 2004).

Reações de oxidação são uma parte essencial do metabolismo normal e o oxigénio é o principal aceitador de eletrões no sistema de fluxo de eletrões que produz ATP, sendo portanto bastante importante. O *stress* oxidativo ocorre quando existe um grande desequilíbrio entre espécies reativas de oxigénio (ROS) e as defesas antioxidantes do organismo (Masella et al. 2005).

As ROS podem desempenhar duas funções diferentes *in vivo*. Uma função positiva, quando estão envolvidas na produção de energia, fagocitose, crescimento celular e regulação da sinalização intracelular. E uma função negativa, sendo bastante prejudiciais para as células e organismo, pois podem atacar macromoléculas biológicas como lípidos, proteínas e ADN, induzir a oxidação resultando em danos na membrana celular e afetar o funcionamento de enzimas, inativando-as (Masella et al. 2005, Finley et al. 2011).

As espécies reativas de oxigénio estão constantemente a ser produzidas nas células como resultado do processo de transferência de eletrões na mitocôndria ou como bio produtos das enzimas xantina oxidase, lipoxigenases e cicloxigenases. As ROS podem ainda ser geradas como consequência do metabolismo intracelular de toxinas, monoxigenases e compostos exógenos, ou devido a exposição a fatores ambientais como a radiação ultravioleta (Masella et al. 2005).

De forma a evitar um excesso de ROS no organismo, o ser humano desenvolveu mecanismos de proteção que podem captar ou neutralizar as ROS, bloquear a sua produção ou sequestrar metais de transição que podem ser fonte de radicais livres. Estes

mecanismos protetores incluem defesas antioxidantes de origem enzimática e não-enzimática. Estas podem ser produzidas no organismo, sendo de origem endógena como é o exemplo do glutatião reduzido (GSH), peroxirredoxinas e a superóxido dismutase (SOD), ou podem ser obtidos na dieta, sendo de origem exógena como polifenóis, Vitamina E, Vitamina C e carotenoides (Willcox et al. 2004, Halliwell 2011).

Entre os antioxidantes endógenos incluem-se as enzimas que mais eficientemente catalisam a reação de redução de espécies reativas de oxigénio, como é o caso da superóxido dismutase (SOD). Esta catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio. Também a hidroperoxidase, que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio e o glutatião peroxidase (GPx) que reduz hidroperóxidos orgânicos estão entre os antioxidantes endógenos existentes nas células (Finley et al. 2011).

O glutatião reduzido (GSH) desempenha um papel central no sistema antioxidante intracelular endógeno pois é bastante importante para a eliminação de ROS, não apenas como cofactor enzimático, mas também como captador de radicais livres (Masella et al. 2005, Finley et al. 2011).

1.1.7 - Glutatião

Os sistemas redox tiol/dissulfureto existentes nas células compreendem os pares glutatião reduzido, glutatião oxidado (GSH/GSSG), cisteína reduzida, cisteína oxidada (Cys/CysSS) e tioredoxina reduzida, tioredoxina oxidada (Trx/TrxSS). Estes desempenham um papel bastante importante na preservação da homeostasia redox dos tecidos, funções metabólicas e integridade celular (Circu and Aw 2011).

O glutatião reduzido (GSH) encontra-se presente nas células, estando a sua concentração entre os valores de 1-10 mM na maioria das células de mamíferos incluindo o epitélio intestinal, sendo um dos determinantes principais do estado redox das células. Existe na célula maioritariamente na forma biológica ativa tiol-reduzida GSH, e a oxidação de GSH para o dissulfureto GSSG está muitas vezes associada a *stress* oxidativo. A homeostasia intracelular de GSH é mantida por síntese *de novo*, regeneração a partir de GSSG, e captação extracelular de GSH (Circu and Aw 2012).

Como parte do sistema de defesa antioxidante, o GSH participa em reações de conjugação catalisadas por glutatíão-S-transferase (GST), de redução do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) catalisada por glutatíão peroxidases (GPx), e na redução de pontes dissulfureto em proteínas catalisadas por glutaredoxinas (Grx) (Circu and Aw 2011).

Níveis elevados de glutatíão oxidado no tecido epitelial têm sido correlacionados com a severidade da inflamação nos tecidos, sendo os principais causadores, a baixa expressão das enzimas da via de síntese de GSH e os baixos níveis de precursores de cisteína. Estes fatores contribuem para a baixa concentração de glutatíão reduzido na mucosa intestinal em doentes com doenças inflamatórias intestinais, havendo um desequilíbrio no rácio GSH/GSSG (Iantomasi et al. 1994, Sido et al. 1998).

Níveis baixos de glutatíão reduzido foram também encontrados em células inflamadas da mucosa do íleo de doentes com doença de Crohn, e também na mucosa do colon em doentes com Colite Ulcerosa (Sido et al. 1998).

1.2 - Polifenóis

Há pelo menos uma década que investigadores e a indústria alimentar têm mostrado um interesse crescente nos polifenóis. As principais razões são o reconhecimento das suas propriedades antioxidantes, a grande abundância na dieta humana e o seu provável papel na prevenção de várias doenças associadas ao *stress* oxidativo (Manach et al. 2004).

Os polifenóis são um grupo de compostos químicos encontrados em plantas e caracterizados pela presença de um ou mais anéis fenólicos. Frutos e vegetais são as principais fontes de compostos fenólicos na dieta humana, onde grandes concentrações de polifenóis são encontradas nas bagas, no chá, na cerveja, no vinho, no azeite, no chocolate/cacau, no café, nas nozes, nos amendoins, nas romãs, no milho, entre outros (Landete 2012).

Os polifenóis influenciam muitas propriedades sensoriais dos alimentos, contribuindo para o aroma e sabor de muitos produtos alimentares de origem vegetal. A contribuição dos polifenóis para o aroma é devido à presença de fenóis voláteis na sua composição (Landete 2012).

Existem mais de 8000 moléculas diferentes com estrutura polifenólica identificadas em plantas superiores e algumas centenas em plantas comestíveis. Estas moléculas são metabolitos secundários das plantas e estão normalmente envolvidos na defesa contra as radiações ultravioleta, agressão por agentes patogénicos, quelatação de metais pesados tóxicos ou proteção antioxidante contra radicais livres gerados durante o processo fotossintético (Stevenson and Hurst 2007). Estes compostos podem ser classificados em grupos diferentes, em função do número de anéis fenol que contêm e dos elementos estruturais que ligam os anéis entre si.

Distinguem-se assim os flavonóides e os não flavonóides (ácidos fenólicos, estilbenos e linhanos). Os flavonóides partilham uma estrutura básica semelhante consistindo em 2 anéis aromáticos (A e B) que se encontram ligados por 3 átomos de carbono formando um anel heterocíclico oxigenado (anel C) tal como representado na figura 3. Os flavonóides, consoante a variação nas estruturas do anel C, são divididos em 6 subclasses, sendo os flavonóis, as flavonas, as isoflavonas, as flavanonas, as antocianidinas (antocianinas) e os flavanóis (catequinas e proantocianidinas) (figura 4).

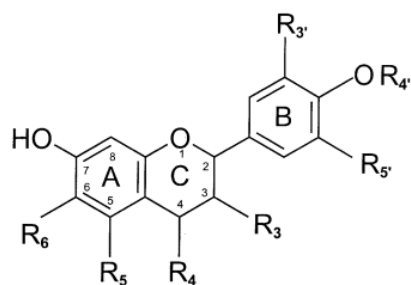


Figura 3. Estrutura e padrão numérico geral dos flavonóides (Beecher 2003).

Os polifenóis são caracterizados pela sua elevada capacidade antioxidante. Com efeito, observando a figura 3, a simples substituição de R4' por hidrogénio vai permitir que o polifenol possua a capacidade de participar em reações redox cedendo o átomo de hidrogénio, formando um radical estável, O-semiquinona, devido à deslocalização do eletrão entre os anéis aromáticos, particularmente quando existe uma dupla ligação na posição 2:3 do anel C (Beecher 2003).

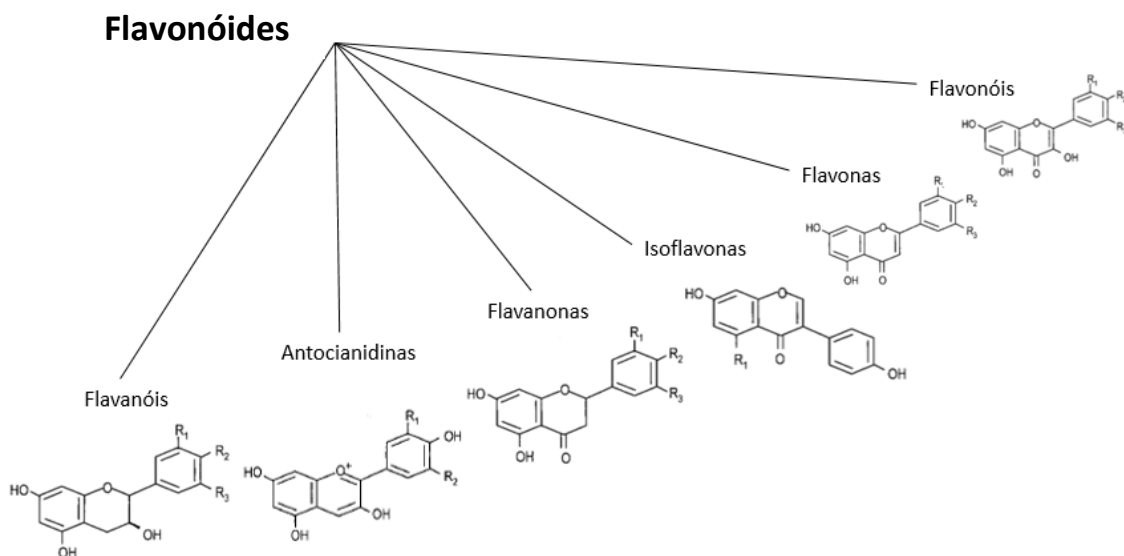


Figura 4. Vários Tipos de Flavonóides e suas Estruturas Químicas Gerais. Adaptado de Manach et. al (2004).

1.2.1 - Efeitos Biológicos

Os polifenóis têm sido considerados como importantes compostos antioxidantes devido à sua atividade como captadores de radicais livres, quelatação de metais, indução de antioxidantes endógenos (glutatio peroxidase, glutatio redutase, superóxido dismutase, lipoxigenases, entre outros) e modelação de enzimas agindo contra o *stress* oxidativo. Mais recentemente têm sido também reconhecidos como modeladores de sinais celulares e inflamação, através da interação direta com recetores ou enzimas envolvidas na transdução de sinais, modelação de genes relacionados com a sobrevivência/morte celular, regulação da função mitocondrial, vias de síntese de lípidos e proteínas (Rahman et al. 2006, Fraga et al. 2010, Laranjinha 2010, Quideau et al. 2011).

Devido às várias formas de ação, os polifenóis têm um grande potencial benéfico para a saúde em várias doenças tais como cancro, doenças inflamatórias e alérgicas, doenças cardiovasculares, diabetes e doenças neurodegenerativas (Rahman et al. 2006, Quideau et al. 2011, Rodrigo et al. 2011, Singh et al. 2011).

1.2.2 - Biodisponibilidade

Os efeitos biológicos dos polifenóis são dependentes da sua biodisponibilidade, que varia bastante consoante o composto polifenólico. A estrutura química do composto, mais do que a concentração, determina a quantidade e extensão da absorção, bem como a natureza dos metabolitos resultantes que circulam no plasma.

Grande parte dos polifenóis estão presentes nos alimentos na forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros, que não podem ser absorvidos nesta forma nativa. Por esse motivo, antes da absorção, os polifenóis são hidrolisados por enzimas do intestino ou pela microflora intestinal (Scalbert et al. 2002).

Uma vez absorvidos, os polifenóis passam por uma série de transformações, onde primeiro são conjugados no intestino delgado, e posteriormente no fígado por metilação, sulfatação e/ou glucuronidação. Este é um processo metabólico comum para a eliminação de muitos xenobióticos para restringir os possíveis efeitos tóxicos e facilitar a sua eliminação pela urina aumentando a sua hidrofiliabilidade. Estes mecanismos de

conjugação são muito eficientes, pelo que geralmente os polifenóis ou são inexistentes na corrente sanguínea, ou a sua concentração é muito baixa (Manach et al. 2004).

Os polifenóis, uma vez consumidos, conseguem entrar nos tecidos, particularmente naqueles em que ocorre a sua metabolização, nomeadamente o intestino delgado e o fígado. Grande parte dos polifenóis é, no entanto, excretado pela urina (Manach et al. 2004).

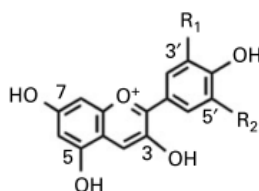
Os polifenóis são pelo menos parcialmente absorvidos através da barreira do intestino, sendo que, a quantidade de polifenóis intactos encontrados na urina varia conforme a estrutura do polifenol (Scalbert et al. 2002).

1.3 - Antocianinas

As antocianinas são uma subclasse da família dos polifenóis, que estão associados às cores azul, roxo e vermelho de vários frutos e plantas. O termo antocianina deriva do grego *anthos*, que significa flor, e *kyanos*, que significa azul, e foi introduzido pelo farmacêutico alemão Ludwig Clamor Marquart (1804-1886) para designar os pigmentos azuis presentes nas flores. Pouco depois, descobriu-se que não só a cor azul, mas praticamente todas as cores vermelhas, azuis, e tons de roxos das flores, frutos, folhas e raízes são devidos a esses pigmentos, e isto resultou na extensão do termo para todos os pigmentos existentes neste grupo de espécies vegetais (Bueno et al. 2012).

As antocianinas são compostos reativos e rapidamente degradados, ou então reagem com outros componentes em mistura para formar compostos incolores ou castanhos. A perda da pigmentação pelas antocianinas também pode ocorrer devido à presença de oxigênio, e como resultado de processamento a altas temperaturas. Para além do oxigênio, a temperatura, a luz, enzimas e o pH têm um efeito na estabilidade das antocianinas, e na coloração do meio que contém estes pigmentos (McGhie and Walton 2007).

As antocianinas são maioritariamente compostos glicosídeos da sua aglicona, as antocianidinas (figura 5).



Anthocyanidin	R ₁	R ₂	Colour
Pelargonidin	H	H	Orange-red
Cyanidin	OH	H	Red
Delphinidin	OH	OH	Pink
Peonidin	OCH ₃	H	Bluish purple
Petunidin	OCH ₃	OH	Purple
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃	Redish purple

Figura 5. Antocianidinas mais comuns e suas composições (del Rio et. al (2012)).

As antocianidinas são bastante instáveis em meio com pH neutro, podendo degradar-se facilmente formando ácidos fenólicos e aldeídos, ou dimerizar tornando-se mais estáveis. As antocianinas por outro lado já são mais estáveis numa gama grande de valores de pH. Este é o principal motivo pelo qual as antocianidinas não se encontram tão abundantemente na natureza na sua forma intacta e são mais rapidamente degradadas quando ingeridas (Bueno et al. 2012).

Em solução aquosa, as antocianinas existem num elevado número de formas moleculares diferentes, que se encontram num equilíbrio dinâmico, tendo sido já registadas oito estruturas moleculares distintas. O catião flavilium é a forma molecular mais abundante quando o pH se encontra inferior a 2. À medida que o pH aumenta, ocorre uma rápida perda de prótons, gerando a estrutura azul quinonóidal. Ao mesmo tempo, uma hidratação mais lenta do catião flavilium também ocorre, formando a forma hemiacetal que é incolor que posteriormente sofre tautomerização através da abertura do anel C para gerar as formas *cis* e *trans* da forma calcona (figura 6) (McGhie and Walton 2007).

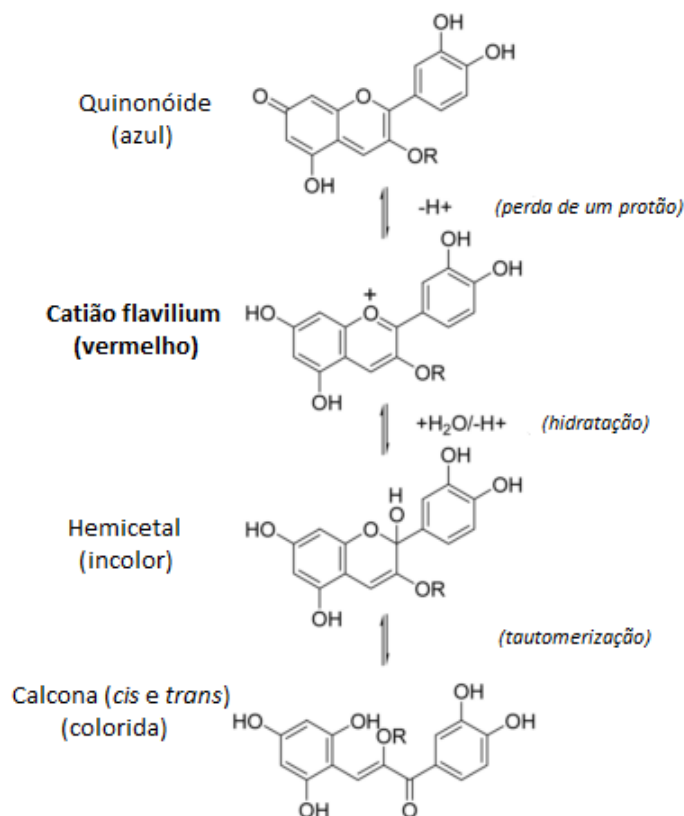
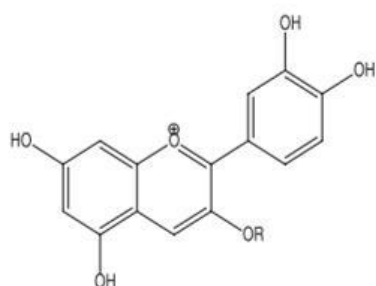


Figura 6. As várias estruturas moleculares conhecidas das antocianinas, que são formadas durante diferentes condições de pH. Adaptado de McGhie e Walton (2007).

O interesse científico elevado, nas antocianinas em específico, está ligado à sua elevada presença na dieta humana, comparativamente a outros flavonoides, levando a crer que grande parte dos efeitos benéficos observados pelo consumo de plantas e vegetais ricas em polifenóis seja da responsabilidade das antocianinas (Cooke et al. 2005).

Encontram-se já identificadas centenas de antocianinas devido às inúmeras possibilidades de conjugação entre as antocianidinas e os resíduos de açúcar que podem ligar (figura 7). Os açúcares encontram-se maioritariamente ligados na posição 3 do anel C ou na posição 5 e/ou 7 do anel A (figura 5).



R = arabinose – cyanidin-3-arabinoside
R = galactoside – cyanidin-3-galactoside
R = glucoside – cyanidin-3-glucoside
R = xylose – cyanidin-3-xyloside

Figura 7. Cianidina e possíveis conjugações com açúcares (Denev et al. 2012).

As diferenças entre as antocianinas devem-se ao número e posição de grupos metoxilo e hidroxilo, à natureza e número de açúcares ligados à molécula, à posição de cada ligando, e ao grau de esterificação com ácidos alifáticos ou aromáticos ligados aos açúcares na molécula (Bueno et al. 2012).

As antocianinas naturais mais comuns nas plantas são glicosídeos de antocianidinas malvidina, cianidina, pelargonidina, delphinidina, petunidina e peonidina, sendo a cianidina a mais comum na dieta e os compostos glicosídeos de cianidina os mais distribuídos pela natureza. Os açúcares conjugados às antocianidinas são a glucose, a galactose e a arabinose, normalmente como 3-glicosídeos ou 3,5-glicosídeos no anel C (figura 5) (Manach et al. 2004, de Freitas and Mateus 2006).

A estrutura química das antocianinas vai influenciar as suas propriedades químicas e assim determinar a sua estabilidade, cor, equilíbrio em água, efeito de copigmentação,

atividade antioxidante e atividade biológica. Muitos fatores, como o pH, a temperatura, a luz, a presença de outros compostos fenólicos, as enzimas, os íons metálicos, os açúcares, o ácido ascórbico e o oxigênio têm impacto na estabilidade das antocianinas (Bueno et al. 2012).

O número de grupos hidroxilo e tipo de açúcares existentes nas antocianinas, bem como os grupos acilados, podem influenciar a sua polaridade, tamanho, e conformação espacial dos componentes individuais. Consequentemente têm impacto na biodisponibilidade observada (Bueno et al. 2012).

1.3.1 - Distribuição e Efeitos Biológicos das Antocianinas

Se as antocianinas são responsáveis por efeitos na saúde, a distribuição destas e dos seus metabolitos entre os tecidos do organismo é uma informação importante para perceber os mecanismos dos efeitos biológicos observados.

Vários estudos levados a cabo com ratos concluíram que metabolitos de antocianinas são encontrados em tecidos do cérebro, rim, fígado e pulmão, apresentando assim uma grande distribuição destes compostos no organismo após o seu consumo (Talavera et al. 2005, El Mohsen et al. 2006, Galvano et al. 2008).

Apesar da ótima distribuição das antocianinas pelo organismo, a sua biodisponibilidade não se apresenta tão boa. A quantidade observada na urina, após a absorção das antocianinas, apresenta-se bastante reduzida em relação à quantidade ingerida, onde na maioria dos estudos se observa uma percentagem menor que 0,1% da quantidade total de antocianinas que foi ingerida. Isto sugere que ocorre uma grande metabolização das antocianinas ao longo de toda a ingestão, no entanto, os estudos de biodisponibilidade das antocianinas não são fáceis, pois existe um grande número de estruturas moleculares diferentes das antocianinas conforme o ambiente em que se encontram (nomeadamente pH), e existe um grande número de potenciais metabolitos que se podem formar (McGhie and Walton 2007).

Encontra-se demonstrado que perdas no conteúdo intestinal por absorção das antocianinas é maior para antocianinas glicosídeas, moderada para antocianinas galactosídeas, e quase inexistente para antocianinas conjugadas com arabinoses e xiloses.

Estes estudos vêm mostrar que diferentes resíduos de açúcar conjugados nas antocianinas irão ser metabolizados de forma distinta após a ingestão (He et al. 2005).

Um estudo levado a cabo por Wu e colaboradores (2006) revelou que após o consumo de antocianinas, de entre os compostos glicosilados, as cianidinas di- e tri- glucósidos apresentavam uma maior concentração no trato gastrointestinal do que a cianidina-3-glucósido. Isto explica-se pelo nível de complexação das antocianinas, ou seja, as antocianinas que apresentam um maior número de conjugações são mais estáveis e assim mais resistentes à microflora do intestino não sendo degradadas ou metabolizadas no trato GI, sendo portanto mais facilmente encontradas na sua forma intata no trato GI (Wu et al. 2006).

Antocianidinas glucósidas mostram assim ser hidrolisadas pela microflora intestinal, sendo que a antocianina que apresenta uma maior absorção ao longo do trato gastrointestinal é a cianidina-3-glucósido (Tian et al. 2006).

Na última década, muitos estudos focaram-se na potencial atividade biológica ou efeitos na saúde em humanos das antocianinas. Embora haja várias evidências indicando a bioatividade das antocianinas, poucos progressos foram efetuados para estabelecer a farmacocinética destes compostos.

Vários estudos recentes com antocianinas purificadas ou extratos ricos em antocianinas *in vitro* vieram confirmar o efeito potencial destes pigmentos naturais. Efeitos demonstrados incluem proteção contra lesões hepáticas, uma redução significativa da pressão arterial, melhoramento da visão, forte atividade anti-inflamatória e antimicrobiana, inibição de mutações causadas por mutagénesis e supressão da proliferação de células cancerígenas humanas. Estes efeitos fisiológicos estão muitas vezes ligados à sua grande atividade antioxidante, comum com outros compostos fenólicos (Kong et al. 2003).

Wang e colaboradores (1997) testaram a capacidade antioxidante de 14 antocianinas diferentes, constatando que apesar de as antocianinas possuírem uma grande deficiência natural de eletrões, e assim, serem bastante reativas, a sua capacidade antioxidante varia consoante o número de grupos hidroxilo que possuem, bem como a sua posição nos anéis. Também as glicosilações das antocianidinas irão ter um impacto na capacidade antioxidante, sendo dependente da aglicona em questão. E ainda, diferentes

açúcares podem ter efeitos diferentes na capacidade antioxidante das antocianinas (Wang et al. 1997).

Tsuda e colaboradores (1996) sugeriram que o mecanismo antioxidante da cianidina-3-glucósido é observado após a metabolização da antocianina no trato gastrointestinal, formando novos radicais capazes de captar radicais livres devido à quebra da estrutura (Tsuda et al. 1996).

Mais tarde, também Tsuda e colaboradores (1999) demonstraram que o metabolito que mais concentração apresenta ao longo do trato gastrointestinal é o ácido protocatecuico, sendo este um ácido fenólico resultante da degradação da cianidina-3-glucósido e, possivelmente o principal responsável pelos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios observados (Tsuda et al. 1999).

Outro efeito biológico também observado com as antocianinas é a sua atividade anti-inflamatória, que é conseguida pela inibição das duas isoformas das enzimas cicloxigenases, COX-1 e COX-2 (Seeram et al. 2001).

1.3.2 - Ácido protocatecuico

Como referido anteriormente, um metabolito frequentemente encontrado no organismo após a ingestão e metabolização de antocianinas é o ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido protocatecuico (figura 8). Este é um ácido fenólico resultante da degradação das antocianinas, principalmente da cianidina-3-glucósido, que é a cianidina mais presente nos alimentos. O ácido protocatecuico tem uma estrutura semelhante a outros ácidos polifenólicos bastante conhecidos como compostos antioxidantes, como o ácido gálgico, o ácido cafeico, o ácido vanílico e o ácido siringico (Tsuda et al. 1999).

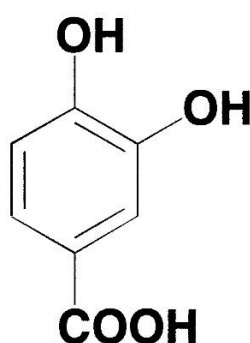


Figura 8. Ácido Protocatecuico

O ácido protocatecuico encontra-se amplamente distribuído nas plantas, e é detetado em bastantes frutos e especiarias. Este composto é um dos principais compostos biológicos ativos de algumas plantas medicinais. O ácido protocatecuico tem sido descrito devido à sua possível atividade antioxidante, antibacteriana, anticancerígena, antidiabética, antiviral, analgésica, cardíaca e anti-inflamatória, entre outras (Kakkar and Bais 2014).

Como metabolito, pode ser encontrado tanto no trato gastrointestinal inferior, como na corrente sanguínea, sendo produzido maioritariamente devido à ação da microflora intestinal, pois grandes concentrações de ácido protocatecuico são encontradas nas fezes após o consumo de cianidinas glucósidas. Especula-se que, as cianidinas glucósidas sofrem desglicosilação no trato gastrointestinal inferior por β -glucosidases da microflora intestinal, e que a aglicona livre pode ser metabolizada, formando ácido protocatecuico ou diretamente degrada devido às condições de pH. Este processo metabólico da aglicona pode ser efetuado diretamente no lúmen do intestino,

ou na corrente sanguínea após a absorção, já que concentrações de ácido protocatecuico também são detetadas na corrente sanguínea (Vitaglione et al. 2007).

Esta elevada formação de ácido protocatecuico no organismo, principalmente na corrente sanguínea e no trato GI, pode explicar a elevada atividade antioxidante e anti-inflamatória observada nestes tecidos. Questiona-se assim, se este ácido fenólico não será o principal causador pelos efeitos benéficos no organismo observados pelo consumo de cianidinas glicosiladas.

1.3.3 - Antocianinas e Inflamação

Substâncias polifenólicas, tais como as antocianinas, possuem uma grande variedade de atividades fisiológicas responsáveis por efeitos na saúde atribuídos a alguns alimentos, tal como já foi referido.

Um desses efeitos é a atividade anti-inflamatória, cujo mecanismo biológico pode estar associado à inibição de expressão de iNOS e conseqüentemente à produção de óxido nítrico (NO), que pode levar à estimulação das vias de ativação de fatores de transcrição de genes inflamatórios como o fator de transcrição NF- κ B (Hidalgo et al. 2012).

Foi observado em estudos com vários tipos de células incubadas com antocianinas a capacidade de inibição das proteínas dependentes da via do NF- κ B, como as proteínas COX-1 e COX-2 e várias interleucinas. As antocianinas inibiram a expressão do mRNA que traduz as proteínas e/ou os níveis de expressão das proteínas (Afaq et al. 2005, Reddy et al. 2005, Rodrigo et al. 2006, Boivin et al. 2007).

Hidalgo e colaboradores (2012) demonstraram que antocianinas da dieta e ácidos hidroxicinâmicos reduzem a indução de vários mediadores inflamatórios, reduzindo a produção do TNF- α , que é uma citocina crucial para a indução da síntese de NO, pelo que observaram também a redução do mediador de *stress* oxidativo NO (Hidalgo et al. 2012).

Concluimos assim, que tanto as antocianinas como os seus metabolitos, os ácidos fenólicos, podem desempenhar um papel relevante na diminuição de marcadores inflamatórios, como as citocinas e moléculas de adesão, participando assim no efeito anti-inflamatório observado quando são consumidos alimentos ricos em antocianinas.

Objetivo do Trabalho

Seguindo a linha de investigação que tem vindo a ser desenvolvida no laboratório e que já demonstrou a capacidade da cianidina-3-glucósido em reduzir significativamente a expressão de mediadores pró-inflamatórios em células HT-29, usadas como modelo de células intestinais, pretendíamos com este trabalho verificar se o ácido protocatecuico também apresentaria ou não atividade anti-inflamatória e desta forma potenciar a atividade da cianidina-3-glucósido *in vivo*.

Para isso começámos por avaliar o seu efeito na produção de óxido nítrico pelas células HT-29, submetidas a um estímulo inflamatório. Posteriormente, verificámos o seu potencial efeito no estado redox das células pela medida do glutatião intracelular e das espécies reativas de oxigénio.

Capítulo 2: Materiais e Métodos

2.1 - Reagentes

A cianidina-3-*o*- β glucosídeo (C3G), purificada a partir de fontes naturais e com um grau de pureza de cerca de 97%, foi adquirida à Extrasynthèse (Genay, França) e usada sob a forma de solução em Dimetilsulfóxido (DMSO) (5 mM). A cianidina-3-glucósido foi conservada no escuro sob atmosfera de nitrogénio a -80°C.

O ácido protocatecuico (etil-3,4-dihidrobenzoato) (AP), assim como outros reagentes nomeadamente, o dimetilsulfoxido (DMSO), o *orto*-ftaldeído, a *N*-etilmaleimida (NEM), o 2,3-diaminonaftaleno (DAN), o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazolio (MTT), o diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂-DA), a L-butiona S,R-sulfoximina (BSO), o fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), as misturas de inibidores de proteases e de inibidores de fosfatases, o ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) e o persulfato de potássio foram obtidos da Sigma-Aldrich Co.

Para a cultura celular, o meio de cultura Dulbecco's Eagle's modificado (DMEM), a tripsina, o soro fetal bovino (FBS) e o tampão fosfato-salino (PBS) a pH 7,4 foram obtidos de Gibco-Invitrogen.

A interleucina 1 α (IL-1 α), o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e o interferão γ (IFN- γ), foram obtidos à Invitrogen (NY, USA).

A linha celular HT-29 (células de adenocarcinoma do cólon humano) foi obtida da European Collection of Cell Cultures (Porton Down, Salisbury, UK).

2.2 - Avaliação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante do ácido protocatecuico e da cianidina-3-glucósido foi avaliada espectrofotometricamente através da redução do radical ABTS e expressa em percentagem de inibição. O poder antioxidante dos compostos foi comparado ao do Trolox, tal como descrito anteriormente (Re et al. 1999).

O Trolox (ácido 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxil), que é um análogo solúvel em água da Vitamina E (α -tocoferol) foi usado como antioxidante de referência.

Brevemente, o catião $ABTS^{\bullet+}$ foi formado por reação do ABTS (7 mM) com o persulfato de potássio (2,5 mM), no escuro, à temperatura ambiente pelo menos durante 16 horas antes de usar. O radical mantém-se estável por mais de dois dias. Para o ensaio, a solução de $ABTS^{\bullet+}$ foi diluída em etanol de forma a obtermos uma absorvância de cerca de 0,70 ($\pm 0,02$) a 734 nm.

O ensaio foi realizado diretamente na cuvete do espectrofotómetro e, a 1,0 mL de solução de ABTS diluída adicionou-se, para uma concentração final, uma alíquota de Trolox, 2,5, 5, 10 e 15 μ M, ácido protocatecuico, 5 μ M, ou cianidina-3-glucósido, 5 μ M. A redução do radical, que se traduz numa perda de cor e por conseguinte numa diminuição do valor de absorvância, foi registada exatamente 1 min após a mistura inicial, durante um intervalo de tempo de 6 min (Re et al. 1999). Todas as determinações foram feitas pelo menos em 3 ensaios diferentes, e em triplicado cada.

Para cada composto foi calculada a percentagem de inibição e no caso do Trolox, foi construída uma curva padrão de forma a relacionar a percentagem de inibição com concentrações distintas de Trolox. No caso dos compostos em estudo a percentagem de inibição foi relacionada com a concentração equivalente de Trolox (Re et al. 1999).

2.3 - Cultura Celular

As células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² em meio DMEM com um suplemento de FBS 10%, penicilina 100 U/mL e streptomina 100 µg/mL, numa incubadora a 37°C, com uma pressão de CO₂ de 5%, e atmosfera húmida até confluência adequada.

Uma vez confluentes, as células foram semeadas em caixas onde se realizaram os ensaios pretendidos. As células foram usadas entre a quarta e a vigésima passagem.

Quando as células se apresentavam com uma confluência de 80%, foi-lhes colocado meio sem soro durante 24 horas, privando-as assim de suplemento para crescimento. As células foram posteriormente tratadas de acordo com os vários objetivos experimentais.

As Células HT-29 foram estimuladas com uma mistura de citocinas consistindo em IL-1α 10 ng/mL, TNF-α 20 ng/mL e IFN-γ 60 ng/mL. Cada citocina foi previamente diluída em PBS com BSA a 1%, e depois adicionada às células quando conveniente. As células foram pré incubadas com cianidina-3-glucósido ou ácido protocatecuico por 1 hora antes de expostas às citocinas e depois mantidas com o estímulo inflamatório em intervalos de tempo diferentes, dependendo do ensaio.

2.4 - Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT que consiste na redução do composto brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difenil-tetrazolio (MTT) a formazana pelas enzimas mitocondriais, e cuja formação é diretamente proporcional ao número de células vivas.

Após incubação por 24 horas com os compostos pretendidos, 8×10⁵ células/poço foram lavadas com PBS e incubadas com MTT (0,5 mg/mL) durante 1 hora, a 37°C. De seguida o meio foi removido e os cristais de formazana formados foram dissolvidos em DMSO. A redução do MTT foi avaliada espectrofotometricamente a 530 nm num leitor de placas Synergy HT. Os resultados foram expressos em valores percentuais usando como base (100%) as células controlo, isto é, células não-tratadas.

2.5 - Medida da Produção de Óxido Nítrico

A produção de óxido nítrico (NO) pelas células intestinais foi determinada como nitrito, quantificando-se o nitrito acumulado no sobrenadante da cultura de células, pela medida de fluorescência do 1-(H)-naftotriazole formado na reação do nitrito com o 2,3-diaminonaftaleno (DAN) (Wright et al. 1997).

Resumidamente, no fim do tempo de incubação das células com os compostos, os sobrenadantes das culturas celulares foram recolhidos e o nitrito foi avaliado. A um volume de 200 µL de sobrenadante misturou-se 200 µL de solução DAN (0,025 mg/mL em HCl 0,62 M), e manteve-se no escuro à temperatura ambiente durante 10 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida com 100 µL de NaOH 3 M.

A fluorescência foi lida num espectrofluorímetro Jasco FP-6200, a um comprimento de onda de excitação de 365 nm e de emissão de 405 nm. Uma curva padrão foi realizada com concentrações conhecidas de nitrito de sódio.

A quantidade de nitrito foi depois expressa em nmol de nitrito por mg de proteína, sendo a quantidade de proteína celular quantificada pelo ensaio colorimétrico de Bradford, recorrendo a um conjunto de reagentes da Bio-Rad (Bio-Rad USA) e usando albumina de soro bovino como padrão.

2.6 - Quantificação intracelular de Glutatião

Os níveis intracelulares de glutatião reduzido (GSH) e de glutatião oxidado (GSSG) foram determinados por ensaio fluorométrico como previamente descrito (Hissin and Hilf 1976).

De forma sucinta, as células, depois de removido o meio de cultura, foram raspadas com tampão fosfato de sódio 100 nM contendo EDTA 5 mM, a pH 8,0. Posteriormente foi adicionado ácido perclórico 0,6 M às amostras, misturando-se bem e deixando repousar durante 20 minutos em gelo. As amostras foram depois centrifugadas a 14000 rpm a 4°C durante 10 minutos.

Para a determinação dos valores de glutatião reduzido, uma alíquota de 100 µL de sobrenadante foi incubada com 100 µL de *orto*-ftaldeído (0,1% m/v em metanol) e 1,8 mL de Na₂HPO₄ 100 mM, pH 8 durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Para a determinação de glutatião oxidado o sobrenadante foi previamente tratado com *N*-etilmaleimida (NEM) durante 30 min e depois incubado com *orto*-ftaldeído em NaOH 100 mM. A intensidade de fluorescência foi depois lida num leitor de placas Synergy HT a comprimentos de onda de excitação e de emissão de 350 nm e 420 nm, respetivamente.

O conteúdo celular de glutatião reduzido e de glutatião oxidado foi calculado por interpolação em curvas de calibração de GSH e GSSG e expresso em nmol de GSH e GSSG por mg de proteína celular previamente avaliada como referido anteriormente.

2.7 - Avaliação Intracelular de Espécies Reativas de Oxigénio

A produção de espécies reativas de oxigénio foi determinada usando o diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂-DA), uma sonda não-fluorescente que atravessa a membrana celular e pode ser oxidada por espécies reativas de oxigénio formando o fluoróforo 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), como previamente descrito (Halliwell and Whiteman 2004).

Brevemente, 20 minutos antes do fim de cada tempo de incubação, as células foram incubadas com DCFH₂-DA 5 µM preparado em DMSO. Após isso, o meio de cultura foi removido, e as células foram lavadas 2 vezes com PBS, e mantidas no tampão durante as leituras de intensidade de fluorescência. As medições foram feitas num leitor de placas Synergy HT (Bio-Tek Instruments) com comprimentos de onda de excitação e de emissão de 485 nm e 530 nm, respetivamente. Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência por mg de proteína. A quantidade de proteína celular foi quantificada como referido anteriormente.

Foram igualmente recolhidas imagens das células sujeitas aos ensaios e visualizadas num microscópio invertido de fluorescência Axiovert 40CFL.

2.8 - Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como o valor médio \pm SEM de pelo menos 3 ensaios independentes, cada um em duplicado. Diferenças entre grupos foram analisados por uma via ANOVA ou por Student's test. Um valor de p abaixo de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Capítulo 3: Resultados e Discussão

Embora a etiologia das doenças inflamatórias crônicas ainda não tenha sido totalmente esclarecida, vários estudos sugerem que fatores tanto genéticos, como ambientais, microbióticos ou imunológicos podem estar envolvidos na patogênese destas doenças (Bruewer et al. 2006, Atreya and Neurath 2010, Frontela et al. 2010, Mandalari et al. 2011).

Tal como em outras doenças inflamatórias, as doenças inflamatórias crônicas intestinais estão caracterizadas por uma desregulação na síntese e libertação de vários mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), resultando numa disrupção da barreira epitelial e danos excessivos nos tecidos (Panaro et al. 2001, Neuman 2007).

Tem sido bastante estudada nos últimos anos a importância das antocianinas e de outros polifenóis na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias crônicas (Paixao et al. 2011, Paixao et al. 2012, Serra et al. 2013).

É do conhecimento geral que os efeitos na saúde dos polifenóis dependem da quantidade ingerida e da biodisponibilidade do polifenol no organismo, que difere bastante entre os vários polifenóis (Manach et al. 2004).

As antocianinas são um tipo de polifenóis abundantes na dieta humana. A sua biodisponibilidade apresenta-se bastante baixa, mas estudos confirmam que podem atingir grandes concentrações no trato gastrointestinal. Sabe-se que estes compostos podem existir com diferentes formas moleculares no organismo, num equilíbrio dinâmico, o que impede que as técnicas atualmente usadas determinem com a maior precisão a verdadeira biodisponibilidade destes compostos (McGhie and Walton 2007).

Vários estudos confirmam o grande poder anti-inflamatório e antioxidante dos polifenóis, e os benefícios que os polifenóis em geral e particularmente as antocianinas podem ter na prevenção de várias doenças (Galvano et al. 2004).

Estas descobertas tornam as antocianinas, e os seus metabolitos, bons alvos de estudo para prevenção e tratamento de inflamação em casos de doenças inflamatórias crônicas. Uma das antocianinas mais abundante na natureza, e por isso aquela que mais tem sido estudada, é a cianidina-3-glucósido (C3G) (Serra et al. 2013).

Da metabolização da cianidina-3-glucósido no intestino, sabe-se que resultam vários metabolitos, sendo o ácido protocatecuico (AP) aquele que apresenta maiores níveis de concentração no trato gastrointestinal (Vitaglione et al. 2007), podendo ser este o principal causador dos efeitos anti-inflamatórios observados no intestino, resultantes do consumo de antocianinas.

Este estudo foi então realizado com o objetivo de comparar os potenciais efeitos protetores da cianidina-3-glucósido com os do ácido protocatecuico em células intestinais (HT-29) sujeitas a um estímulo pro-inflamatório. Uma combinação de citocinas contendo IL-1 α , TNF- α , e IFN- γ foi selecionada como estímulo pro-inflamatório, pois sabe-se que estas citocinas são prontamente libertadas por tecidos danificados ou infecções e são eficientes como indutores de expressão de diferentes genes pro-inflamatórios, dependendo do tipo de células (Nathan 1992, Kolios et al. 1995, Kolios et al. 2006).

3.1 - O Ácido Protocatecuico apresenta menor capacidade antioxidante que a Cianidina-3-glucósido

Nas últimas décadas, bastantes estudos foram realizados com o objetivo de mostrar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos. A principal causa desta atividade é a sua capacidade quelante de metais e de agente redutor.

Os fenóis possuem grupos hidroxilo e carboxilo, que têm a capacidade de ligar metais, particularmente ferro e cobre (Bors et al. 1990). Especula-se que os fenóis podem inativar iões metálicos por quelatação e assim suprimir a reação de Fenton, que é uma das mais importantes fontes de espécies reativas de oxigénio (ROS).

A deficiência natural de eletrões das antocianinas faz com que estes compostos sejam particularmente reativos. O seu potencial antioxidante é modelado pelas suas diferentes estruturas químicas, pela posição dos grupos hidroxilo e carboxilo nos anéis aromáticos e pelas diferenças de pH e de temperatura em que se encontram, tal como referido na introdução. Assim, a capacidade das antocianinas de aceitar eletrões desemparelhados de radicais livres é bastante diversificada apresentando um elevado poder antioxidante (Wang et al. 1997).

Com base nestes conhecimentos da atividade antioxidante dos compostos fenólicos e das antocianinas, em particular, iniciou-se o nosso estudo com um método simples *in vitro* sem uso de células, onde se pudesse comparar a atividade antioxidante do ácido protocatecuico e da cianidina-3-glucósido.

O método usado foi o descrito por Pellegrini (1999), que é um método *screening* de atividade antioxidante aplicável a uma gama grande de compostos incluindo os compostos fenólicos, e que pode ser expressa em termos de capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) (Re et al. 1999).

O ensaio foi realizado como descrito em materiais e métodos e a figura 9 representa a sobreposição dos registos típicos de absorvância a 734 nm ao longo do tempo.

O registo controlo diz respeito à absorvância do radical ABTS^{•+}. Como se verifica pela pequena variação da absorvância ao longo do tempo, trata-se de um radical relativamente estável.

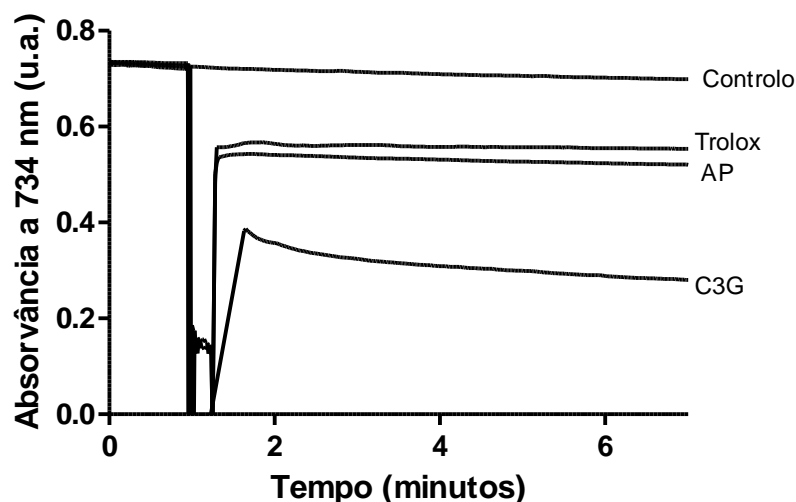


Figura 9. Avaliação do Poder Antioxidante total por redução do radical $ABTS^{\bullet+}$. Ensaio típico de demonstração da medida de absorvância a 734 nm ao longo do tempo, do radical $ABTS^{\bullet+}$ (controlo), ou do efeito na absorvância do radical após adição de Trolox 5 μM , AP 5 μM e C3G 5 μM .

Quando à solução do radical $ABTS^{\bullet+}$ se adiciona um composto com potencial antioxidante, há uma diminuição do valor de absorvância que traduz a capacidade de redução do radical (descoloração).

Pela análise da figura 9 verifica-se que tanto o ácido protocatecuico como a cianidina-3-glucósido têm potencial antioxidante e dado que os registos apresentados dizem respeito a concentrações idênticas, pode afirmar-se que o ácido protocatecuico tem um potencial antioxidante semelhante ao do Trolox e que a cianidina-3-glucósido apresenta um maior potencial antioxidante, uma vez que neste último caso houve uma diminuição mais drástica da absorvância.

Para uma comparação mais objetiva da capacidade antioxidante dos 2 compostos, foi usado o Trolox como composto antioxidante de referência. Para tal, começámos por usar concentrações diferentes de Trolox (2.5, 5, 10 e 15 μM) e avaliar para cada concentração a percentagem de inibição da absorvância da solução de $ABTS^{\bullet+}$ a 734 nm.

A figura 10 representa a curva padrão de Trolox e os 2 pontos fora da curva dizem respeito ao resultado obtido com AP 5 μM (■) e com C3G 5 μM (▲).

O ácido protocatecuico apresenta uma percentagem de inibição semelhante à do Trolox, como alias já tinha sido constatado, mas ainda assim superior. Pela interpolação na reta, pode-se afirmar que a inibição observada com 5 μM de AP é equivalente à inibição observada com uma concentração de Trolox de 6,14 μM .

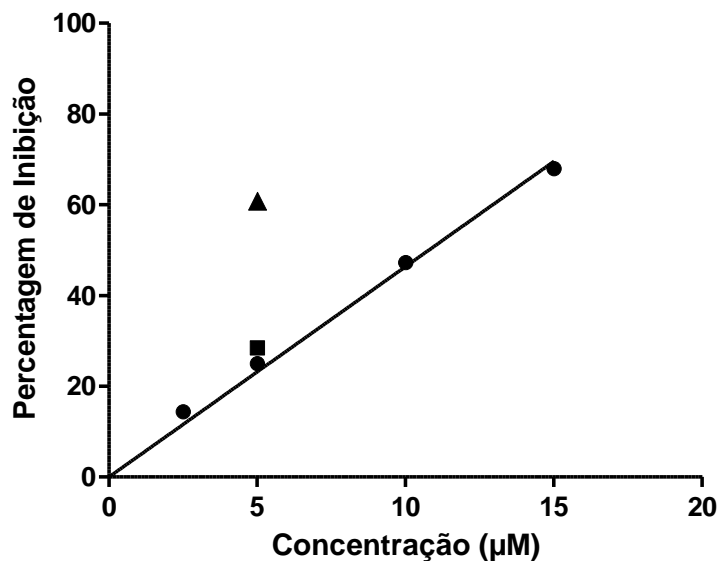


Figura 10. Efeito antioxidante avaliado pela inibição do ABTS^{•+}. O efeito antioxidante foi determinado pela redução do radical ABTS^{•+}. (●) Efeito do Trolox nas concentrações de 2.5, 5, 10 e 15 µM, (■) do ácido protocatecuico na concentração de 5 µM e da (▲) cianidina-3-glucósido na concentração de 5 µM na redução do radical ABTS^{•+}. Os resultados representam o valor médio de pelo menos 3 determinações independentes. Valores de SEM foram determinados, mas devido ao tamanho dos símbolos no gráfico, não é possível visualizar.

A cianidina-3-glucósido apresenta um poder antioxidante bastante superior quer ao Trolox quer ao AP, apresentando-se cerca de 2,4 vezes mais potente que o Trolox, uma vez que a percentagem de inibição obtida com 5 µM de cianidina-3-glucósido é equivalente à inibição observada com uma concentração de Trolox de 13,1 µM.

Comparando a cianidina-3-glucósido e o ácido protocatecuico, a C3G apresenta-se 2,14 vezes mais potente que o ácido protocatecuico.

Com base nestes resultados pode afirmar-se que o ácido protocatecuico tem um elevado poder antioxidante, idêntico ao do Trolox, mas bastante inferior ao da cianidina-3-glucósido, o que nos leva a concluir que a antocianina seja mais eficiente como composto antioxidante do que o seu metabolito.

3.2 - O ácido protocatecuico não apresenta toxicidade em células HT-29

Como as células epiteliais desempenham um papel importante na inflamação intestinal, para este estudo foi usado como modelo celular para a realização dos ensaios, a linha celular HT-29. Esta é uma linha de células epiteliais isoladas a partir de adenocarcinoma do cólon humano que possuem a capacidade de expressar diferentes funções características de células intestinais maduras. Estas células, quando estimuladas com citocinas pro-inflamatórias, podem servir como modelo de inflamação intestinal (Kolios et al. 1995).

Em qualquer estudo em que se use compostos com potenciais efeitos benéficos para o organismo, é importante avaliar o seu efeito na viabilidade celular, a fim de determinar se o composto possui um efeito protetor ou se compromete a viabilidade das células em que se pretende aplicar o composto.

De forma a verificar a toxicidade do ácido protocatecuico nas células HT-29, as células foram incubadas com várias concentrações de ácido protocatecuico (5, 10, 17.5 e 25 μM) durante 24 horas. De seguida, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, tal como foi explicado na secção anterior (figura 11).

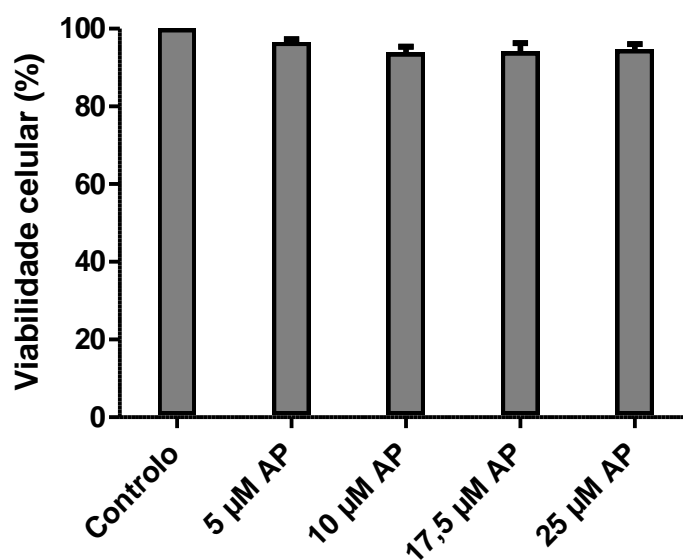


Figura 11. Efeito do ácido protocatecuico na viabilidade de células HT-29. Células HT-29 foram incubadas durante 24 horas com diferentes concentrações de AP (5 a 25 μM). A viabilidade celular foi determinada por redução do MTT e analisada como percentagem das células controlo (sem compostos). Os valores são média \pm SEM de pelo menos três diferentes experiências, cada uma em duplicado.

Da análise dos resultados conclui-se que na gama de concentrações utilizadas no estudo, o ácido protocatecuico não apresenta toxicidade para as células durante as 24 horas testadas (figura 11), estando portanto a viabilidade celular garantida.

De seguida verificou-se se a mistura de citocinas a usar como estímulo pró-inflamatório induziria ou não perda de viabilidade celular, e qual seria o efeito da pré-incubação das células com o ácido protocatecuico antes da indução do processo inflamatório pela mistura de citocinas. As condições iniciais de incubação são idênticas, tendo sido as células incubadas com as mesmas concentrações de AP usadas anteriormente.

Assim, uma hora após a incubação com o ácido protocatecuico, as células foram sujeitas ao estímulo pelas citocinas, tendo-se mantido depois o período de incubação por 24 horas. A viabilidade foi avaliada da mesma forma, pelo ensaio de MTT (figura 12).

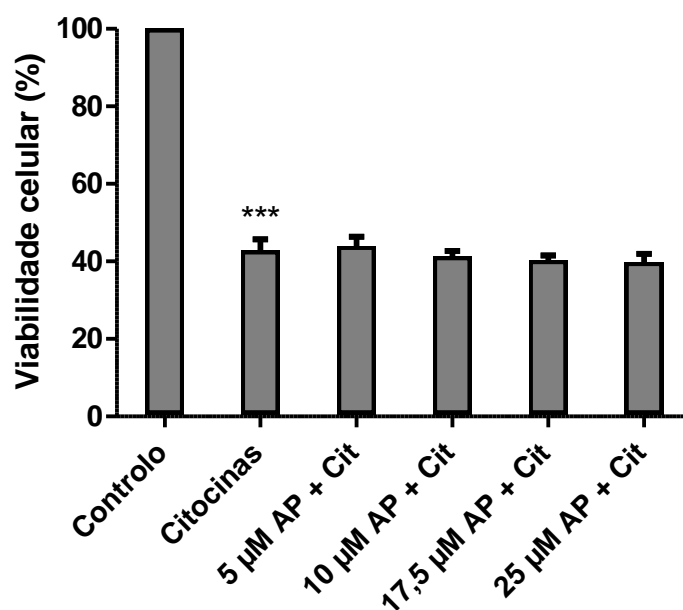


Figura 12. Efeito do ácido protocatecuico na viabilidade de células HT-29 submetidas a estímulo inflamatório. Células HT-29 foram incubadas com diferentes concentrações de AP (5 a 25 µM). Após uma hora foram sujeitas a uma mistura de citocinas onde se mantiveram durante 24h. A viabilidade celular foi determinada por redução do MTT e expresso em percentagem das células controlo (sem compostos). Os valores são média ± SEM de pelo menos três experiências diferentes, cada uma em duplicado. ***P<0.001 vs Controlo.

Tal como está evidenciado na figura 12, pode-se verificar que as citocinas são tóxicas para as células HT-29, induzindo uma perda de viabilidade celular de cerca de 58%.

Nos ensaios realizados com células pré-incubadas com concentrações diversas de AP, antes do estímulo inflamatório, a viabilidade celular apresenta-se semelhante ao controlo positivo, isto é, células incubadas apenas com o estímulo pro-inflamatório.

Em conclusão o ácido protocatecuico não protegeu as células HT-29 da toxicidade induzida pela mistura de citocinas, mesmo na concentração mais elevada.

Já foi previamente descrito que, nas mesmas condições do nosso estudo, a cianidina-3-glucósido não apresenta toxicidade para as células HT-29 nas concentrações de 12.5, 25 e 50 μ M. Nesse mesmo estudo, também foi realizado um ensaio para se observar se ocorreria proteção das células perante o estímulo pro-inflamatório pela mistura de citocinas mostrando que a viabilidade celular foi comprometida a aproximadamente 50% com o estímulo pro-inflamatório (Serra et al. 2013).

Com os resultados do estudo realizado com a cianidina-3-glucósido já descrito, podemos comparar os dois compostos, e tanto o ácido protocatecuico como a cianidina-3-glucósido apresentam resultados semelhantes na viabilidade celular.

Ambos os compostos não são tóxicos para as células HT-29, no entanto também não as protegem quando as células foram posteriormente incubadas com o estímulo pro-inflamatório.

3.3 - O ácido protocatecuico contrariamente à cianidina-3-glucósido apresenta-se pouco eficaz na inibição da produção de NO

O Óxido nítrico (NO) é um radical livre produzido a partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Este é um mediador molecular de vários processos fisiológicos, incluindo vasodilatação, inflamação, imunidade e neuro transmissão. É também bastante importante na manutenção e regulação da permeabilidade microvascular e epitelial (Kolios et al. 1995).

Grandes quantidades de NO podem no entanto destruir tecidos e alterar respostas celulares. A produção excessiva de citocinas aquando do processo inflamatório, pode levar à indução da expressão de iNOS, e conseqüentemente à produção excessiva de NO (Beckman et al. 1990).

Compostos capazes de bloquear a produção de NO pela supressão da indução de iNOS são bastante interessantes como agentes anti-inflamatórios. Por este motivo, é de todo o interesse estudar qual o efeito do ácido protocatecuico na indução da expressão de iNOS.

Para investigar se o ácido protocatecuico realiza esse efeito de inibição da produção de NO, as células HT-29 foram pré-incubadas durante uma hora com várias concentrações de AP (5, 10, 17.5 e 25 μ M), e posteriormente estimuladas com a mistura de citocinas mencionada anteriormente. Os níveis de NO foram depois determinados no sobrenadante das células por ensaio fluorométrico com base na reação do nitrito com o 2,3-diaminonapftaleno (DAN), como foi explicado no capítulo anterior.

Da análise dos resultados obtidos e representados na figura 13, pode concluir-se que as citocinas levam a uma produção significativa de NO pelas células e que esta produção, embora menor na presença do ácido protocatecuico, não é significativamente diferente.

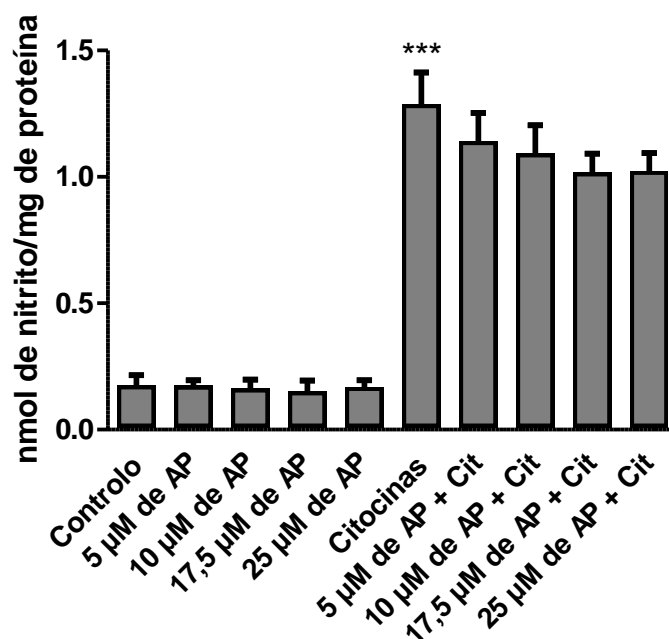


Figura 13. Efeito do AP nos níveis extracelulares de nitrito induzida por citocinas em células HT-29. As células foram pré-incubadas com 5, 10, 17,5 e 25 μM de AP e depois tratadas com citocinas durante 24 horas. A produção pelas células foi determinada por ensaio fluorométrico com base na reação do nitrito com DAN, como descrito anteriormente. Os valores representados correspondem à média \pm SEM de pelo menos três experiências diferentes, cada uma em duplicado. *** $<P,0.001$ vs Controlo.

Estudos prévios realizados no laboratório demonstraram uma proteção significativa das células quando pré-incubadas com cianidina-3-glucósido e posteriormente estimuladas com a mistura de citocinas (Serra et al. 2013).

Com base nesses resultados, foram efetuados ensaios de forma a comparar o efeito do ácido protocatecuico e da cianidina-3-glucósido nos níveis de NO, usando uma concentração de 25 μM de AP e de 25 μM de C3G.

A figura 14 representa os resultados do estudo comparativo do ácido protocatecuico e da cianidina-3-glucósido na produção de óxido nítrico, induzida pela mistura de citocinas.

De facto, a pré-incubação das células com cianidina-3-glucósido leva a uma redução significativa do NO produzido pelas células, na ordem dos 56%, enquanto que nas células pré-incubadas com o ácido protocatecuico, embora se verifique também uma redução nos níveis de NO produzido pelas células, essa redução não é significativa.

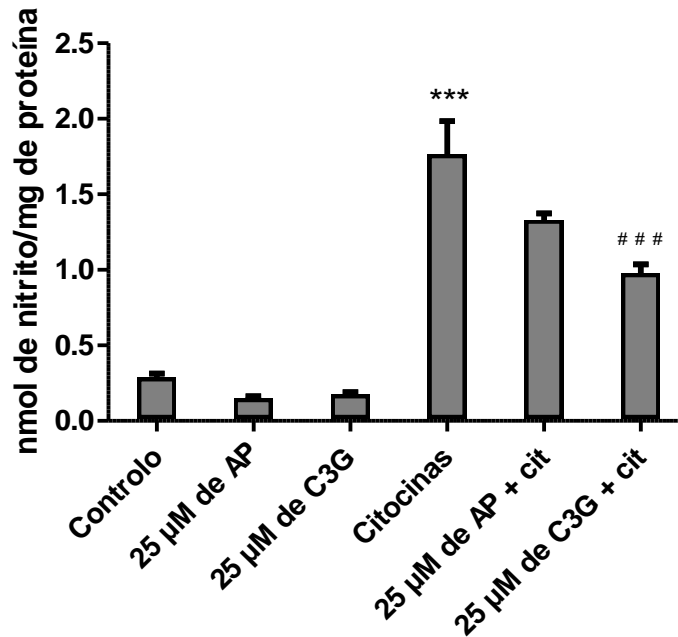


Figura 14. Comparação do efeito do ácido protocatecuico e da cianidina-3-glucósido nos níveis extracelulares de nitrito induzida por citocinas em células HT-29. As células foram pré-incubadas com 25 µM de AP e 25 µM de C3G e depois tratadas com citocinas por 24 horas. A produção de nitrito pelas células foi determinada por ensaio fluorométrico com base na reação do nitrito com DAN, como descrito anteriormente. As barras representam o valor médio ± SEM de pelo menos três experiências diferentes, cada uma em duplicado. *** P,0.001 vs Controlo, ### P<0.001 vs Citocinas.

Um aumento na produção de NO é observado no desenvolvimento de várias doenças inflamatórias, e deve-se provavelmente a um aumento na expressão de iNOS aquando de uma produção excessiva de citocinas pro-inflamatórias (Li and Verma 2002, Keklikoglu et al. 2008).

Em pacientes com inflamação intestinal crónica é frequentemente observada uma regulação anormal da via do fator nuclear κ B (NF- κ B), sendo que a ativação desta via é talvez um dos principais promotores da expressão de vários fatores pro-inflamatórios observados, como é o caso da expressão de iNOS (Lin and Lin 1997, Li and Verma 2002, Atreya et al. 2008).

O efeito observado com a cianidina-3-glucósido podia ser atribuído à inibição do NF- κ B. De facto, vários estudos com outros compostos polifenólicos demonstraram que estes reduzem a expressão do mRNA da iNOS através da prevenção da ligação do NF- κ B ao promotor da iNOS, e assim inibirem a indução da transcrição da iNOS (Keklikoglu et al. 2008).

Também em estudos realizados no laboratório com a cianidina-3-glucósido mostraram que ocorre uma redução significativa dos níveis de nitrito de cerca de 75%, mostrando assim que este composto foi capaz de inibir a produção de NO, diminuindo a expressão de iNOS. No estudo é efetuada uma comparação entre a cianidina-3-glucósido e o ácido 5-aminossalicílico (5-ASA), que é um potente agente terapêutico anti-inflamatório, mostrando que o composto polifenólico atua de forma semelhante ao 5-ASA, numa concentração 20 vezes inferior (Serra et al. 2013).

3.4 - Efeito do Ácido Protocatecuico e da Cianidina-3-glucósido nos níveis intracelulares de Glutatião

Sabe-se que durante o processo inflamatório ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo um dos principais sinais de inflamação, e são responsáveis por grande parte dos danos nos tecidos e aumento da permeabilidade epitelial (Xavier and Podolsky 2007).

O glutatião é uma molécula não proteica que possui um grupo -SH bastante importante na proteção das células contra danos oxidativos por espécies reativas de oxigênio geradas durante o metabolismo celular normal, sendo um dos mais importantes antioxidantes endógenos produzidos pelas células. O glutatião também funciona como um substrato importante em reações enzimáticas de desintoxicação (Griffith 1999).

O glutatião reduzido (GSH) pode ser facilmente oxidado (GSSG), e a razão das duas formas é crucial para a caracterização do *stress* oxidativo nas células (Masella et al. 2005).

Para além das funções já mencionadas, o glutatião reduzido desempenha um papel importante nas células epiteliais intestinais, pois a adequada concentração de GSH é necessária para que ocorra a proliferação celular, sendo o estado redox (avaliado pela razão de GSH/GSSG) das células epiteliais intestinais bastante importante no controlo do crescimento intestinal (Aw 2003).

A fim de avaliar o efeito dos nossos compostos no estado redox das células HT-29, realizaram-se ensaios em que as células foram previamente incubadas com o ácido protocatecuico e a cianidina-3-glucósido e depois submetidas ao estímulo inflamatório.

No entanto, começámos por fazer um estudo cinético do efeito das citocinas nos níveis de glutatião reduzido. As células foram estimuladas com a mistura de citocinas durante 1, 2, 4, 6, 16 e 24 horas, e os níveis de glutatião reduzido determinados no fim de cada tempo. O glutatião reduzido foi calculado por um método fluorométrico descrito por Hissin e Hilf (1976), que usa o *orto*-ftaldeído (OPT) como reagente fluorescente, tirando vantagem da reação do GSH com OPT a pH 8 como descrito em Materiais e Métodos.

Os resultados obtidos estão representados no gráfico da figura 15, onde se observa que, as citocinas levam a uma diminuição dos níveis intracelulares de glutatião reduzido. Esta diminuição no entanto, não ocorre de forma imediata mas apenas apresenta significado estatístico ao fim de 16 horas, sendo mais evidente ao fim de 24 horas.

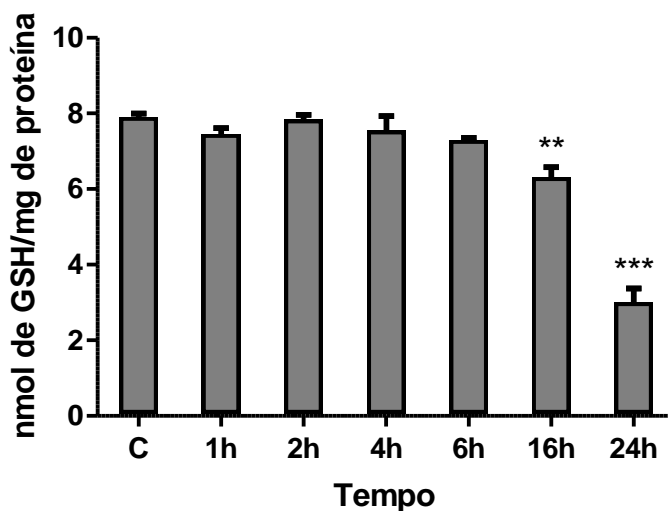


Figura 15. Estudo cinético dos níveis de glutatião reduzido com HT-29 após estímulo com citocinas. As células foram sujeitas a um tratamento com citocinas, que estimula um efeito de inflamação crônica, durante diferentes intervalos de tempo (1, 2, 4, 6, 16 e 24 horas). Os níveis de GSH foram determinados por um método fluorométrico, usando OPT como reagente fluorescente. As barras representam o valor médio \pm SEM de pelo menos três experiências diferentes, cada uma em duplicado. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Controlo.

Fomos então de seguida ver se o ácido protocatecuico e a cianidina-3-glucósido protegiam as células do estímulo inflamatório e impediam a diminuição dos níveis intracelulares de glutatião reduzido.

Para isso, as células HT-29 foram pré-incubadas com 25 μ M de AP e 25 μ M de C3G, e estimuladas com a mistura de citocinas após uma hora. Os níveis de GSH foram determinados após 24 horas do início do estímulo pro-inflamatório.

Com os resultados obtidos, construímos o gráfico da figura 16 e constatamos que os níveis de glutatião reduzido não se alteraram com a pré-incubação das células com o ácido protocatecuico ou a cianidina-3-glucósido, o que sugere que os compostos não protegeram as células do estímulo pro-inflamatório estabilizando os níveis de GSH, ao contrário do que seria de esperar. Também só por si, isto é, em células só incubadas com o ácido protocatecuico ou a cianidina-3-glucósido não houve qualquer alteração dos níveis de glutatião reduzido.

Estes resultados levaram-nos a questionar o que aconteceria ao glutatião total intracelular, pois se ocorreu uma diminuição dos níveis de glutatião reduzido, talvez os níveis de glutatião oxidado aumentassem.

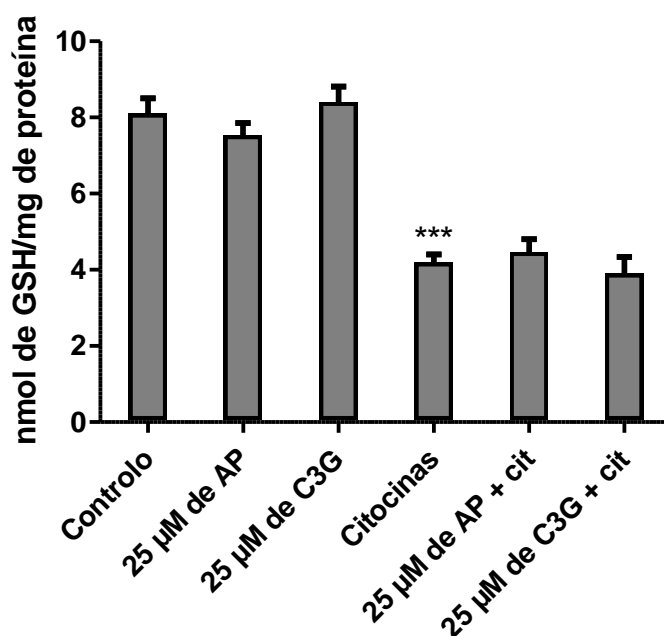


Figura 16. Comparação do efeito de ácido protocatecuico e de cianidina-3-glucose nos níveis de glutatião reduzido em células HT-29 estimuladas ou não com citocinas. As células HT-29 foram estimuladas ou não com uma mistura de citocinas, tendo sido pré-incubadas uma hora antes com 25 µM de AP e 25 µM de C3G. Os níveis de GSH foram determinados por um método fluorométrico, usando OPT como reagente fluorescente. As barras representam o valor médio \pm SEM de pelo menos três experiências diferentes, cada uma em duplicado. *** $P < 0.001$ vs Controlo.

Verificaram-se, então, os níveis intracelulares de glutatião oxidado nas amostras. Os valores de GSSG foram determinados pelo mesmo método fluorométrico descrito anteriormente, com a diferença de que para obtenção dos valores de GSSG, as amostras são pré-tratadas durante 30 minutos com *N*-etilmaleimida (NEM) para prevenir

interferências do GSH com o GSSG aquando da leitura dos valores, e os valores são depois determinados a pH 12.

Tal como apresentado na figura 17, as citocinas não induziram a oxidação do glutatião, pois se isso ocorresse, com a diminuição dos níveis de GSH, ocorreria o aumento dos níveis de GSSG. No entanto, verificou-se uma depleção nos níveis de glutatião oxidado, tal como se tinha verificado com o glutatião reduzido.

Também neste caso a pré-incubação das células com ácido protocatecuico e cianidina-3-glucósido não contrariou o efeito das citocinas, não se observando igualmente proteção pelos compostos, assim como só por si também não interferiram nos níveis de glutatião oxidado.

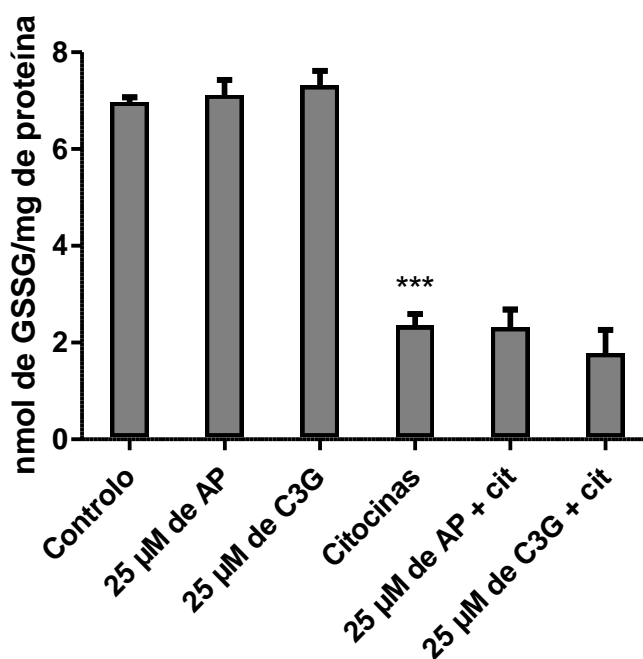


Figura 17. Comparação do efeito de AP e de C3G nos níveis de GSSG em células HT-29 estimuladas com citocinas. As células HT-29 foram estimuladas com uma mistura de citocinas durante 24 horas, tendo sido pré-incubadas uma hora antes com 25 μM de AP e 25 μM de C3G. Os níveis de GSSG foram determinados por um método fluorométrico, usando OPT como reagente fluorescente. Os valores são o valor médio ± SEM de pelo menos três experiências diferentes, cada uma em duplicado. *** $P < 0.001$ vs Controlo.

Para confirmar este resultado, determinámos a razão GSH/GSSG, que é um bom marcador do *stress* oxidativo celular e no nosso caso, conforme evidenciado na figura 18, a razão glutatião reduzido/glutatião oxidado aumenta nas células que foram sujeitas ao estímulo pro-inflamatório. Este resultado levou-nos a pensar que as citocinas provavelmente não oxidam o glutatião mas talvez inibam a sua síntese, o que justificaria a diminuição dos níveis de GSH e GSSG nas células, tal como é observado nos resultados apresentados na figura 16 e 17.

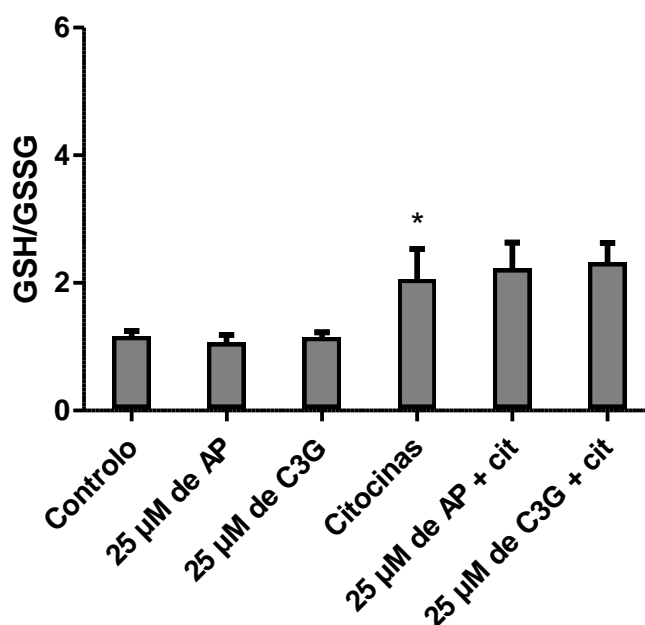


Figura 18. Relação entre os níveis de GSH e GSSG obtidos nos ensaios de comparação do efeito de AP e de C3G em células HT-29 estimuladas ou não com citocinas. Os valores foram obtidos pela divisão individual dos níveis de GSH e GSSG obtidos nos ensaios anteriores da figura 7 e 8. Os valores são o valor médio \pm SEM de pelo menos três experiências diferentes, em duplicado cada uma. * $P < 0.05$ vs Controlo.

Para validar esta hipótese de inibição da síntese de glutatião, incubaram-se as células com concentrações diferentes de L-Butiona-S, R-sulfoximina (BSO). A BSO é um inibidor específico da γ -glutamylcisteinil ligase, sendo esta uma enzima limitante na síntese de novo do GSH, que consequentemente diminui os níveis de glutatião reduzido em vários tecidos (Drew and Miners 1984).

As células HT-29 foram então incubadas com várias concentrações de BSO (100, 250, 500 e 1000 μ M) durante 24 horas, e os níveis de glutatião oxidado e reduzido foram avaliados.

Na presença de BSO, o nível intracelular de glutatião diminui como seria de esperar, observando-se uma diminuição tanto nos níveis de GSH como de GSSG (figura 19). Este efeito é idêntico ao observado quando submetemos as células ao estímulo pro-inflamatório da mistura de citocinas.

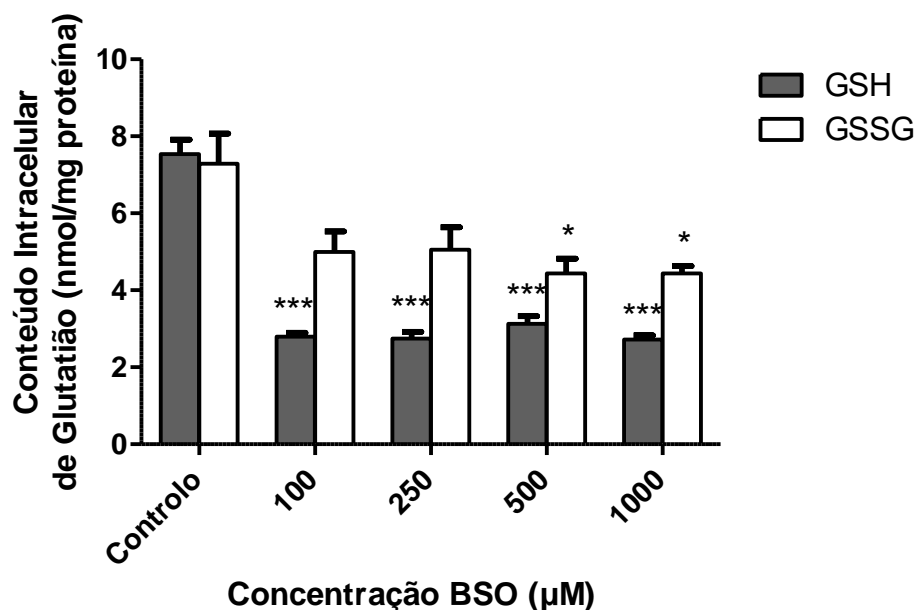


Figura 19. Efeito de várias concentrações de BSO nos níveis intracelulares de Glutatião em células HT-29. As células foram incubadas com várias concentrações de BSO (100, 250, 500 E 1000 μM) durante 24 horas. Os níveis de GSH e de GSSG foram determinados por um método fluorométrico, usando OPT como reagente fluorescente. As barras são o valor médio ± SEM de pelo menos três experiências diferentes, cada uma em duplicado. *P<0.05 vs Controlo branco ***P<0.001 vs Controlo cinza.

Já se encontra descrito que a inibição da síntese de glutatião pode ocorrer de várias formas, sendo que a principal forma de inibição é através de alterações na enzima γ -glutamilcisteinil ligase (GCL) pois é uma enzima limitante na síntese de novo de GSH (Calvin et al. 1986, Manderscheid and Wild 1986, Anderson 1998).

As citocinas parecem ter um efeito idêntico à BSO, isto é, provavelmente inibem a síntese de glutatião e, nem o ácido protocatecuico nem a cianidina-3-glucósido revertem esse efeito.

Existem já estudos relativos ao efeito do ácido protocatecuico, da cianidina-3-glucósido e de outros compostos polifenólicos nos níveis intracelulares de

GSH. Por exemplo, Liu e Wang (2002) mostraram que a ingestão de ácido protocatecuico por ratos fez diminuir o *stress* oxidativo repondo os níveis de glutatião reduzido aquando da indução de um efeito de hepatotoxicidade por *tert*-butilhidroperóxido (t-BHP), um análogo de hidroperóxidos lipídicos, que levou a uma grande depleção dos níveis de glutatião reduzido no fígado (Liu et al. 2002).

Zhu e Jia (2012) conseguiram provar que a cianidina-3-glucósido ativa um mecanismo de defesa antioxidante contra a produção excessiva de espécies reativas de oxigénio, através da ativação da síntese de glutatião reduzido em células de hepatoma. Ocorreu assim um aumento do conteúdo intracelular total de glutatião, e consequentemente uma diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigénio e do *stress* oxidativo (Zhu et al. 2012).

De uma forma geral, os compostos polifenólicos já se encontram bastante bem descritos como capazes de aumentar os níveis intracelulares de glutatião reduzido, e consequentemente diminuir a peroxidação lipídica com a diminuição do *stress* oxidativo (Masella et al. 2005, Rahman et al. 2006).

3.5 - O ácido protocatecuico tal como a cianidina-3-glucósido inibe a formação de espécies reativas de oxigénio intracelulares induzidas após incubação das células com a mistura de citocinas

Uma das características da inflamação crónica é o aumento de espécies reativas de oxigénio nas células, aumentando assim o seu *stress* oxidativo. Os polifenóis são conhecidos pela sua capacidade antioxidante, ou seja, capacidade de prevenir ou diminuir o *stress* oxidativo.

Neste sentido, decidimos avaliar os níveis de espécies reativas de oxigénio (ROS) nas células, e observar se as citocinas induziam a formação de ROS.

Para avaliarmos os níveis de ROS nas células, foi usado um ensaio usando o fluoróforo diclorofluoresceína (DCF), que se forma devido à oxidação da molécula polar não fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂-DA).

A DCFH₂-DA atravessa a membrana celular, e uma vez dentro das células, as esterases intracelulares clivam a parte diacetato formando DCFH, que se distribui pelo citosol podendo ser oxidado a DCF por uma variedade de espécies reativas (Murrant and Reid 2001). A extensão da oxidação do composto é indicada pelo aumento da fluorescência de DCF, que é um indício da formação de espécies oxidantes.

Começámos por observar o efeito das citocinas nos níveis de ROS nas células HT-29, ao fim de 16 e 24 horas. Tal como se observa na figura 20, ocorreu formação de espécies reativas de oxigénio tanto às 16 horas como 24h, verificando-se uma intensidade de fluorescência superior às 24 horas.

Os resultados demonstram assim um aumento de espécies reativas intracelulares após o estímulo pro-inflamatório, sugerindo que ocorreu *stress* oxidativo celular.

De seguida, fomos verificar se o ácido protocatecuico e a cianidina-3-glucósido teriam capacidade para impedir a produção de espécies reativas de oxigénio pelas células quando submetidas ao estímulo pro-inflamatório.

Procedeu-se então à pré incubação das células com ácido protocatecuico e cianidina-3-glucósido por uma hora, antes do estímulo com as citocinas, deixando-se incubar depois por 24 horas (figura 21).

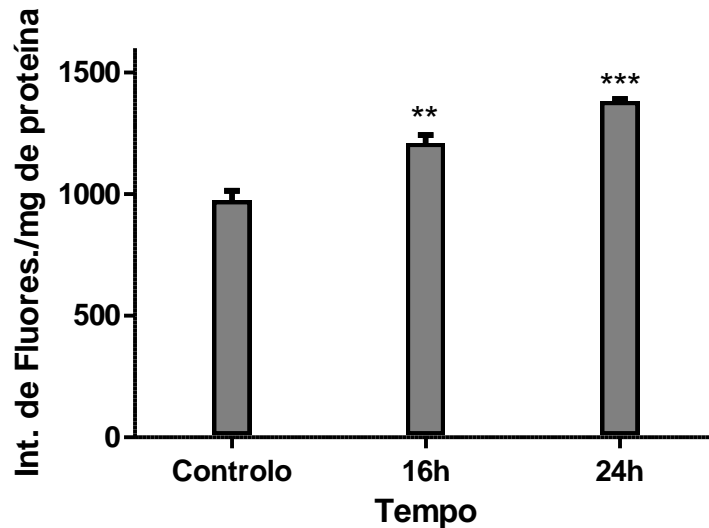


Figura 20. Produção de espécies reativas de oxigênio em células HT-29 induzida pela mistura de citocinas. As células HT-29 foram incubadas com a mistura de citocinas durante intervalos de tempo diferentes (16 e 24 horas). Os níveis de ROS intracelulares foram determinados pela oxidação de DCFDA em termos de intensidade de fluorescência devido à presença de DCF. Os resultados são expressos em intensidade de fluorescência por miligrama de proteína. Os resultados são o valor médio \pm SEM de pelo menos três experiências diferentes, cada uma em duplicado. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Controlo.

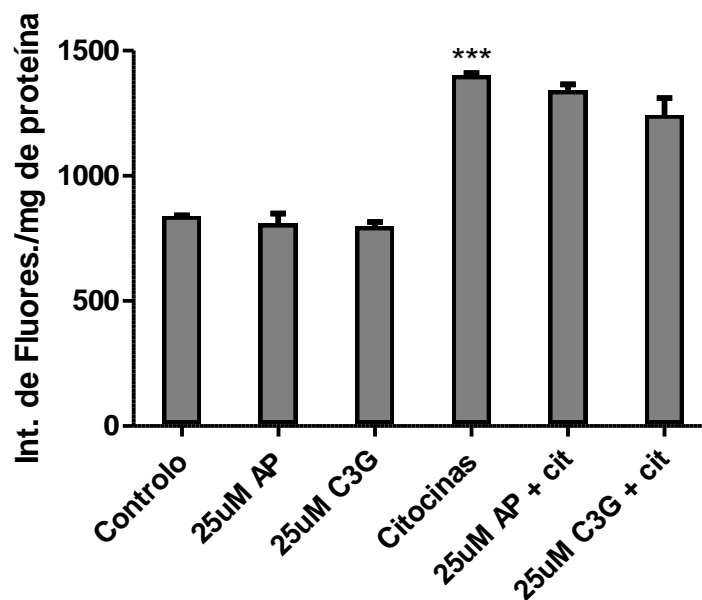


Figura 21. Comparação do efeito de AP e de C3G nos níveis de produção de ROS em células HT-29 estimuladas com citocinas. As células HT-29 foram incubadas com a mistura de citocinas durante 24 horas, tendo sido pré-incubadas por uma hora com 25 μ M de AP e C3G. Os níveis de ROS intracelulares foram determinados pela oxidação de DCFDA em termos de intensidade de fluorescência devido à presença de DCF. Os resultados são expressos em intensidade de fluorescência por miligrama de proteína. Os valores são o valor médio \pm SEM de pelo menos três experiências diferentes, cada uma em duplicado. *** $P < 0.001$ vs Controlo.

Os resultados obtidos e apresentados na figura 21 mostram a medida de intensidade de fluorescência, tal como realizado no ensaio anterior. Os valores com a pré-incubação das células com ácido protocatecuico e cianidina-3-glucósido apresentam-se menores relativamente ao controlo positivo, apenas incubado com as citocinas, no entanto não são estatisticamente significativos.

Estes resultados vão contra o esperado, pois os compostos usados apresentam poder antioxidante como já foi demonstrado anteriormente no ensaio *in vitro* realizado com o ABTS.

Para confirmar os resultados e dado que a sonda utilizada entra na célula e uma vez oxidada é fluorescente, fomos observar as células ao microscópio de fluorescência.

Nas imagens apresentadas na figura 22 pode observar-se que de facto ocorreu uma diminuição da intensidade de fluorescência nas células pré-incubadas com os compostos, antes do estímulo com a mistura de citocinas, em comparação com a imagem recolhida das células que apenas foi incubada com as citocinas.

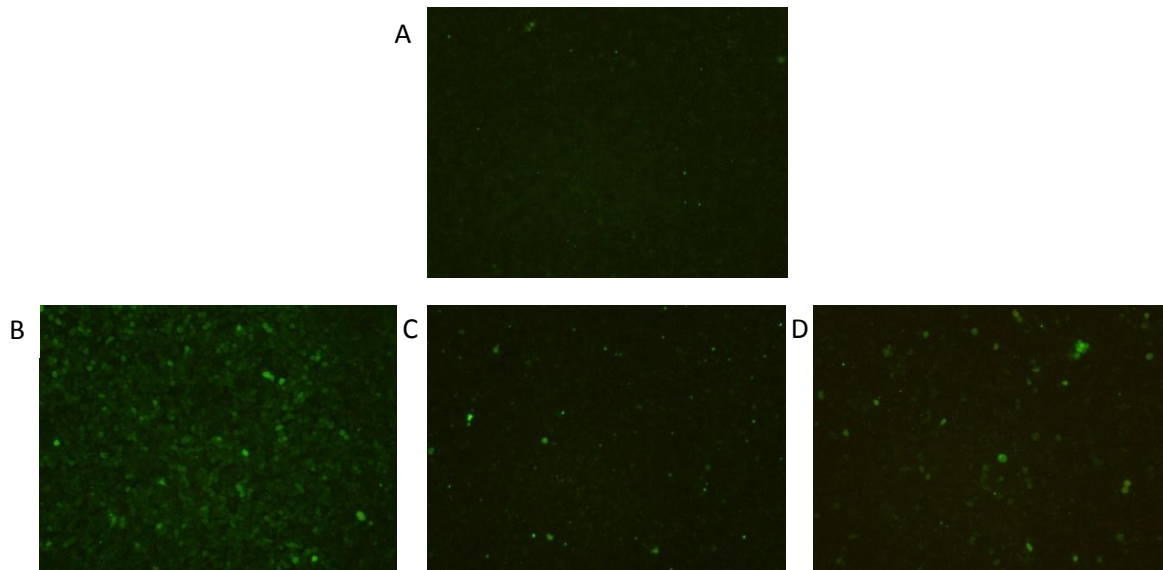


Figura 22. Imagens representativas das células HT-29 por microscopia de fluorescência. As células HT-29 foram incubadas com a mistura de citocinas durante 24 horas, tendo sido pré-incubadas por uma hora com 25 μ M de AP e C3G. A verde observa-se o fluoróforo DCF que é indicativo da existência de espécies reactivas de oxigénio. A – Células HT-29 sem tratamento (controlo -); B – Células HT-29 com estímulo da mistura de citocinas (controlo +); C – Células HT-29 pré-incubadas com AP por uma hora e posteriormente incubadas durante 24 horas com a mistura de citocinas; D – Células HT-29 pré-incubadas com C3G por uma hora e posteriormente incubadas durante 24 horas com a mistura de citocinas.

Estas imagens indicam que realmente ocorre um aumento do *stress* oxidativo celular quando as células são estimuladas com a mistura de citocinas. Este *stress* é no entanto menor na presença do ácido protocatecuico ou da cianidina-3-glucósido, indicando que os compostos em estudo apresentam algum poder antioxidante intra-celularmente.

Os compostos ácido protocatecuico e cianidina-3-glucósido mostram-se assim capazes de diminuir a quantidade de espécies reativas nas células HT-29, como é possível observar pelas imagens (C) e (D) onde existe uma diminuição nítida de intensidade de fluorescência.

Os resultados mostram-se assim de acordo com muitos estudos já descritos tanto para a cianidina-3-glucósido como para o ácido protocatecuico, onde se comprova que realmente tanto a cianidina-3-glucósido como o ácido protocatecuico são compostos com poder antioxidante.

Tal como Wang e colaboradores (1997) demonstraram, a cianidina-3-glucósido apresentou o maior poder antioxidante em comparação com outras 14 antocianinas também testadas. Mais recentemente, Amorini e colaboradores (2001), confirmaram o elevado poder antioxidante da cianidina-3-glucósido na proteção da oxidação lipídica, onde a cianidina-3-glucósido apresentou poder antioxidante, independente do pH, superior ao resveratrol e ao ácido ascórbico (Wang et al. 1997, Amorini et al. 2003).

Os autores Li e colaboradores (2011) testaram o poder antioxidante do ácido protocatecuico usando vários ensaios *in vitro* de avaliação do poder antioxidante, onde o ácido protocatecuico apresentou um elevado poder antioxidante tanto em meio aquoso como lipídico, apresentando antioxidação tanto por meio de quelatação de metais, como de captação de radicais livres (Li et al. 2011).

Estudos em células mostram igualmente o grande potencial antioxidante da cianidina-3-glucósido, um exemplo é o estudo levado a cabo por Ding e colaboradores (2006), onde a formação de espécies reativas de oxigênio pela exposição a raios ultravioleta foi completamente inibida pela pré-incubação de cianidina-3-glucósido em células da epiderme de ratos (Ding et al. 2006).

Existem poucos estudos onde é realizada a avaliação do potencial antioxidante do ácido protocatecuico em células, no entanto, recentemente os autores Cha e colaboradores (2014) observaram que o ácido protocatecuico possui um elevado poder

antioxidante. Perante um estímulo de indução da síntese de espécies reativas de oxigênio (H_2O_2 ou radiação ultravioleta) verificaram que a pré-incubação de células de queratinócitos humanas com ácido protocatecuico fez diminuir os níveis de ROS intracelulares (Cha et al. 2014).

Conclusão

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) compreendem um conjunto de doenças inflamatórias crônicas cuja incidência mundial tem vindo a aumentar (Romier et al. 2009). A descoberta de uma forma de travar o desenvolvimento da doença torna-se portanto crucial.

Os polifenóis, nomeadamente as antocianinas, encontram-se dentro das substâncias mais seguras e viáveis para a prevenção de várias doenças, incluindo aquelas relacionadas com o *stress* oxidativo e a inflamação podendo ser uma alternativa natural para a prevenção e tratamento das DII (Romier et al. 2009, Frontela et al. 2010).

Neste sentido, efetuámos um estudo comparativo do potencial efeito anti-inflamatório e antioxidante da cianidina-3-glucósido e do ácido protocatecuico, um metabolito normalmente formado no trato gastrointestinal, usando um modelo celular de inflamação intestinal.

Começámos por avaliar o poder antioxidante da cianidina-3-glucósido e do ácido protocatecuico, comparativamente com o Trolox, um análogo solúvel da vitamina E. Neste ensaio concluiu-se que tanto o ácido protocatecuico como a cianidina-3-glucósido são potentes agentes antioxidantes pois ambos apresentaram uma maior capacidade antioxidante que o Trolox ainda que mais notório no caso da cianidina-3-glucósido. Esta revelou ser 2,4 vezes mais potente do que o Trolox na redução do radical ABTS, enquanto que o ácido protocatecuico apresentou uma eficiência bastante semelhante à do Trolox, embora ligeiramente superior.

Foi demonstrado, posteriormente, que a viabilidade celular em células HT-29, não é comprometida com a incubação das células com ácido protocatecuico, até 25 μ M (concentração máxima testada). No entanto, quando as células foram submetidas a um estímulo pró-inflamatório por uma mistura de citocinas (IL-1 α , TNF- α , e IFN- γ) a pré-incubação das células com ácido protocatecuico 25 μ M não as protegem, em termos de viabilidade celular, avaliada pelo ensaio do MTT, do estímulo inflamatório. Resultados idênticos tinham já sido observados com a cianidina-3-glucósido (Serra et al. 2013), pelo que, tanto a cianidina-3-glucósido como o ácido protocatecuico apresentam comportamento semelhante.

Dado que, durante o processo inflamatório ocorre uma produção excessiva de óxido nítrico (NO) que leva à destruição dos tecidos e alteração de respostas celulares (Beckman et al. 1990), fomos verificar se a pré-incubação das células com o ácido protocatecuico ou a cianidina-3-glucósido levaria à diminuição dos níveis de nitrito no meio de cultura das células, que aumentaram bastante com o estímulo das citocinas. De facto, os resultados obtidos confirmaram uma diminuição dos níveis de nitrito nas células pré-incubadas com os compostos em estudo mas, enquanto essa diminuição foi de cerca de 56% nas células pré-incubadas com cianidina-3-glucósido, nas células pré-incubadas com o ácido protocatecuico essa diminuição não foi significativa.

De seguida determinámos os níveis intracelulares de glutatião reduzido e oxidado (GSH/GSSG), uma vez que a razão destas duas concentrações é importante para a caracterização do *stress* oxidativo celular que normalmente se observa num estado de inflamação. Começámos por fazer um estudo cinético do efeito das citocinas nos níveis intracelulares de glutatião reduzido e verificámos uma diminuição significativa dos níveis de GSH após 16h de estímulo inflamatório, sendo contudo essa diminuição mais acentuada ao fim de 24h. A pré-incubação das células com ácido protocatecuico ou cianidina-3-glucósido não induziu qualquer alteração nos níveis de GSH. Uma vez que a mistura de citocinas conduz a uma deplecção do glutatião reduzido, fomos avaliar os níveis intracelulares de glutatião oxidado (GSSG). Na presença de citocinas observou-se igualmente uma diminuição drástica dos níveis de GSSG que não sofreu alteração quando as células foram pré-incubadas com os compostos fenólicos. Em termos da relação GSH/GSSG os compostos em estudo também não exerceram qualquer efeito. Da análise destes resultados podemos concluir que as citocinas levam a uma alteração dos níveis intracelulares de glutatião não por oxidação deste, mas antes, provavelmente, ao nível da sua síntese, isto é, um efeito idêntico ao observado na presença de BSO, um inibidor específico da γ -glutamylcisteinil ligase, uma enzima limitante na síntese de novo do GSH.

Para complementar o efeito antioxidante do ácido protocatecuico e da cianidina-3-glucósido, quantificámos os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigénio por um método fluorométrico, e por observação das células ao microscópio de fluorescência. Tal como anteriormente, começámos por averiguar os níveis de ROS após o estímulo pro-inflamatório, observando-se um aumento significativo das espécies reativas de oxigénio após as 24h de incubação. A pré-incubação das células com o ácido

protocatecuico ou com a cianidina-3-glucósido levou a uma diminuição da fluorescência das células, particularmente evidente nas imagens recolhidas por microscopia de fluorescência corroborando o potencial antioxidante destes compostos.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que, apesar de o ácido protocatecuico ser um metabolito da cianidina-3-glucósido com uma elevada presença no trato gastrointestinal, não parece ser o principal responsável pelo efeito anti-inflamatório e antioxidante observado no intestino aquando do consumo de grandes quantidades de cianidina-3-glucósido.

Referências

Afaq, F., A. Malik, D. Syed, D. Maes, M. S. Matsui and H. Mukhtar (2005). "Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes." *Photochemistry and Photobiology* **81**(1): 38-45.

Al-Sadi, R. M. and T. Y. Ma (2007). "IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability." *J Immunol* **178**(7): 4641-4649.

Alderton, W. K., C. E. Cooper and R. G. Knowles (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." *Biochemical Journal* **357**: 593-615.

Amorini, A. M., G. Lazzarino, F. Galvano, G. Fazzina, B. Tavazzi and G. Galvano (2003). "Cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside protects myocardium and erythrocytes from oxygen radical-mediated damages." *Free Radical Research* **37**(4): 453-460.

Anderson, M. E. (1998). "Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation." *Chemico-Biological Interactions* **112**: 1-14.

Atreya, I., R. Atreya and M. F. Neurath (2008). "NF-kappa B in inflammatory bowel disease." *Journal of Internal Medicine* **263**(6): 591-596.

Atreya, R. and M. F. Neurath (2010). "Chemokines in Inflammatory Bowel Diseases." *Digestive Diseases* **28**(3): 386-394.

Aw, T. Y. (2003). "Cellular redox: A modulator of intestinal epithelial cell proliferation." *News in Physiological Sciences* **18**: 201-204.

Baldwin, A. S. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: New discoveries and insights." *Annual Review of Immunology* **14**: 649-683.

Baumgart, D. C. and W. J. Sandborn (2007). "Gastroenterology 2 - Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies." *Lancet* **369**(9573): 1641-1657.

Beckman, J. S., T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall and B. A. Freeman (1990). "Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite - Implications for Endothelial

Injury from Nitric-Oxide and Superoxide." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(4): 1620-1624.

Beecher, G. R. (2003). "Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake." *Journal of Nutrition* **133**(10): 3248s-3254s.

Boivin, D., M. Blanchette, S. Barrette, A. Moghrabi and R. Beliveau (2007). "Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NF kappa B by edible berry juice." *Anticancer Research* **27**(2): 937-948.

Bors, W., W. Heller, C. Michel and M. Saran (1990). "Flavonoids as Antioxidants - Determination of Radical-Scavenging Efficiencies." *Methods in Enzymology* **186**: 343-355.

Bouma, G. and W. Strober (2003). "The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease." *Nature Reviews Immunology* **3**(7): 521-533.

Bruwer, M., S. Samarin and A. Nusrat (2006). "Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex." *Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Barrier Function, Immunologic Mechanisms, and Microbial Pathways* **1072**: 242-252.

Bueno, J. M., P. Saez-Plaza, F. Ramos-Escudero, A. M. Jimenez, R. Fett and A. G. Asuero (2012). "Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake of Anthocyanins." *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **42**(2): 126-151.

Calvin, H. I., C. Medvedovsky and B. V. Worgul (1986). "Near-Total Glutathione Depletion and Age-Specific Cataracts Induced by Buthionine Sulfoximine in Mice." *Science* **233**(4763): 553-555.

Cha, J. W., M. J. Piao, K. C. Kim, J. Zheng, C. W. Yao, C. L. Hyun, H. K. Kang, E. S. Yoo, Y. S. Koh, N. H. Lee, M. H. Ko and J. W. Hyun (2014). "Protective Effect of 3,4-Dihydroxybenzoic Acid Isolated from *Cladophora wrightiana* Harvey Against Ultraviolet B Radiation-Induced Cell Damage in Human HaCaT Keratinocytes." *Applied Biochemistry and Biotechnology* **172**(5): 2582-2592.

Circu, M. L. and T. Y. Aw (2011). "Redox biology of the intestine." *Free Radical Research* **45**(11-12): 1245-1266.

Circu, M. L. and T. Y. Aw (2012). "Intestinal redox biology and oxidative stress." *Seminars in Cell & Developmental Biology* **23**(7): 729-737.

Clancy, R. M., A. R. Amin and S. B. Abramson (1998). "The role of nitric oxide in inflammation and immunity." *Arthritis and Rheumatism* **41**(7): 1141-1151.

Cooke, D., W. P. Steward, A. J. Gescher and T. Marczylo (2005). "Anthocyanins from fruits and vegetables - Does bright colour signal cancer chemopreventive activity?" *European Journal of Cancer* **41**(13): 1931-1940.

de Freitas, V. and N. Mateus (2006). "Chemical transformations of anthocyanins yielding a variety of colours (Review)." *Environmental Chemistry Letters* **4**(3): 175-183.

Denev, P. N., C. G. Kratchanov, M. Ciz, A. Lojek and M. G. Kratchanova (2012). "Bioavailability and Antioxidant Activity of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Polyphenols: in vitro and in vivo Evidences and Possible Mechanisms of Action: A Review." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **11**(5): 471-489.

Ding, M., R. T. Feng, S. Y. Wang, L. Bowman, Y. J. Lu, Y. Qian, V. Castranova, B. H. Jiang and X. L. Shi (2006). "Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity." *Journal of Biological Chemistry* **281**(25): 17359-17368.

Drew, R. and J. O. Miners (1984). "The Effects of Buthionine Sulfoximine (Bso) on Glutathione Depletion and Xenobiotic Biotransformation." *Biochemical Pharmacology* **33**(19): 2989-2994.

El Mohsen, M. A., J. Marks, G. Kuhnle, K. Moore, E. Debnam, S. K. Srail, C. Rice-Evans and J. P. E. Spencer (2006). "Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats." *British Journal of Nutrition* **95**(1): 51-58.

Finley, J. W., A. N. Kong, K. J. Hintze, E. H. Jeffery, L. L. Ji and X. G. Lei (2011). "Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**(13): 6837-6846.

Forstermann, U. and W. C. Sessa (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." *European Heart Journal* **33**(7): 829-837.

Fraga, C. G., M. Galleano, S. V. Verstraeten and P. I. Oteiza (2010). "Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols." *Molecular Aspects of Medicine* **31**(6): 435-445.

Frontela, C., R. Canali and F. Virgili (2010). "Use of dietary phenols to modulate inflammatory bowel response." *Gastroenterologia Y Hepatologia* **33**(4): 307-312.

Galvano, F., L. La Fauci, G. Lazzarino, V. Fogliano, A. Ritieni, S. Ciappellano, N. C. Battistini, B. Tavazzi and G. Galvano (2004). "Cyanidins: metabolism and biological properties." *Journal of Nutritional Biochemistry* **15**(1): 2-11.

Galvano, F., P. Vitaglione, G. L. Volti, C. Di Giacomo, D. Gazzo, L. Vanella, L. La Fauci and V. Fogliano (2008). "Protocatechuic acid: The missing human cyanidins' metabolite." *Molecular Nutrition & Food Research* **52**(3): 386-387.

Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-kappa B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. **25**: 6680-6684.

Griffith, O. W. (1999). "Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis." *Free Radical Biology and Medicine* **27**(9-10): 922-935.

Halliwell, B. (2011). "Free radicals and antioxidants - quo vadis?" *Trends in Pharmacological Sciences* **32**(3): 125-130.

Halliwell, B. and M. Whiteman (2004). "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?" *British Journal of Pharmacology* **142**(2): 231-255.

He, J., B. A. Magnuson and M. M. Giusti (2005). "Analysis of anthocyanins in rat intestinal contents - Impact of anthocyanin chemical structure on fecal excretion." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(8): 2859-2866.

Hidalgo, M., S. Martin-Santamaria, I. Recio, C. Sanchez-Moreno, B. de Pascual-Teresa, G. Rimbach and S. de Pascual-Teresa (2012). "Potential anti-inflammatory, anti-adhesive, anti/estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of anthocyanins and their gut metabolites." *Genes & nutrition* **7**(2): 295-306.

Hidalgo, M., S. Martin-Santamaria, I. Recio, C. Sanchez-Moreno, B. de Pascual-Teresa, G. Rimbach and S. de Pascual-Teresa (2012). "Potential anti-inflammatory, anti-adhesive, anti/estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of anthocyanins and their gut metabolites." *Genes and Nutrition* **7**(2): 295-306.

Hissin, P. J. and R. Hilf (1976). "Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues." *Analytical Biochemistry* **74**(1): 214-226.

Iantomasi, T., P. Marraccini, F. Favilli, M. T. Vincenzini, P. Ferretti and F. Tonelli (1994). "Glutathione Metabolism in Crohns-Disease." *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* **53**(2): 87-91.

Kakkar, S. and S. Bais (2014). "A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential." *ISRN Pharmacology* **2014** 9 pages.

Keklikoglu, N., M. Koray, H. Kocaelli and S. Akinci (2008). "iNOS expression in oral and gastrointestinal tract mucosa." *Digestive Diseases and Sciences* **53**(6): 1437-1442.

Kolios, G., Z. Brown, R. L. Robson, D. A. F. Robertson and J. Westwick (1995). "Inducible Nitric-Oxide Synthase Activity and Expression in a Human Colonic Epithelial-Cell Line, Ht-29." *British Journal of Pharmacology* **116**(7): 2866-2872.

Kolios, G., P. Manousou, L. Bourikas, G. Notas, N. Tsagarakis, I. Mouzas and E. Kouroumalis (2006). "Ciprofloxacin inhibits cytokine-induced nitric oxide production in human colonic epithelium." *European Journal of Clinical Investigation* **36**(10): 720-729.

Kong, J. M., L. S. Chia, N. K. Goh, T. F. Chia and R. Brouillard (2003). "Analysis and biological activities of anthocyanins." *Phytochemistry* **64**(5): 923-933.

Landete, J. M. (2012). "Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **52**(10): 936-948.

Laranjinha, J. (2010). "Translation of Chemical Properties of Polyphenols into Biological Activity with Impact on Human Health." *Recent Advances in Polyphenol Research* **2**: 269-282.

Li, Q. T. and I. M. Verma (2002). "NF-kappa B regulation in the immune system." *Nature Reviews Immunology* **2**(10): 725-734.

Li, X., X. Wang, X. Li, S. Chen, D. Chen, X. Wang, S. Chen and D. Chen (2011). "Antioxidant activity and mechanism of protocatechuic acid in vitro." *Functional Foods in Health and Disease* **2011** **7**:232-244.

Lin, Y. L. and J. K. Lin (1997). "(-)-epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B." *Molecular Pharmacology* **52**(3): 465-472.

Liu, C. L., J. M. Wang, C. Y. Chu, M. T. Cheng and T. H. Tseng (2002). "In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity." *Food and Chemical Toxicology* **40**(5): 635-641.

Lundberg, J. O. N., E. Weitzberg, J. M. Lundberg and K. Alving (1994). "Intragastric Nitric-Oxide Production in Humans - Measurements in Expelled Air." *Gut* **35**(11): 1543-1546.

Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy and L. Jimenez (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." *American Journal of Clinical Nutrition* **79**(5): 727-747.

Mandalari, G., C. Bisignano, T. Genovese, E. Mazzon, M. S. J. Wickham, I. Paterniti and S. Cuzzocrea (2011). "Natural almond skin reduced oxidative stress and inflammation in an experimental model of inflammatory bowel disease." *International Immunopharmacology* **11**(8): 915-924.

Manderscheid, R. and A. Wild (1986). "Studies on the Mechanism of Inhibition by Phosphinothricin of Glutamine-Synthetase Isolated from *Triticum-Aestivum* L." *Journal of Plant Physiology* **123**(2): 135-142.

Masella, R., R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi and C. Giovannini (2005). "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes." *Journal of Nutritional Biochemistry* **16**(10): 577-586.

McGhie, T. K. and M. C. Walton (2007). "The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding." *Molecular Nutrition & Food Research* **51**(6): 702-713.

Monteleone, G. and F. Caprioli (2010). "T-cell-directed therapies in inflammatory bowel diseases." *Clinical Science* **118**(11-12): 707-715.

Mueller, M., S. Hobiger and A. Jungbauer (2010). "Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices." *Food Chemistry* **122**(4): 987-996.

Murrant, C. L. and M. B. Reid (2001). "Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle." *Microscopy Research and Technique* **55**(4): 236-248.

Nathan, C. (1992). "Nitric-Oxide as a Secretory Product of Mammalian-Cells." *Faseb Journal* **6**(12): 3051-3064.

Neuman, M. G. (2007). "Immune dysfunction in inflammatory bowel disease." *Translational Research* **149**(4): 173-186.

Paixao, J., T. C. P. Dinis and L. M. Almeida (2011). "Dietary anthocyanins protect endothelial cells against peroxynitrite-induced mitochondrial apoptosis pathway and Bax nuclear translocation: an in vitro approach." *Apoptosis* **16**(10): 976-989.

Paixao, J., T. C. P. Dinis and L. M. Almeida (2012). "Malvidin-3-glucoside protects endothelial cells up-regulating endothelial NO synthase and inhibiting peroxynitrite-induced NF- κ B activation." *Chemico-Biological Interactions* **199**(3): 192-200.

Palmer, R. M. J., A. G. Ferrige and S. Moncada (1987). "Nitric-Oxide Release Accounts for the Biological-Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor." *Nature* **327**(6122): 524-526.

Panaro, M. A., O. Brandonisio, M. Sisto, A. Acquafredda, D. Leogrande, L. Fumarola and V. Mitolo (2001). "Nitric oxide production by Leishmania-infected macrophages and modulation by prostaglandin E-2." *Clinical and Experimental Medicine* **1**(3): 137-143.

Quideau, S., D. Deffieux, C. Douat-Casassus and L. Pouysegu (2011). "Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis." *Angewandte Chemie-International Edition* **50**(3): 586-621.

Rahman, I., S. K. Biswas and P. A. Kirkham (2006). "Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols." *Biochemical Pharmacology* **72**(11): 1439-1452.

Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." *Free Radical Biology and Medicine* **26**(9-10): 1231-1237.

Reddy, M. K., R. L. Alexander-Lindo and M. G. Nair (2005). "Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(23): 9268-9273.

Roda, G., A. Sartini, E. Zambon, A. Calafiore, M. Marocchi, A. Caponi, A. Belluzzi and E. Roda (2010). "Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases." *World Journal of Gastroenterology* **16**(34): 4264-4271.

Rodrigo, K. A., Y. Rawal, R. J. Renner, S. J. Schwartz, Q. G. Tian, P. E. Larsen and S. R. Mallery (2006). "Suppression of the tumorigenic phenotype in human oral squamous cell

carcinoma cells by an ethanol extract derived from freeze-dried black raspberries." *Nutrition and Cancer-an International Journal* **54**(1): 58-68.

Rodrigo, R., A. Miranda and L. Vergara (2011). "Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease." *Clinica Chimica Acta* **412**(5-6): 410-424.

Romier, B., Y. J. Schneider, Y. Larondelle and A. During (2009). "Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response." *Nutrition Reviews* **67**(7): 363-378.

Scalbert, A., C. Morand, C. Manach and C. Remesy (2002). "Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health." *Biomedicine & Pharmacotherapy* **56**(6): 276-282.

Scaldaferri, F. and C. Fiocchi (2007). "Inflammatory bowel disease: Progress and current concepts of etiopathogenesis." *Journal of Digestive Diseases* **8**(4): 171-178.

Schreiber, S., S. Nikolaus and J. Hampe (1998). "Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease." *Gut* **42**(4): 477-484.

Seeram, N., R. Momin, M. Nair and L. Bourquin (2001). "Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries." *Phytomedicine* **8**(5): 362-369.

Serra, D., J. Paixao, C. Nunes, T. C. P. Dinis and L. M. Almeida (2013). "Cyanidin-3-Glucoside Suppresses Cytokine-Induced Inflammatory Response in Human Intestinal Cells: Comparison with 5-Aminosalicylic Acid." *Plos One* **8**(9).

Sharma, J., A. Al-Omran and S. Parvathy (2007). "Role of nitric oxide in inflammatory diseases." *Inflammopharmacology* **15**(6): 252-259.

Shimizu, M. (2010). "Interaction between Food Substances and the Intestinal Epithelium." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **74**(2): 232-241.

Sido, B., V. Hack, A. Hochlehnert, H. Lipps, C. Herfarth and W. Droge (1998). "Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease." *Gut* **42**(4): 485-492.

Singh, A., S. Holvoet and A. Mercenier (2011). "Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases." *Clinical and Experimental Allergy* **41**(10): 1346-1359.

Stevenson, D. E. and R. D. Hurst (2007). "Polyphenolic phytochemicals - just antioxidants or much more?" *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**(22): 2900-2916.

Talavera, S., C. Felgines, O. Texier, C. Besson, A. Gil-Izquierdo, J. L. Lamaison and C. Remesy (2005). "Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(10): 3902-3908.

Tian, Q. G., M. M. Giusti, G. D. Stoner and S. J. Schwartz (2006). "Urinary excretion of black raspberry (*Rubus occidentalis*) anthocyanins and their metabolites." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(4): 1467-1472.

Tsuda, T., F. Horio and T. Osawa (1999). "Absorption and metabolism of cyanidin 3-O- β -D-glucoside in rats." *FEBS letters* **449**(2): 179-182.

Tsuda, T., K. Ohshima, S. Kawakishi and T. Osawa (1996). "Oxidation products of cyanidin 3-O- β -D-glucoside with a free radical initiator." *Lipids* **31**(12): 1259-1263.

Vitaglione, P., G. Donnarumma, A. Napolitano, F. Galvano, A. Gallo, L. Scalfi and V. Fogliano (2007). "Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides." *Journal of Nutrition* **137**(9): 2043-2048.

Wallace, J. L. and L. Ma (2001). "Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury." *Experimental Biology and Medicine* **226**(11): 1003-1015.

Wang, H., G. H. Cao and R. L. Prior (1997). "Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**(2): 304-309.

Willcox, J. K., S. L. Ash and G. L. Catignani (2004). "Antioxidants and prevention of chronic disease." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **44**(4): 275-295.

Wright, K., S. G. Ward, G. Kolios and J. Westwick (1997). "Activation of phosphatidylinositol 8-kinase by interleukin-13 - An inhibitory signal for inducible nitric-oxide synthase expression in epithelial, cell line HT-29." *Journal of Biological Chemistry* **272**(19): 12626-12633.

Wu, X. L., H. E. Pittman and R. L. Prior (2006). "Fate of anthocyanins and antioxidant capacity in contents of the gastrointestinal tract of weanling pigs following black raspberry consumption." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(2): 583-589.

Xavier, R. J. and D. K. Podolsky (2007). "Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Nature* **448**(7152): 427-434.

Zhu, W., Q. J. Jia, Y. Wang, Y. H. Zhang and M. Xia (2012). "The anthocyanin cyanidin-3-O-beta-glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: Involvement of a cAMP-PKA-dependent signaling pathway." *Free Radical Biology and Medicine* **52**(2): 314-327.