

Bruna Sofia Marquês Relvas

A atividade anti-inflamatória dos Polifenóis no contexto das Doenças Inflamatórias Intestinais: mecanismos moleculares

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências
Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Carla Nunes e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de
Coimbra

Setembro de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Capa representativa do Sistema Gastrointestinal Humano [accedida a 12 de setembro de 2016].

Disponível através de <http://www.nutraingredients.com/Research/First-time-study-tracks-nutritional-distribution-of-fat-in-human-GI-tract>

Eu, Bruna Sofia Marquês Relvas, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011147173, declaro assumir toda a responsabilidade pela Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 16 de setembro de 2016

(Bruna Sofia Marquês Relvas)

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

A Tutora da Monografia

(Professora Doutora Carla Nunes)

A Orientanda

(Bruna Sofia Marquês Relvas)

O meu Grande Obrigada,

À Professora Carla Nunes, pelo o apoio, compreensão, persistência e oportunidade em poder alcançar esta meta;

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pela formação que proporciona aos seus estudantes;

À Phartuna – Tuna de Farmácia de Coimbra, de onde levo os melhores momentos, as melhores amizades e as melhores vivências desta Cidade dos Estudantes, e de tantas outras do país;

Ao Núcleo de Estudantes de Farmácia da Associação Académica de Coimbra, onde teve início o meu percurso no Associativismo, pela bagagem que me proporcionou;

À Associação Portuguesa de Estudantes de Farmácia, onde tenho o privilégio de trabalhar com os melhores em prol dos Estudantes de Farmácia;

À minha Mãe e ao meu Pai por tudo o que consegui até agora e por serem mais que um pilar essencial na minha Vida;

À minha Irmã pelo companheirismo, pelas brincadeiras, pela amizade e por tudo o resto que é impossível de explicar por palavras;

Aos meus avós pela sabedoria, ajuda e por serem duas pessoas mais que maravilhosas;

Ao Pedro, o meu porto de abrigo, sempre presente em todos os momentos;

À Sara Nóbrega, por me teres escolhido naquele dia e nunca nos termos separado;

À Rita Teixeira, o meu braço direito e ao Sérgio Vaz, pelo o apoio incondicional;

À Catarina Pires, por tantas aventuras que tivemos juntas;

À Sofia Martins, pela surpresa que te tornaste ao longo destes anos;

Ao Paulo Mendes e Sofia Carvalhinho, pelas confidências deste último ano;

À Ni, pela amizade, compreensão e presença constante, nos melhores e piores momentos;

À Ana Silva, por todo o apoio e minuciosidade;

À Tatiana Franco e Sara Rodrigues pela amizade ao longo destes anos;

A todos os que contribuíram para que alcançasse esta meta, porque sem a ajuda e apoio de muitos de vocês teria sido impossível.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	6
2. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS	7
2.1. Introdução	7
2.2. Epidemiologia	8
2.3. Etiopatogenia	10
2.3.1. O papel das Espécies Reativas de Oxigénio e Espécies Reativas de Nitrogénio nas Doenças Inflamatórias Intestinais	11
2.3.2. O papel das Citocinas nas Doenças Inflamatórias Intestinais	11
2.3.3. A Barreira Intestinal e a sua disfunção nas Doenças Inflamatórias Intestinais	13
2.3.4. Cascatas de Sinalização Celular relevantes na Inflamação Intestinal	14
2.3.4.1. Via de Sinalização Celular do fator nuclear κ B (NF- κ B)	14
2.3.4.2. Via de Sinalização Celular das JAK/STAT	16
2.4. Tratamento Farmacológico	17
3. POLIFENÓIS	18
3.1. MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO INTESTINAL PELOS POLIFENÓIS	19
3.1.1. Mecanismos Moleculares Envolvidos	20
3.1.1.1. Modulação da Via de Sinalização Celular do NF- κ B	20

3.1.1.2. Modulação da Via de Sinalização Celular das JAK/STAT	21
3.1.1.3. Modulação da Via de Sinalização Celular do Nrf2	22
3.1.1.4. Modulação das <i>Tight Junctions</i>	25
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
5. BIBLIOGRAFIA.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

- ARE - Elemento de resposta antioxidante, do inglês *antioxidante responsive element*
- DII - Doenças Inflamatórias Intestinais
- EGCG - Epigallocatequina galato, do inglês *epigallocatechin gallate*
- EpRE - Elemento de resposta eletrofílica, do inglês *electrophile response element*
- IFN- γ - Interferão γ
- IL - Interleucina
- iNOS - Forma indutível da sintase do óxido nítrico, do inglês *inducible nitric oxide synthase*
- JAK - Do inglês *Janus Kinase*
- Keap1 - Do inglês *Kelch-like ECH-associated protein 1*
- LC8 - Do inglês, *8-kDa dynein light chain protein*
- NF- κ B - Fator Nuclear κ B, do inglês *Nuclear Factor- κ B*
- NO - Óxido nítrico
- Nrf2 - Do inglês *Nuclear factor-erythroid 2-related factor-2*
- O₂⁻ - Radical anião superóxido
- RNS - Espécies Reativas de Nitrogénio, do inglês *Reactive Nitrogen Species*
- ROS - Espécies Reativas de Oxigénio, do inglês *Reactive Oxygen Species*
- STAT - Do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription*
- TJ - Do inglês *Tight Junctions*
- TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α , do inglês *Tumor Necrosis Factor- α*

RESUMO

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são um grupo de doenças inflamatórias crónicas e recidivantes que envolvem o trato gastrointestinal e cuja etiologia não se encontra ainda completamente esclarecida.

Atualmente, além de não existir, ainda, um tratamento que conduza à cura destas doenças, os fármacos mais frequentemente utilizados apresentam uma baixa eficácia e encontram-se associados a efeitos secundários graves num elevado número de doentes, o que torna urgente o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que combinem eficácia e segurança.

Os polifenóis da dieta, devido à sua capacidade de modular vias de sinalização celular cruciais envolvidas em processos fisiológicos e patológicos, nomeadamente, em processos inflamatórios, têm sido considerados promissores na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias crónicas. Efetivamente, nos últimos anos, estes compostos têm sido alvos de estudos intensos pelo seu potencial benefício nas DII, dada a sua capacidade de modular vias de sinalização celular como as do NF- κ B, das JAK/STAT e do Nrf2, e de proteger a integridade da barreira intestinal. Este trabalho sumariza os principais mecanismos moleculares subjacentes à atividade anti-inflamatória dos polifenóis e o seu potencial impacto benéfico na prevenção e tratamento das DII.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) are a group of chronic and relapsing inflammatory diseases of the gastrointestinal tract, whose etiology has not yet been fully elucidated.

Currently, IBD does not have cure and, the most frequently used medicines exhibit low efficacy and are associated with severe side effects in a large number of patients. Consequently, it is urgent to develop new therapeutic strategies that combine efficacy and safety dietary polyphenols, due to its ability to modulate critical cell signaling pathways involved in physiological and pathological processes, in particular, in inflammatory processes, have been considered promising for the prevention and treatment of chronic inflammatory diseases.

Indeed, in recent years, these compounds have been subject of intense study, for their potential benefit in IBD, because of their ability to modulate pathways such as NF- κ B, the JAK/STAT and Nrf2, and to protect the integrity of the intestinal barrier.

This work summarizes the main molecular mechanisms underlying the anti-inflammatory activity of the polyphenols and their potential beneficial impact on the prevention and treatment of IBD.

I. INTRODUÇÃO

As DII são doenças inflamatórias crónicas, extremamente incapacitantes na medida em que comprometem profundamente a qualidade de vida dos doentes (Veza et al., 2016). Nos últimos anos tem-se observado um aumento da incidência e prevalência destas doenças, principalmente nos países industrializados, sendo atualmente, consideradas um grave problema de saúde pública nestes países (Ye et al., 2015).

A falta de efetividade e os efeitos adversos dos medicamentos atualmente utilizados, tornam urgente identificar e desenvolver novas estratégias terapêuticas, tanto eficazes como seguras, para prevenir e/ou curar as DII (Hur et al., 2012; Veza et al., 2016).

Recentemente, surgiram fortes evidências de que os polifenóis da dieta poderão vir a constituir uma possível alternativa terapêutica nestas doenças (Debnath, Kim e Lim, 2013; Hur et al., 2012; Martin e Bolling, 2015).

Ao longo do presente documento, serão abordados os principais mecanismos moleculares subjacentes às DII e a sua modulação pelos polifenóis. Será dada uma particular relevância às vias do NF- κ B, das JAK/STAT e do Nrf-2. Será ainda discutido o papel promotor e protetor que os polifenóis podem exercer sobre a barreira intestinal epitelial, nomeadamente ao nível das *Tight Junctions* (TJ).

2. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

2.1. Introdução

A inflamação é uma resposta imunitária não específica, constituindo a primeira linha de defesa do organismo perante lesões e infeções (Debnath, Kim e Lim, 2013; Romier *et al.*, 2008; Weiss, 2008). Embora em situações normais, a inflamação seja uma resposta fisiológica auto-limitada, em certas circunstâncias pode tornar-se persistente e exagerada, levando ao desenvolvimento de doenças inflamatórias crónicas, como as DII (Weiss, 2008).

As DII representam um grupo de doenças inflamatórias crónicas e recidivantes que afetam o trato gastrointestinal (Hanauer, 2006; Liverani *et al.*, 2016), sendo a Doença de Crohn e a Colite Ulcerosa os dois tipos mais importantes, os quais diferem essencialmente na localização anatómica e no grau de envolvimento da parede do intestino (Fig. 1) (Hanauer, 2006; Vezza *et al.*, 2016).

A Doença de Crohn, embora afete principalmente o íleo terminal e o cólon, pode afetar qualquer região do trato gastrointestinal, desde a boca até ao ânus (Martin e Bolling, 2015). Esta apresenta uma disposição segmentar, isto é, existem áreas não afetadas entre as áreas afetadas pela doença e, além de mais, atinge toda a parede do órgão, tratando-se de um processo transmural (Vezza *et al.*, 2016).

A Colite Ulcerosa atinge exclusivamente o intestino grosso e o reto, estendendo-se de forma contínua ao longo do cólon e limita-se à mucosa intestinal (camada interna) (Martin e Bolling, 2015).

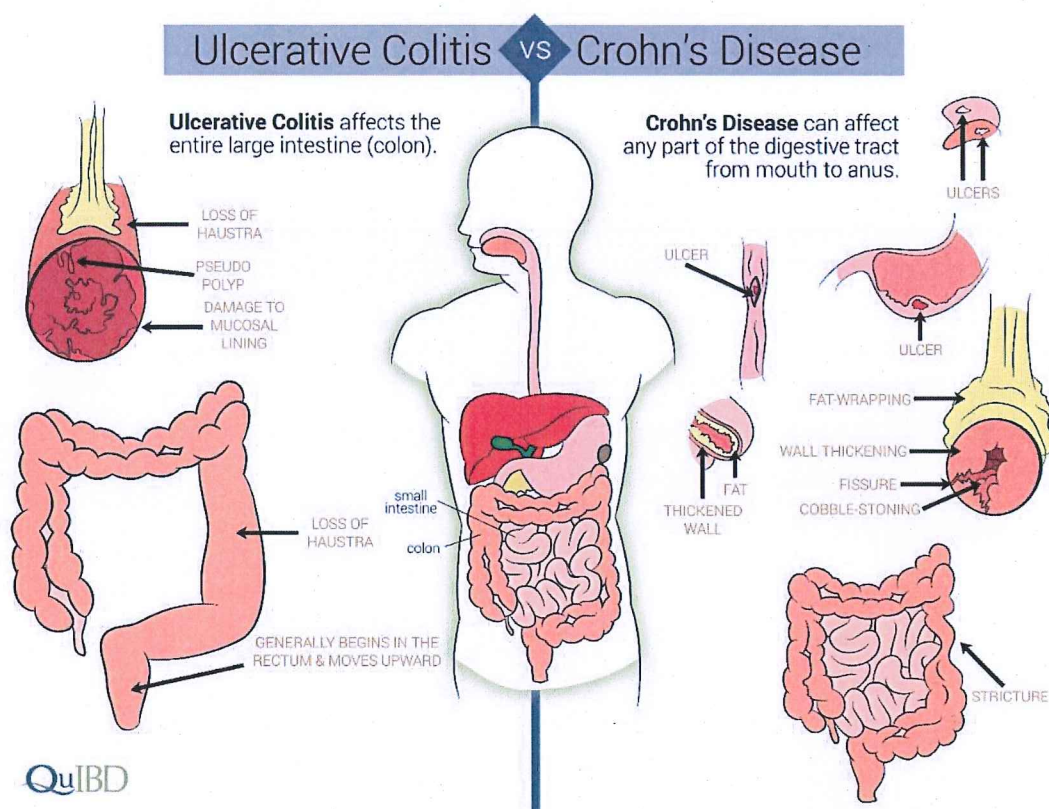


Figura 1: Diferenças entre a Doença de Crohn e a Colite Ulcerosa (Retirado de <http://www.quibd.com/ibd-resources/differences-between-crohns-disease-and-ulcerative-colitis/>)

2.2. Epidemiologia

A prevalência e incidência das DII tem vindo a aumentar nos últimos anos, variando, no entanto, em função da região geográfica do mundo (Fig. 2) (Ponder e Long, 2013; Ye et al., 2015).

Atualmente estima-se que a incidência anual das DII na Europa seja de 24,3 por 100.000 pessoas-ano para a Colite Ulcerosa e de 12,7 por 100.000 pessoas-ano para Doença de Crohn. Já a América do Norte apresenta valores mais elevados que na Europa: 19,2 por 100.000 pessoas-ano para Colite Ulcerosa e 20,2 por 100.000 pessoas-ano para Doença de Crohn. Na Ásia e Oriente Leste a incidência estimada é muito inferior, sendo cerca de

6,3 por 100.000 pessoas-ano para Colite Ulcerosa e 5,0 por 100.000 pessoas-ano para Doença de Crohn (Ye *et al.*, 2015).

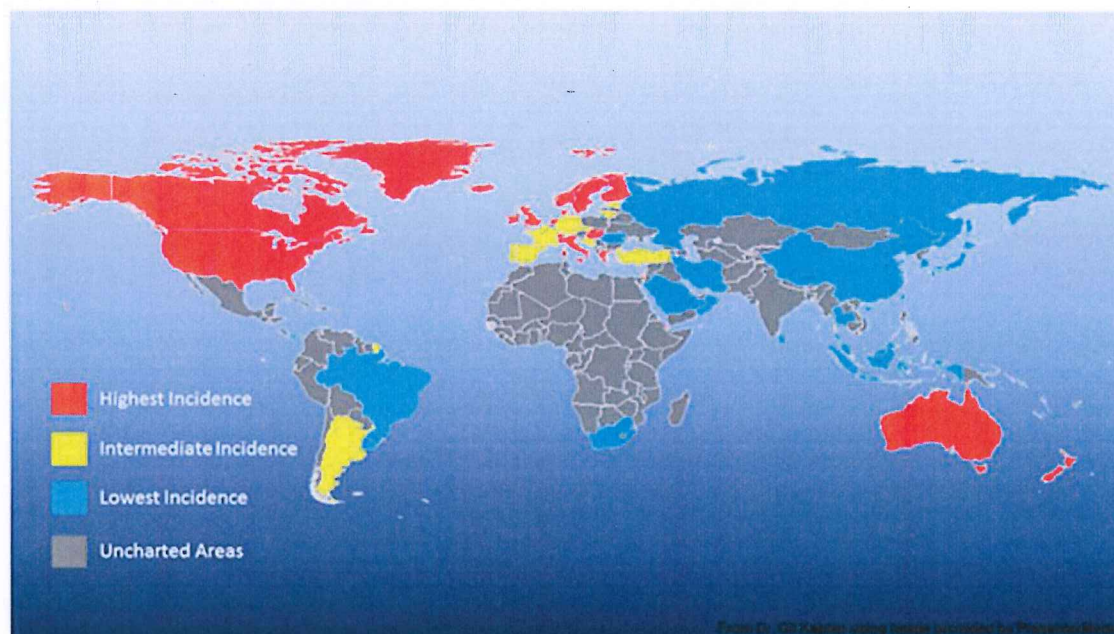


Figura 2: Incidência global da DII (Retirado de Kaplan, 2015)

Estes dados demonstram que a incidência das DII é superior nos países desenvolvidos, sugerindo que o estilo de vida, fatores ambientais e o desenvolvimento económico e urbano poderão estar relacionados com o aumento da incidência destas doenças, apesar dos aspetos específicos desta correlação não serem ainda muito claros (Helmbly, 2015; Ponder e Long, 2013).

Neste contexto, é de referir a Hipótese Higiénica, a qual postula que a reduzida exposição do organismo a microrganismos e parasitas em países industrializados, em consequência da melhoria das condições sanitárias, poderá aumentar a reatividade imunológica, facto que parece estar relacionado com a elevada incidência não só das DII mas também de outras doenças autoimunes e alérgicas nestes países (Giacomin *et al.*, 2015; Versini *et al.*, 2015).

Efetivamente, nos últimos anos, tem-se assistido a uma redução drástica das infeções provocadas por parasitas como os helmintas (Helmbly, 2015). Os helmintas conseguem modular o sistema imunitário do hospedeiro de modo a evitar uma resposta imunitária exacerbada que levaria à sua eliminação, mas, ao mesmo tempo, sem causar uma profunda

imunossupressão, a qual levaria à morte do hospedeiro (Girgis, Gundra e Loke, 2013). Estes parasitas suprimem, por exemplo, a produção de citocinas pró-inflamatórias que desempenham um importante papel nas DII, como, por exemplo, o interferão- γ (IFN- γ), e estimulam a produção de interleucina-10 (IL-10), uma citocina com propriedades anti-inflamatórias (Ben-Ami Shor *et al.*, 2013; Versini *et al.*, 2015).

Atualmente já existem alguns estudos em animais e humanos que sugerem uma terapia baseada na utilização de helmintas como uma potencial e importante estratégia terapêutica nas DII (Giacomin *et al.*, 2015; Ponder e Long, 2013).

No entanto, mesmo considerando todos estes aspetos positivos não podemos esquecer que os mecanismos pelos quais os helmintas conseguem modular a resposta inflamatória, e assim melhorar os sintomas das DII, ou mesmo induzir a sua remissão, não se encontram ainda completamente esclarecidos, sendo necessária a realização de mais estudos (Giacomin *et al.*, 2015).

2.3. Etiopatogenia

Apesar da intensa investigação realizada nos últimos anos, a etiologia das DII não se encontra totalmente esclarecida. No entanto, diversos estudos sugerem que uma complexa combinação de fatores ambientais, genéticos, microbiológicos e imunológicos seja responsável por uma produção desregulada de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de nitrogénio (RNS), o que resulta num estado inflamatório persistente, na morte das células intestinais epiteliais e numa quebra da barreira intestinal epitelial, subjacente às DII (Debnath, Kim e Lim, 2013; Hanauer, 2006; Vezza *et al.*, 2016; Zhang e Li, 2014). De facto, atualmente é amplamente aceite que as DII se encontram intimamente relacionadas com uma suscetibilidade genética que o doente apresenta em desenvolver uma resposta imune anormal e exacerbada face a um estímulo dito “normal” (Zhang e Li, 2014).

2.3.1. O papel das Espécies Reativas de Oxigénio e das Espécies Reativas de Nitrogénio nas Doenças Inflamatórias Intestinais

O papel fundamental das ROS e RNS na patogénese das DII tem sido demonstrado através de diversos estudos realizados ao longo dos anos (Piechota-Polanczyk e Fichna, 2014; Vezza et al., 2016).

No tecido intestinal de doentes com DII ocorre uma elevada produção de espécies reativas, nomeadamente de ROS como o radical anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e de RNS, como o óxido nítrico ($\cdot NO$), sendo os macrófagos e as células intestinais epiteliais, os principais responsáveis por esta produção aumentada (Cross e Wilson, 2003; Karp e Koch, 2006; Pavlick, Laroux et al., 2002). Além do supracitado, o sistema de defesa antioxidante celular, responsável pela manutenção destas espécies reativas numa baixa concentração, parece ser menos eficaz nas células intestinais de doentes com DII (Karp e Koch, 2006). As ROS e RNS em elevada concentração são responsáveis por uma desregulação de vias de sinalização redox e de expressão de genes e/ou modificações de importantes biomoléculas tais como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, alterando as suas propriedades e funções biológicas, resultando, assim, em stress nitroxidativo, o qual desempenha um importante papel no processo inflamatório e no dano tecidular associados a estas doenças (Pavlick, Laroux et al., 2002)

2.3.2. O papel das Citocinas nas Doenças Inflamatórias Intestinais

Citocinas são polipéptideos ou pequenas proteínas produzidas por uma grande variedade de células, como macrófagos, linfócitos, células intestinais epiteliais, entre outras, e que são capazes de mediar e regular respostas imunes (Yu et al., 2012). Estas podem ser classificadas em anti-inflamatórias e pró-inflamatórias. Quando falamos em citocinas pró-inflamatórias há que salientar algumas, nomeadamente, o fator de necrose tumoral ($TNF-\alpha$), o $IFN-\gamma$ e as interleucinas 1, 6 e 8 (IL-1, IL-6, IL-8). Já nas citocinas anti-inflamatórias temos como exemplo a IL-4, IL-10 e IL-11 (Hur et al., 2012).

Nas DII, à semelhança de outras doenças inflamatórias crónicas, ocorre um desequilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, a favor das primeiras (Muzes et al., 2012), o

que resulta num excessivo recrutamento de células efetoras para a mucosa intestinal, produção de mais mediadores inflamatórios e dano tecidual.

O TNF- α , o IFN- γ e a IL-1 são consideradas as três citocinas com maior envolvimento na patogénese das DII, encontrando-se numa elevada concentração na mucosa intestinal de doentes com DII (Beck e Wallace, 1997; Soufli *et al.*, 2016).

O TNF- α influencia diretamente o tecido epitelial intestinal, nomeadamente ao promover a apoptose das respetivas células (Debnath, Kim e Lim, 2013). Esta citocina também induz a secreção de outras citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IFN- γ etc), citocinas quimiotáticas (IL-8, etc) e moléculas de adesão, nomeadamente, através da ativação da via de sinalização celular do fator nuclear- κ B (NF- κ B) (Atreya, Atreya e Neurath, 2008).

O IFN- γ é produzido predominantemente por linfócitos TH₁ (Yu *et al.*, 2012). Esta citocina promove o recrutamento e a adesão de leucócitos e estimula, também, a produção de outros mediadores inflamatórios e mediadores de morte celular, nomeadamente através da ativação da via de sinalização celular das JAK (do inglês *Janus Kinase*) / STAT, (do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription*) (Coskun *et al.*, 2013).

A IL-1 é uma citocina produzida por vários tipos de células, desde macrófagos a células endoteliais, e libertada na fase inicial da resposta inflamatória, estando envolvida, nomeadamente, na produção de outros mediadores inflamatórios, tais como IL-8, prostaglandinas e •NO (Beck e Wallace, 1997).

No contexto das DII, importa ainda referir ainda a IL-8, uma citocina quimiotática ou quimiocina, responsável por atrair neutrófilos, monócitos e linfócitos aos locais de inflamação. Muitas células apresentam a capacidade para produzir IL-8 sendo as células epiteliais intestinais um tipo de células capaz de o fazer (Beck e Wallace, 1997)

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória apresentando um efeito inibitório sobre as células T e capacidade de suprimir a produção de TNF- α e IL-1 (Beck e Wallace, 1997).

2.3.3. A barreira intestinal epitelial e sua disfunção nas Doenças Inflamatórias Intestinais

O epitélio intestinal é composto por uma única camada de células epiteliais que reveste o intestino e que atua como um filtro seletivo, impedindo a passagem de substâncias prejudiciais e permitindo a translocação de nutrientes essenciais, eletrólitos e água do lúmen intestinal para a circulação (Groschwitz e Hogan, 2009).

Para esta permeabilidade seletiva da barreira contribuem as *Tight Junctions* (TJs), complexos proteicos localizados na extremidade apical da membrana celular lateral, constituídos por proteínas transmembranares como a ocludina, tricelulina, claudinas e moléculas de adesão juncional, cujos domínios intracelulares interagem com umas proteínas citosólicas designadas por ZO (do inglês, *zonula occludens*), as quais, por sua vez, estabelecem a ancoragem destas proteínas transmembranares à actina do citoesqueleto (Fig. 3) (Lee, 2015). Os domínios extracelulares das proteínas transmembranares formam uma barreira seletiva através do estabelecimento de interações com os domínios extracelulares das proteínas transmembranares das células adjacentes (Fig. 3).

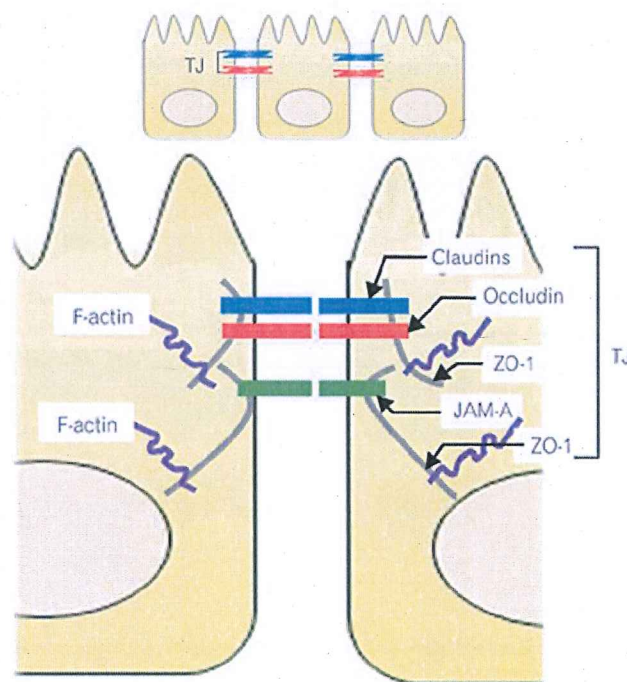


Figura 3: Estrutura molecular das *Tight Junctions* nas células epiteliais intestinais (Retirado de Lee, 2015)

As TJ regulam assim o movimento paracelular de iões, solutos e água através do epitélio intestinal e previnem a passagem de antigénios, microrganismos e toxinas (Groschwitz e Hogan, 2009; Suzuki e Hara, 2011).

A disfunção da barreira epitelial intestinal, nomeadamente ao nível das TJs, despoleta uma excessiva e inapropriada resposta imune e inflamatória, estando associada ao desenvolvimento de várias doenças inflamatórias crónicas, como as DII (Groschwitz e Hogan, 2009; Suzuki e Hara, 2011).

Neste contexto, existem fortes evidências de que as citocinas pró-inflamatórias, as ROS e determinadas bactérias podem alterar a expressão de proteínas das TJ e a sua associação com a actina do citoesqueleto, levando à perda da função barreira do epitélio intestinal (Lee, 2015; Soufli *et al.*, 2016).

2.3.4. Cascatas de sinalização celular relevantes na inflamação intestinal

2.3.4.1. Via de Sinalização Celular do fator nuclear κ B (NF- κ B)

O fator nuclear κ B (NF- κ B) é um fator de transcrição envolvido na regulação de diversos processos fisiológicos, tais como inflamação, respostas imunológicas, morte e sobrevivência celular (Dolcet *et al.*, 2005; Hayden e Ghosh, 2008). A sua ativação exagerada e descontrolada tem sido implicada na patogénese de diversas doenças inflamatórias, nomeadamente das DII (Atreya, Atreya e Neurath, 2008; Debnath, Kim e Lim, 2013; Romier *et al.*, 2008).

Efetivamente, diversos estudos têm demonstrado uma elevada expressão e ativação do NF- κ B nas células intestinais epiteliais e nos macrófagos isolados da mucosa inflamada em doentes com DII (Atreya, Atreya e Neurath, 2008).

Em condições normais, o NF- κ B encontra-se no citoplasma sequestrado por uma proteína inibitória, o I κ B. Em resposta a uma variedade de estímulos, tais como ROS, citocinas, lipopolissacarídeos (LPS), entre outros, ocorre a fosforilação e ativação do complexo enzimático cinase do I κ B (IKK), o qual, por sua vez é responsável pela fosforilação do I κ B. O I κ B, uma vez fosforilado, sofre degradação pelo proteossoma, libertando o NF- κ B e

possibilitando, assim, a sua translocação para o núcleo, onde se vai ligar a sequências específicas do DNA e promover a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória, tais como genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-8) e enzimas pró-inflamatórias (ciclooxigenase-2 (COX-2); forma indutível da sintase do óxido nítrico, (iNOS) (Fig.4) (Romier *et al.*, 2008).

Recentemente, surgiram evidências de que a fosforilação do I κ B é regulada por uma proteína, a LC8 (do inglês, *8-kDa dynein light chain protein*), de uma forma redox dependente (Jung *et al.*, 2008). Em condições basais, esta proteína encontra-se ligada ao I κ B, inibindo a sua fosforilação pelo IKK, mas a oxidação de grupos tiólicos da LC8 resulta numa alteração da sua conformação, e consequentemente dissociação do I κ B, o que permite a fosforilação do I κ B pelo IKK (Jung *et al.*, 2008).

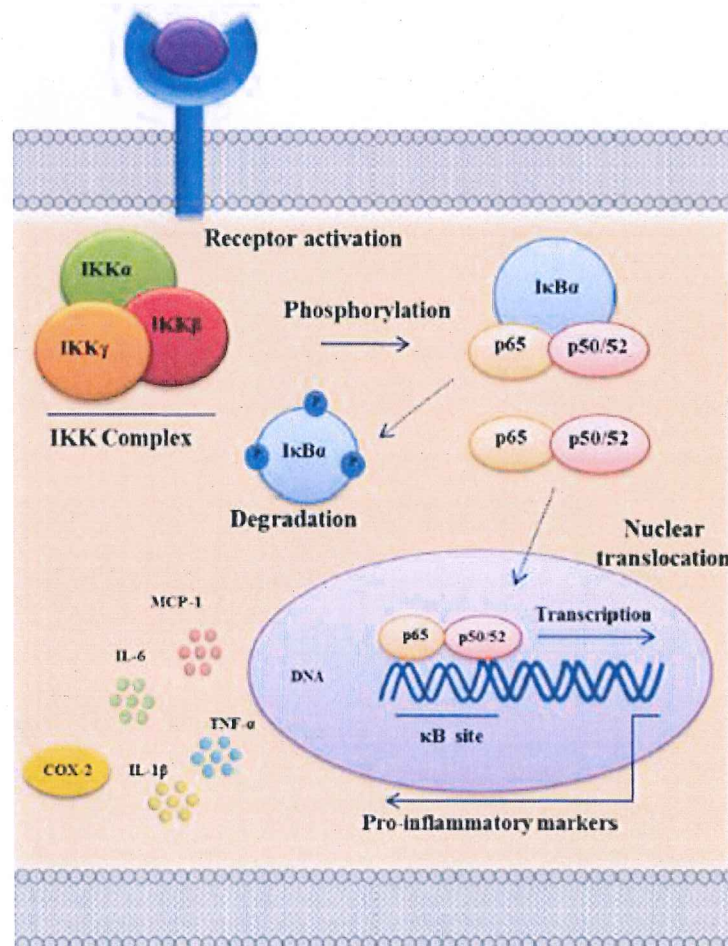


Figura 4: Via de Sinalização do NF- κ B (Adaptado de Veza *et al.*, 2016)

2.3.4.2. Via de Sinalização Celular das JAK/STAT

As citocinas são moduladores cruciais do processo inflamatório inerente à DII desencadeando efeitos celulares, nomeadamente através da ativação da via de sinalização celular das JAK/STAT (Coskun *et al.*, 2013; Rawlings, Rosler e Harrison, 2004; Zundler e Neurath, 2016).

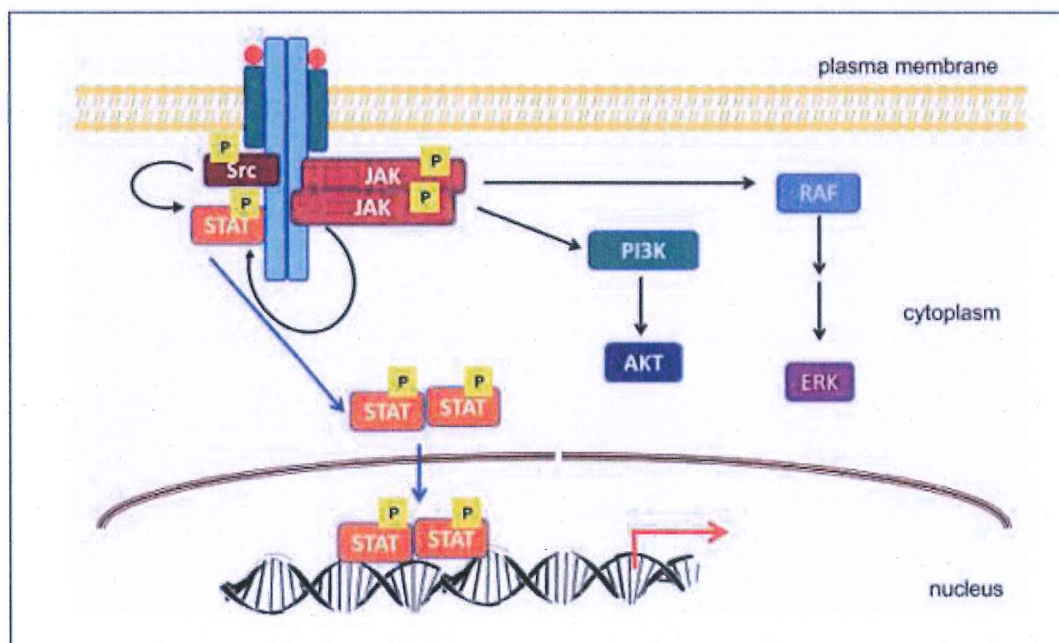


Figura 5: Vias de sinalização mediadas pelas JAKs (Retirado de Jatiani *et al.*, 2010)

A ligação de citocinas, nomeadamente do IFN- γ , ao seu recetor transmembranar induz a dimerização do mesmo e consequentemente inicia-se uma cascata de eventos intracelulares onde se inclui a autofosforilação das JAK. As JAK, uma vez fosforiladas, tornam-se ativas e fosforilam resíduos específicos de tirosina localizados no domínio citoplasmático do recetor, criando locais de ligação para as STAT (Fig. 5). Desta forma, as STAT são recrutadas para o recetor, sendo fosforiladas no resíduo de tirosina 701 pelas JAK, tornando-se ativas. As STAT, uma vez fosforiladas, dissociam-se do recetor, dimerizam e translocam para o núcleo, regulando a transcrição de genes alvo (Fig. 5). Os genes alvo referidos codificam mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e enzimas pró-inflamatórias, (Jatiani *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2016), e mediadores da morte celular (Kim e Lee, 2007)

A ativação inapropriada e exagerada da via de sinalização das JAK/STAT tem sido implicada na patogénese de diversas doenças inflamatórias, incluindo as DII (Coskun *et al.*, 2013; Zundler e Neurath, 2016).

2.4. Tratamento Farmacológico

Atualmente, os tratamentos farmacológicos usados, na maioria deles fármacos anti-inflamatórios e imunossuppressores, não conduzem à cura das DII mas têm por objetivo terapêutico induzir e manter os períodos de remissão da doença, evitar recidivas e tratar possíveis complicações intestinais e extra-intestinais, melhorando desta forma a qualidade de vida dos doentes, (Hur *et al.*, 2012; Martin e Bolling, 2015; Pithadia e Jain, 2011; Triantafyllidis, Merikas e Georgopoulos, 2011). A somar a esta evidência, as atuais terapêuticas farmacológicas são ainda acompanhadas de efeitos secundários graves o que impede o seu uso num número elevado de doentes (Veza *et al.*, 2016).

Assim, torna-se crucial identificar e desenvolver novas estratégias terapêuticas eficazes e seguras capazes de prevenir ou até mesmo tratar as DII (Hur *et al.*, 2012; Martin e Bolling, 2015). Neste contexto, os polifenóis da dieta, devido à sua capacidade de modular importantes vias de sinalização celular associadas a processos fisiopatológicos como a inflamação, têm sido considerados moléculas promissoras na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias crónicas como as DII, podendo vir a constituir importantes estratégias terapêuticas nestas doenças.

3. POLIFENÓIS

Os polifenóis são metabolitos secundários das plantas que constituem um grupo muito numeroso de compostos que se encontram amplamente distribuídos no reino vegetal, estando presentes nas cascas de frutos, flores, folhas, sementes, entre outros. Desta forma, podem ser encontrados em quantidades significativas em dietas saudáveis que envolvam, nomeadamente, o consumo de frutos, vegetais, chá, cacau, azeite e vinho tinto (Manach, 2004; Pandey e Rizvi, 2009; Santangelo *et al.*, 2007; Scalbert, Johnson e Saltmarsh, 2005; Shapiro *et al.*, 2007).

Quimicamente, os polifenóis apresentam um ou mais anéis aromáticos, aos quais se encontram ligados grupos hidroxilo, e dependendo do número de anéis fenólicos presentes na sua estrutura, bem como dos elementos estruturais que os ligam, os polifenóis podem ser classificados em diferentes grupos. As principais classes de polifenóis são os flavonóides, ácidos fenólicos, estilbenos e linhanos (Fig. 6) (Cardona *et al.*, 2013; Pandey e Rizvi, 2009).

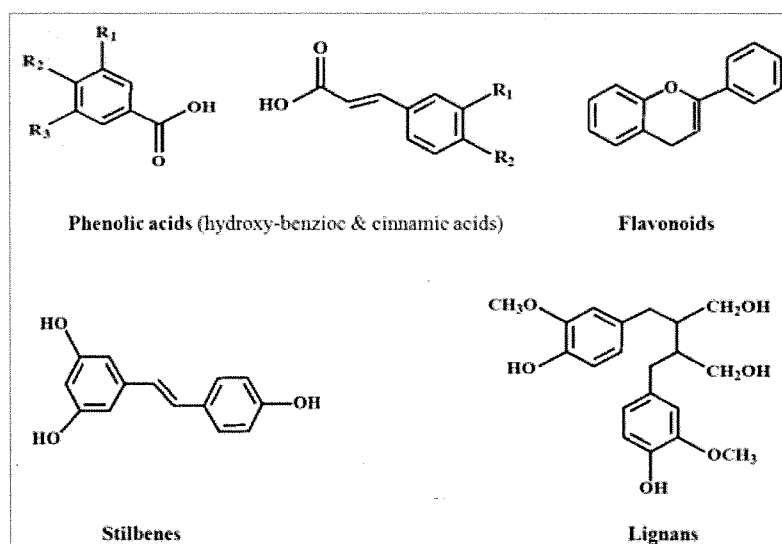


Figura 6: Estruturas químicas das diferentes classes de polifenóis (Retirado de Pandey e Rizvi, 2009)

Os flavonóides constituem o grupo mais numeroso dos polifenóis, apresentando uma estrutura química comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) ligados entre si através de uma cadeia de três carbonos organizada sob a forma de um anel heterocíclico oxigenado (anel C). Os flavonoides podem ainda ser divididos em várias subclasses tais como

flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianinas e flavanóis (Fig. 7) (Pandey e Rizvi, 2009).

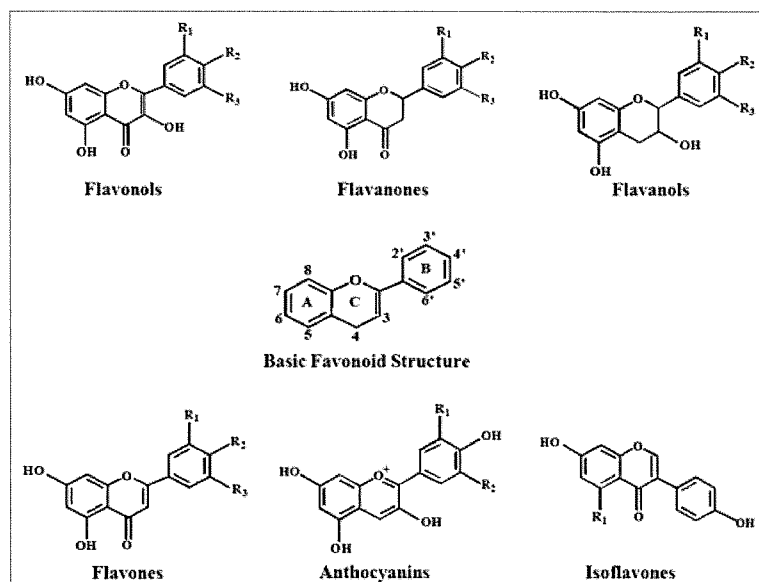


Figura 7: Estruturas químicas das subclasses dos flavonoides (Retirado de Pandey e Rizvi, 2009)

3.1. Modulação da inflamação intestinal pelos Polifenóis

Nos últimos anos, os polifenóis têm sido alvo de intensa investigação, tendo sido realizados inúmeros estudos que sugerem que estes compostos podem ser úteis na prevenção/tratamento de diversas doenças, nomeadamente doenças inflamatórias, como as DII (Scalbert, Johnson e Saltmarsh, 2005; Vezza *et al.*, 2016).

Inicialmente os efeitos benéficos dos polifenóis foram atribuídos às suas propriedades antioxidantes. No entanto, a baixa biodisponibilidade destes compostos aliada à intensa metabolização que sofrem pelas células intestinais e hepáticas, bem como pela microflora intestinal, e que bloqueia os grupos responsáveis pela atividade antioxidante observada *in vitro*, tornam pouco provável que os polifenóis possam atuar como antioxidantes diretos *in vivo*. Efetivamente, estudos recentes mostram que os efeitos benéficos dos polifenóis se devem essencialmente à capacidade que estes apresentam em modular vias de sinalização celular cruciais e a expressão de genes, sendo desta forma, capazes, nomeadamente, de modular a

expressão de várias citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α) e enzimas pró-inflamatórias (COX-2 e iNOS) (Cardona *et al.*, 2013; D'Archivio *et al.*, 2010).

Esta capacidade modulatória dos polifenóis tem sido evidenciada em vários estudos, os quais utilizam diferentes polifenóis isolados como o resveratrol, epigallocatequina galato (EGCG), curcumina e quercetina, entre outros (Shapiro *et al.*, 2007; Vezza *et al.*, 2016), bem como extratos polifenólicos (Nunes *et al.*, 2016).

3.1.1. Mecanismos Moleculares envolvidos

3.1.1.1. Modulação da Via de Sinalização Celular do NF- κ B

Como já abordado anteriormente, a ativação exagerada e inapropriada da via do NF- κ B desempenha um papel crucial no processo inflamatório observado nas DII, pelo que a inibição desta via de sinalização em qualquer passo da cascata tem sido considerada como uma potencial estratégia terapêutica.

Neste contexto, vários estudos demonstram a capacidade dos polifenóis modularem a via de sinalização do NF- κ B, nomeadamente, através da inibição de pelo menos um dos passos cruciais desta via inflamatória (Karunaweera *et al.*, 2015; Romier *et al.*, 2008).

Um estudo realizado recentemente, demonstrou que um extrato de vinho tinto enriquecido em polifenóis, tem a capacidade de proteger as células intestinais epiteliais da inflamação induzida por uma mistura de citocinas pró-inflamatórias relevantes no contexto da inflamação intestinal (TNF- α , IL-1 e INF- γ), através de vários mecanismos, nomeadamente, através da inibição da degradação do I κ B induzida pelas citocinas inflamatórias (Nunes *et al.*, 2013).

Outros estudos usando polifenóis isolados, como a curcumina (Jobin *et al.*, 1999), o resveratrol (Holmes-McNary e Baldwin, 2000), a luteolina (Kim e Jobin, 2005), entre outros, evidenciaram a capacidade destes compostos inibirem a ativação do complexo enzimático IKK e consequentemente a fosforilação e degradação do I κ B, prevenindo, assim, a translocação do NF- κ B para o núcleo. Desta forma, inibem a elevada expressão de mediadores pró-inflamatórios (Karunaweera *et al.*, 2015), controlando a inflamação aliada à DII (Hur *et al.*, 2012; Vezza *et al.*, 2016).

Uma diminuição da concentração de ROS pode constituir um importante mecanismo através do qual os polifenóis podem modular esta via de sinalização celular. Dado o intestino ser o local do organismo onde os polifenóis podem atingir a maior concentração (Cardona *et al.*, 2013), podem aí exibir uma ação antioxidante direta, neutralizando as ROS. Por outro lado, os polifenóis podem, também, inibir a enzima NADPH oxidase, uma das principais fontes de O_2^- , por interação direta ou por interação com a membrana. Esta diminuição da produção de oxidantes pelos polifenóis pode prevenir a oxidação da LC8 e a sua subsequente libertação do I κ B, prevenindo assim a fosforilação e degradação do I κ B (Jung *et al.*, 2008).

Existem ainda evidências experimentais, de que alguns polifenóis são capazes de interagir diretamente com o NF- κ B, impedindo a sua ligação ao gene alvo e inibindo, assim, a transcrição génica (Karunaweera *et al.*, 2015).

3.1.1.2. Modulação da Via de Sinalização Celular das JAK/STAT

Como referido anteriormente, quando as STAT são ativadas, translocam para o núcleo, onde promovem a transcrição de genes responsáveis pela expressão de mediadores pró-inflamatórios (Nunes *et al.*, 2016b; Vezza *et al.*, 2016).

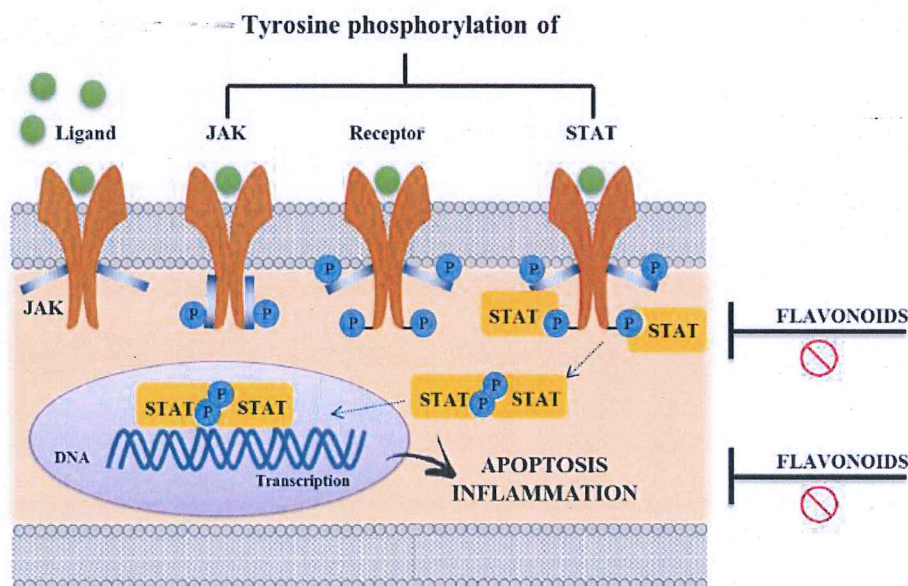


Figura 8: Via de Sinalização JAK/STAT (Retirado de Vezza *et al.*, 2016)

Níveis nucleares elevados de STAT 1 fosforilada (ativa) têm sido observados na mucosa do cólon em doentes com DII ativa (Schreiber *et al.*, 2002), sugerindo um importante papel desta via inflamatória na patogénese das DII. Assim, a inibição da via de sinalização JAK/STAT tem sido considerada uma possível estratégia terapêutica para o tratamento destas doenças.

Recentemente, Nunes e colaboradores demonstraram que um extrato polifenólico de vinho tinto diminui eficazmente os níveis de STAT 1 fosforilada (ativa) no núcleo bem como os níveis totais de JAK 1 fosforilada, suprimindo, desta forma, a cascata inflamatória das JAK/STAT, em células intestinais epiteliais, estimuladas com citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , Il-1 e IFN- γ) (Nunes *et al.*, 2016).

Usando o mesmo modelo celular de inflamação intestinal, Serra e colaboradores, reportaram a capacidade do resveratrol, um estibeleno encontrado especialmente na uva preta e no vinho tinto, e da cianidina-3-glucósido, uma antocianidina, para diminuir os níveis nucleares de STAT 1 fosforilada induzidos pelas citocinas pró-inflamatórias (Serra *et al.*, 2014).

O EGCG, o polifenol maioritário do chá verde, é também um potente inibidor da ativação, isto é, da fosforilação das STAT 1 (Stephanou, 2004; Wu *et al.*, 2012). Num estudo realizado por Ogawa e colaboradores, as células SW837 foram estimuladas com IFN- γ o que provocou um aumento dos níveis de STAT 1 fosforiladas (Ogawa *et al.*, 2012). Posteriormente, o tratamento com EGCG foi responsável por uma diminuição desses níveis, demonstrando a capacidade deste polifenol inibir a via das JAK/STAT (Ogawa *et al.*, 2012).

3.1.1.3. Modulação da Via de Sinalização Celular do Nrf2

O fator de transcrição Nrf2, (do inglês *Nuclear factor-erythroid 2-related factor*) desempenha um papel fundamental na indução de genes responsáveis pela resposta ao stresse oxidativo e de genes que codificam enzimas citoprotetoras (Surh, Kundu e Na, 2008). Além de modular a defesa celular contra o stresse oxidativo, apresenta ainda funções anti-inflamatórias, pelo que compostos capazes de ativar esta via de sinalização poderão vir a constituir uma importante estratégia terapêutica na prevenção e/ou tratamento de patologias inflamatórias (Nunes *et al.*, 2016; Shapiro *et al.*, 2007; Surh, Kundu e Na, 2008)

Embora, não existam dados consistentes acerca da atividade e expressão do Nrf2 na mucosa de doentes com DII, diversos estudos usando modelos animais, têm sugerido uma fraca ativação desta via nestas doenças, o que poderá justificar a expressão diminuída de enzimas antioxidantes na mucosa inflamada dos doentes com DII (Surh, Kundu e Na, 2008).

Em condições normais, o Nrf2 encontra-se no citoplasma ligado ao seu repressor Keap1, (do inglês *Kelch-like ECH-associated protein*). A associação do Nrf2 a esta proteína inibidora faz dele um alvo para a ubiquitinação e posterior degradação pelo proteossoma. Vários estímulos, nomeadamente compostos com propriedades pró-oxidantes ou eletrófilicas, ROS, entre outros, promovem a dissociação do complexo Nrf2-Keap1, permitindo a translocação do Nrf2 para o núcleo onde se liga a elementos de resposta antioxidante/electrofilica (ARE/EpRE) localizados em regiões promotoras de genes que codificam enzimas antioxidantes, incluindo a heme oxigenase-I e enzimas de destoxificação de fase II (Nunes et al., 2016; Surh, Kundu e Na, 2008), promovendo assim a defesa celular (Kansanen et al., 2013).

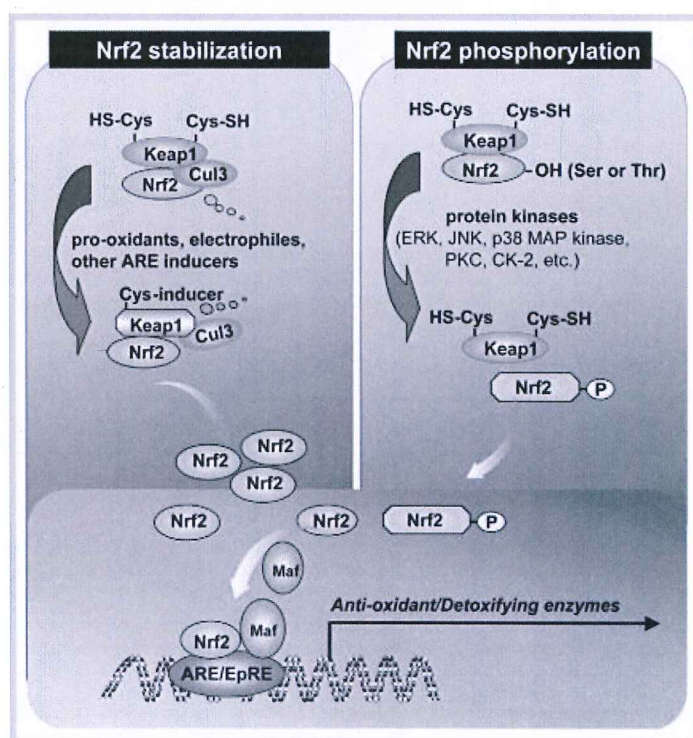


Figura 9: Via de Sinalização Nrf2-Keap1 (Retirado de Surh, Kundu e Na, 2008)

A dissociação do complexo Nrf2-Keap1 e, portanto, a ativação desta via de sinalização, pode ocorrer, nomeadamente por: (a) fosforilação de resíduos específicos de serina ou teonina do Nrf2; (b) oxidação ou modificação covalente de grupos tiólicos em resíduos de cisteína do Keap1 (Fig.9) (Surh, 2012).

Modificações na estrutura do Keap1 alteram a sua conformação, o que resulta numa incapacidade de ubiquitinação e consequente degradação do Nrf2 pelo proteossoma. Além do mais, evidências recentes sugerem que o Keap1, uma vez modificado, sofre, ele próprio, ubiquitinação e degradação pelo proteossoma, o que promove a estabilização do Nrf2, a sua translocação para o núcleo e a ligação a regiões Are ou EpRE (Surh, 2012; Surh, Kundu e Na, 2008).

Recentemente, usando células intestinais epiteliais, demonstrou-se que um extrato polifenólico de vinho tinto tem capacidade de ativar esta via de sinalização e consequentemente aumentar a expressão da enzima heme oxigenase-1 e estimular a síntese de glutatião (GSH), protegendo estas células da inflamação induzida por citocinas (Nunes, Teixeira *et al.*, 2016). Outros estudos demonstraram igualmente a capacidade dos polifenóis da dieta ativarem a via do Nrf2 através de vários mecanismos (Erlank *et al.*, 2011).

Alguns polifenóis são capazes de promover a fosforilação do Nrf2, através da ativação de cinases específicas o que promove a sua dissociação do Keap1 e consequentemente a translocação para o núcleo (Surh, 2012).

Os polifenóis, em particular aqueles que contêm um grupo catecol, como é o caso, por exemplo, da quercetina e da luteolina, podem, em condições fisiológicas, sofrer oxidação, com a consequente formação de quinonas ou semiquinonas e ROS. As quinonas, devido às suas propriedades eletrofílicas, podem reagir com resíduos de cisteína no Keap1, formando adutos e, as ROS podem também oxidar estes resíduos de cisteína, o que leva à dissociação do complexo Nrf2-Keap1, como já referido anteriormente (Ishii *et al.*, 2009; Lee-Hilz *et al.*, 2006; Metodiewa *et al.*, 1999).

A descoberta destes mecanismos, através dos quais, os polifenóis ativam a via do Nrf2 conduziram à inovadora descoberta de que os polifenóis podem ser benéficos para a saúde humana porque atuam como uma espécie de “toxinas fracas” que colocam as células em estado de alerta, estimulando a expressão das defesas celulares via ativação do Nrf2, o que lhes

permitirá responder de uma forma mais rápida e eficaz a posteriores estímulos tóxicos. Este mecanismo é designado por *hormesis* (Surh, Kundu e Na, 2008).

3.1.1.4. Modulação das Tight Junctions

A disfunção da barreira epitelial intestinal, nomeadamente ao nível das TJs, parece desempenhar um importante papel na patogénese de várias doenças inflamatórias crónicas, nomeadamente nas DII (Groschwitz e Hogan, 2009; Suzuki e Hara, 2011).

Estudos recentes têm mostrado que alguns polifenóis, como a quercetina, catequina, EGCG e a curcumina, têm a capacidade de promover e proteger a integridade da barreira intestinal epitelial contra citocinas inflamatórias, ROS e bactérias, através da modulação da estrutura das TJ, nomeadamente aumentando a expressão de proteínas chave das TJ e promovendo a sua interação com o citoesqueleto. (Ulluwishewa et al., 2011).

A quercetina é um dos flavonoides mais comuns na dieta diária sendo encontrado em níveis elevados nos vegetais e frutas e em plantas como a *Ginkgo biloba* e o *Hypericum perforatum* (Chuenkitiyanon, 2012; Suzuki e Hara, 2011; Ulluwishewa et al., 2011). Esta promove a interação da claudina-1 e da ocludina, proteínas chave das TJ, com o citoesqueleto e aumenta a expressão da claudina-4, outra importante proteína das TJ, preservando a integridade e função das TJs e consequentemente a função barreira do epitélio intestinal. (Chuenkitiyanon, 2012; Ulluwishewa et al., 2011).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As DII assumem uma incidência e prevalência crescente, sendo que as terapêuticas farmacológicas atualmente utilizadas, além de ineficazes se encontram associadas a efeitos adversos significativos, o que conduz à necessidade urgente de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que combinem eficácia e segurança.

Nos últimos anos, os polifenóis da dieta têm sido alvo de investigação intensa, existindo diversos estudos que sugerem que estes compostos podem ser úteis no tratamento/prevenção de diversas doenças inflamatórias crónicas, como é o caso das DII. Inicialmente, os seus efeitos benéficos foram atribuídos, essencialmente às suas propriedades antioxidantes, no entanto, recentemente, verificou-se que estes derivam da capacidade dos polifenóis modularem importantes vias de sinalização celular e a expressão de genes.

Assim e, tal como abordado neste trabalho, diversos polifenóis têm mostrado capacidade de modular vias de sinalização celular inflamatórias relevantes no contexto da inflamação intestinal, como é o caso da via do NF- κ B e das JAK/STAT, inibindo-as em determinados passos cruciais e, desta forma, inibindo a produção exagerada e descontrolada de mediadores inflamatórios. Além destas vias, apresentam ainda a capacidade de ativar a via do Nrf2 e, desta forma, induzir a expressão de enzimas com propriedades antioxidantes e destoxicantes, desempenhando assim, um papel chave no combate à inflamação e ao stressnitroxidativo, mecanismos importantes na patogénese das doenças inflamatórias como as DII.

Os polifenóis demonstram ainda particularidades benéficas ao nível da proteção da barreira intestinal epitelial, cuja integridade se encontra comprometida nas DII.

Apesar dos avanços significativos que foram feitos nos últimos anos, é importante referir que, os mecanismos moleculares subjacentes à potencial atividade anti-inflamatória dos polifenóis, permanecem ainda largamente por esclarecer, sendo necessário, continuar a investir neste campo de investigação, para que os polifenóis possam vir a constituir uma nova estratégia terapêutica na prevenção e/ou tratamento da inflamação intestinal.

5. BIBLIOGRAFIA

- ATREYA, I.; ATREYA, R.; NEURATH, M. F. - NF- κ B in inflammatory bowel disease. **Journal of Internal Medicine**. (2008) 591–596.
- BECK, P. L.; WALLACE, J. L. - Cytokines in inflammatory bowel disease. **Mediators of inflammation**. (1997) 95–103.
- BEN-AMI SHOR, Dana *et al.* - The hygiene theory harnessing helminths and their ova to treat autoimmunity. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**. (2013) 211–216.
- CARDONA, Fernando *et al.* - Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **Journal of Nutritional Biochemistry**. (2013) 1415–1422.
- CHUENKITYANON, Somrudee - A Potential Benefit of Quercetin in Preserving Tight Junction Integrity. **Journal of Epithelial Biology and Pharmacology**. (2012) 28–31.
- COSKUN, Mehmet *et al.* - Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Pharmacological Research**. (2013) 1–8.
- CROSS, Raymond K.; WILSON, Keith T. - Nitric oxide in inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**. (2003) 179–189.
- D'ARCHIVIO, Massimo *et al.* - Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. **International Journal of Molecular Sciences**. (2010) 1321–1342.
- DEBNATH, Trishna; KIM, Da Hye; LIM, Beong Ou - Natural products as a source of anti-inflammatory agents associated with inflammatory bowel disease. **Molecules**. (2013) 7253–7270.
- DOLCET, Xavier *et al.* - NF- κ B in development and progression of human cancer. **Virchows Archiv**. (2005) 475–482.
- ERLANK, Hilla *et al.* - Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H₂O₂, semiquinones, and quinones. **Free Radical Biology and Medicine**. (2011) 2319–2327.
- GIACOMIN, Paul *et al.* - Suppression of inflammation by helminths: a role for the gut microbiota? **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**. (2015) 1–6.
- GIRGIS, Natasha M.; GUNDRU, Uma Mahesh; LOKE, P'ng - Immune Regulation during

Helminth Infections. **PLoS Pathogens**. (2013) 11–13.

GROSCWITZ, Katherine R.; HOGAN, Simon P. - Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. (2009) 3–20.

HANAUER, Stephen B. - Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities. **Inflamm Bowel Dis**. (2006) 3–9.

HAYDEN, Matthew S.; GHOSH, Sankar - Shared Principles in NF- κ B Signaling. **Cell**. (2008) 344–362.

HELMBY, Helena - Human helminth therapy to treat inflammatory disorders - where do we stand? **BMC immunology**. (2015) 1-5.

HOLMES-MCNARY, Minnie; BALDWIN, Albert S.Jr - Chemopreventive Properties of trans-Resveratrol Are Associated with Inhibition of Activation of the I κ B Kinase. **Cancer Research**. (2000) 3477–3483.

HUR, Sun Jin *et al.* - Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. **Nutrition Research**. (2012) 801–816.

ISHII, Takeshi *et al.* - Catechol type polyphenol is a potential modifier of protein sulfhydryls: Development and application of a new probe for understanding the dietary polyphenol actions. **Chemical Research in Toxicology**. (2009) 1689–1698.

JATIANI, S. S. *et al.* - JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. **Genes & Cancer**. (2010) 979–993.

JOBIN, Christian *et al.* - Curcumin Blocks Cytokine-Mediated NF- κ B Activation and Proinflammatory Gene Expression by Inhibiting Inhibitory Factor I- κ B Kinase Activity. **The Journal of Immunology**. (1999) 3474–3483.

JUNG, Yuyeon *et al.* - Dynein light chain LC8 negatively regulates NF- κ B through the redox-dependent interaction with I κ B α . **The Journal of biological chemistry**. (2008) 23863–23871.

KANSANEN, Emilia *et al.* - The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. **Redox Biology**. (2013) 45–49.

KARP, Sean M.; KOCH, Timothy R. - Oxidative Stress and Antioxidants in Inflammatory Bowel Disease Free Radical Production in Patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD). **Dis Mon.** (2006) 199–207.

KAPLAN, Gilaad G. *et al* - The global burden of IBD: from 2015 to 2025. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.** (2015) 720-727.

KARUNAWEEERA, Niloo *et al.* - Plant polyphenols as inhibitors of NF- κ B induced cytokine production-a potential anti-inflammatory treatment for Alzheimer's disease? **Frontiers in molecular neuroscience.** (2015) 1-5.

KIM, Hun Sik; LEE, Myung Shik - STAT1 as a key modulator of cell death. **Cellular Signalling.** (2007) 454–465.

KIM, Joo Sung; JOBIN, Christian - The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF- κ B signalling and gene expression by blocking I κ B kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells. **Immunology.** (2005) 375–387.

LEE, Sung Hee - Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. **Intestinal Research.** (2015) 11-18.

LEE-HILZ, Yee Y. *et al.* - Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression. **Chemical Research in Toxicology.** (2006) 1499–1505.

LIVERANI, E. *et al.* - How to predict clinical relapse in inflammatory bowel disease patients. **World journal of gastroenterology.** (2016) 1017–1033.

MANACH, Claudine - Polyphenols: food sources and bioavailability . *Am J Clin Nutr.* **American Journal of Clinical Nutrition.** (2004) 727–747.

MARTIN, Derek A.; BOLLING, Bradley W. - A review of the efficacy of dietary polyphenols in experimental models of inflammatory bowel diseases. **Food & function.** (2015) 1773–1786

METODIEWA, Diana *et al* - Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. **Free Radic Biol Med.** (1999) 107-116.

MUZES, G. *et al.* - Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases. **World J Gastroenterol.** (2012) 5848–5861.

NUNES, Carla *et al.* - Intestinal anti-inflammatory activity of red wine extract: unveiling the

mechanisms in colonic epithelial cells. **Food & function**. (2013) 373–383.

NUNES, Carla *et al.* - Red wine polyphenol extract efficiently protects intestinal epithelial cells from inflammation via opposite modulation of JAK/STAT and Nrf2 pathways. **Toxicol. Res.** (2016) 53–65.

PAVLICK, Kevin P. *et al.* - ROLE OF REACTIVE METABOLITES OF OXYGEN AND NITROGEN IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE. **Free Radical Biology & Medicine** (2002) 311–322.

OGAWA, Kengo *et al.* - (-)-Epigallocatechin gallate inhibits the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human colorectal cancer cells. **Oncology Letters**. . (2012) 546–550.

PANDEY, Kanti Bhooshan; RIZVI, Syed Ibrahim - Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**. (2009) 270–278.

PIECHOTA-POLANCZYK, Aleksandra; FICHNA, Jakub - Review article: The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. (2014) 605–620.

PITHADIA, Anand B.; JAIN, Sunita - Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). **Pharmacol.Rep.** (2011) 629–642.

PONDER, Alexis; LONG, Millie D. - A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. **Clinical Epidemiology**. (2013) 237–247.

RAWLINGS, Jason S.; ROSLER, Kristin M.; HARRISON, Douglas A. - The JAK/STAT signaling pathway. **Journal of Cell Science**. (2004) 1281–1283.

ROMIER, Béatrice *et al.* - Modulation of signalling nuclear factor-kappaB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells. **The British journal of nutrition**. (2008) 542–551.

SANTANGELO, Carmela *et al.* - Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**. (2007) 394–405.

SCALBERT, Augustin; JOHNSON, Ian T.; SALTMARSH, Mike - Polyphenols: antioxidants and beyond. **The American journal of clinical nutrition**. (2005) 215–217.

SCHREIBER, S. *et al.* - Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) I

in human chronic inflammatory bowel disease. **Gut.** (2002) 379–385.

SERRA, Diana *et al.* - Resveratrol modulates cytokine-induced JAK/STAT activation more efficiently than 5-aminosalicylic acid: An in vitro approach. **PLoS ONE.** (2014) 1-11.

SHAPIRO, H. *et al.* - Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and acute pancreatitis. **Gut.** (2007) 426–435.

SOUFLI, Imene *et al.* - Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics.** (2016) 353-360.

STEPHANOU, A. - Role of STAT-1 and STAT-3 in ischaemia/reperfusion injury. **J Cell Mol Med.** (2004) 519–525.

SURH, Young Joon - Nrf2, an essential component of cellular stress response, as a potential target of hormetic phytochemicals. **Journal of Food and Drug Analysis.** (2012) 217–219.

SURH, Young Joon; KUNDU, Joydeb Kumar; NA, Hye Kyung - Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. **Planta Medica.** (2008) 1526–1539.

SUZUKI, Takuya; HARA, Hiroshi - Role of flavonoids in intestinal tight junction regulation. **Journal of Nutritional Biochemistry.** (2011) 401–408.

TRIANTAFILLIDIS, John K.; MERIKAS, Emmanuel; GEORGOPOULOS, Filippos - Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. **Drug Design, Development and Therapy.** (2011) 185–210.

ULLUWISHEWA, Dulantha *et al.* - Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. **The Journal of nutrition.** (2011) 769–776.

VERSINI, Mathilde *et al.* - Unraveling the Hygiene Hypothesis of helminthes and autoimmunity: origins, pathophysiology, and clinical applications. **BMC medicine.** (2015) 1-16.

VEZZA, Teresa *et al.* - Flavonoids in Inflammatory Bowel Disease: A Review. **Nutrients.** (2016) 1-22.

WEISS, Ursula - Inflammation. **Nature.** (2008) 427.

WU, Dayong *et al.* - Green tea EGCG, T cells, and T cell-mediated autoimmune diseases.

Molecular Aspects of Medicine. (2012) 107–118.

YE, Yulan *et al.* - The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine.** (2015) 22529–22542.

YU, Shui Lian *et al.* - Immunopathological roles of cytokines, chemokines, signaling molecules, and pattern-recognition receptors in systemic lupus erythematosus. **Clinical and Developmental Immunology.** (2012) 1-14.

ZHANG, Yi-Zhen; LI, Yong-Yu - Inflammatory bowel disease: pathogenesis. **World journal of gastroenterology.** (2014) 91–99.

ZUNDLER, Sebastian; NEURATH, Markus - Integrating Immunologic Signaling Networks: The JAK/STAT Pathway in Colitis and Colitis-Associated Cancer. **Vaccines.** (2016) 1-20.