



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

VINICIUS BALAN RAMOS CORONADO

**EFEITOS DA DIETA HIPERPROTEICA NO ÍLEO DE
CAMUNDONGOS COM RETOCOLITE ULCERATIVA
EXPERIMENTAL**

Londrina
2022

VINICIUS BALAN RAMOS CORONADO

**EFEITOS DA DIETA HIPERPROTEICA NO ÍLEO DE
CAMUNDONGOS COM RETOCOLITE ULCERATIVA
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título mestre.

Orientador: Eduardo José de Almeida Araújo.

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

V785e Coronado, Vinicius Balan Ramos.
EFEITOS DA DIETA HIPERPROTEICA NO ÍLEO DE CAMUNDONGOS COM RETOCOLITE ULCERATIVA EXPERIMENTAL / Vinicius Balan Ramos Coronado. - Londrina, 2022.
74 f.

Orientador: Eduardo Jose de Almeida Araujo.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Dieta - Tese. 2. Nutrição - Tese. 3. Retocolite ulcerativa - Tese. 4. Doenças inflamatórias intestinais - Tese. I. Araujo, Eduardo Jose de Almeida . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 612.39

VINICIUS BALAN RAMOS CORONADO

**EFEITOS DA DIETA HIPERPROTEICA NO ÍLEO DE
CAMUNDONGOS COM RETOCOLITE ULCERATIVA
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador Prof. Dr. Eduardo José de Almeida
Araújo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Rafael Deminice
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fábio Goulart de Andrade
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 14 de dezembro de 2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Marcia e Marcos, irmão Marcos e namorada Isadora, por terem sido meu apoio e suporte para eu conseguir desenvolver minhas atividades neste curso de mestrado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais por tudo que fizeram até aqui, contribuindo para minha formação como pessoa.

Em segundo lugar, não menos importante, à minha namorada, amigos e familiares por toda ajuda emocional.

Agradeço também ao meu orientador, pela oportunidade e por toda paciência para me ensinar e auxiliar durante o mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, pela a oportunidade de estar realizando este curso de mestrado.

Aos meus colegas de laboratório, em especial Camila Machado e Andréia Pupim, por terem me auxiliado e ensinado tantas coisas nesses últimos anos.

E por fim, à CAPES, pela bolsa de estudos concedida para realização durante meu mestrado

CORONADO, Vinicius Balan Ramos. **Efeitos da dieta hiperproteica no íleo de camundongos com retocolite ulcerativa experimental**. 2022. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

Introdução: A retocolite ulcerativa (RCU) é uma das doenças inflamatórias intestinais (DII), que acomete o reto, colo e parte terminal do íleo, causando alterações fenotípicas e funcionais no sistema nervoso entérico (SNE). Estudos demonstram que os nutrientes da dieta também podem desencadear alterações no fenótipo e função do SNE. O SNE é a inervação intrínseca do trato gastrointestinal, o qual é responsável pelo controle da sua motilidade e suas secreções. Assim, este estudo se propôs a investigar se um esse tipo de dieta hiperproteica (50%) aumenta a vulnerabilidade do íleo durante a fase aguda da RCU, bem como se intensifica interfere no processo inflamatório e, conseqüentemente, na estrutura das possíveis alterações no SNE. **Material e métodos:** Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos e, os quais foram distribuídos em quatro grupos experimentais utilizando sulfato de sódio dextrano (DSS) como indutor de RCU: DP (dieta padrão), HP (dieta hiperproteica), DP/DSS (dieta padrão e DSS 3%) e HP/DSS (dieta hiperproteica e DSS 3%). Foi realizado o acompanhamento diário da massa corporal dos animais, a consistência das fezes e presença de sangue oculto nas fezes para realizar o índice de atividade da doença (IAD). Segmentos do íleo foram submetidos à análise histológica para coloração com Hematoxilina e Eosina e à imunofluorescência para evidenciar a população geral (PGP9.5+) e das subpopulações neuronais nitrérgica⁺, nitrérgica⁻, calretinina com fraca (Calr⁺) e forte (Calr⁺⁺) imunorreatividade. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média. Dados com distribuição normal foram comparados pelo teste anova ANOVA two-way seguido do pós-teste de Tukey. Dados com distribuição livre foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. **Resultados:** Os camundongos expostos ao DSS e que foram alimentados com a dieta hiperproteica apresentaram um IAD ainda maior que o dos animais que receberam dieta padrão ($P < 0,05$). O grupo HP/DSS apresentou redução significativa da espessura da mucosa de regiões intervulares, da largura de cripta e da altura dos enterócitos quando comparado ao DP/DSS ($P < 0,05$). No plexo mioentérico, foi observada uma atrofia dos neurônios nitrérgicos ($P < 0,05$) e, no plexo submucoso, uma atrofia nas subpopulações estimadamente colinérgica (Calr⁺⁺) e VIPérgica (Calr⁺) ($P < 0,05$). **Conclusão:** A dieta hiperproteica piora os sinais clínicos da RCU na fase aguda da doença, assim como exerce uma influência sobre o tamanho dos neurônios entéricos no íleo dos camundongos.

CORONADO, Vinicius Balan Ramos. **Effects of a high-protein diet on the ileum of mice with experimental ulcerative colitis**. 2022. 73 p. Dissertation (master's in health sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Introduction: Ulcerative colitis (UC) is an inflammatory bowel disease (IBD), which affects the rectum, colon, and terminal part of the ileum, causing phenotypic and functional changes in the enteric nervous system (ENS). Studies show that dietary nutrients can also trigger changes in ENS phenotype and function. The ENS is the intrinsic innervation of the gastrointestinal tract, which is responsible for controlling its motility and secretions. Thus, this study aimed to investigate whether this type of high-protein diet (50%) increases the vulnerability of the ileum during the acute phase of UC, as well as intensifies it interferes with the inflammatory process and, consequently, with the structure of the possible changes in the SNE. **Material and methods:** C57BL/6 male mice were used, which were divided into four experimental groups using sodium dextran sulfate (DSS) as UC inducer: SD (standard diet), HP (high-protein diet), DP/DSS (standard diet and DSS 3%) and HP/DSS (high protein diet and DSS 3%). Daily monitoring of the animals' body mass, stool consistency and presence of occult blood in the stools was performed to perform the disease activity index (DIA). Segments of the ileum were submitted to histological analysis for staining with Hematoxylin and Eosin and to immunofluorescence to evidence the general population (PGP9.5+) and the nitrergic+, nitrergic-, calretinin neuronal subpopulations with weak (Calr+) and strong (Calr++) immunoreactivity. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean. Normally distributed data were compared by two-way ANOVA test followed by Tukey's post-test. Freely distributed data were compared using the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test. **Results:** The mice exposed to DSS and fed the high-protein diet had an even higher IAD than the mice fed the standard diet ($P<0.05$). The HP/DSS group showed a significant reduction in the thickness of the mucosa of intervillar regions, in the width of the crypt and in the height of the enterocytes when compared to the SD/DSS ($P<0.05$). In the myenteric plexus, an atrophy of nitrergic neurons was observed ($P<0.05$) and, in the submucosal plexus, an atrophy in the estimated cholinergic (Calr++) and VIPergic (Calr+) subpopulations ($P<0.05$). **Conclusion:** The high-protein diet worsens the clinical signs of UC in the acute phase of the disease, as well as exerting an influence on the size of enteric neurons in the ileum of mice.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação Morfológica do Sistema Nervoso Entérico.18
- Figura 2** - Tipos de neurônios entéricos presentes no intestino delgado de cobaias e redes de conexões estabelecidas.....21
- Figura 3** - As bases celulares e moleculares para efeitos diretos e indiretos de nutrientes em neurônios entéricos.28

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Composição de dietas experimentais. SD - Dieta padrão (22% proteína); HP - Dieta de hiperproteína (44% de proteína).....30
- Tabela 2** - Anticorpos primários e secundários utilizados em imunoreações para PGP9.5+, nNOS e Calr.33

LISTA DE ABREVIATURAS

5HT	Serotonina
AGCCs	Ácidos graxos de cadeia curta
ACh	Acetilcolina
Calr	Calretinina
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGE	Células da glia entérica
ChAT	Colina acetil transferase
COX2	Ciclooxigenase
DIIs	Doenças inflamatórias intestinais
DC	Doença de Crohn
DP	Dieta padrão
DSS	Sulfato de sódio dextrano
GPx	Glutationa peroxidase
HP	Dieta hiperproteica
DP/DSS	Dieta padrão em animais expostos a DSS 3%
HP/DSS	Dieta hiperproteica em animais exposto a DSS 3%
IAD	Índice de atividade da doença
IPAN	Neurônio intrínseco aferente primário
LOX	Lipoxigenases
MPO	Mieloperoxidase
NPY	Neuropeptídeo Y
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX2	NADPH oxidase
PBS	Tampão fosfato salino
PON1	Paraoxonase
RCU	Retocolite ulcerativa
ROS	Espécies reativas a oxigênio
RNS	Espécies reativas a nitrogênio
SNE	Sistema nervoso entérico

SOD	Superóxido dismutase
SP	Substância P
TGI	Trato Gastrointestinal
TNBS	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS	12
1.2	ESTRESSE OXIDATIVO	15
1.3	DIETA HIPERPROTEICA	16
1.4	SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO (SNE)	18
1.4.1	Neurônios	19
1.4.2	Código Químico	23
1.5	EFEITOS DA RETOCOLITE ULCERATIVA SOBRE O SNE	25
1.6	EFEITOS DA DIETA SOBRE O SNE	27
	METODOLOGIA	29
1	Animais	30
2	Dietas e Grupos Experimentais	30
3	Avaliação Clínica dos Animais.....	31
4	Eutanásia e Coleta de Material.....	31
5	Estresse Oxidativo.....	31
6	Análise Histopatológica	32
7	Avaliação de Neurônios Entéricos	32
8	Análise Estatística	33
2	ARTIGO CIENTÍFICO	34
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DOS ITENS 1 a 3	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças inflamatórias intestinais

As duas principais formas das Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs) são representadas pela doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU), sendo manifestadas pela inflamação e ulceração intestinal (ABRAHAM; CHO, 2009). Essas doenças são caracterizadas por períodos agudos, com crises de diarreia e outras complicações gastrointestinais e sistêmicas, em conjunto com períodos de remissão, onde não há manifestações dos sintomas (ABRAHAM; CHO, 2009). Entre essas complicações estão sangramento nas fezes, dores abdominais, urgência de evacuação, perda de peso e até mesmo dores articulares (FUMERY et al., 2018).

As DIIs apresentam um problema de saúde pública e constituem um dos maiores grupos de risco para o desenvolvimento de câncer colorretal (ABRAHAM; CHO, 2009; SANDS, 2007). Um estudo realizado em 195 países e territórios, mostrou que o número de casos aumentou de 3,7 milhões para mais de 6,8 milhões, com uma prevalência de 57% em mulheres e 43% homens entre 1990 e 2017 (ALATAB et al., 2020). Países com alto índice sócio demográfico apresentaram maiores taxas de prevalência padronizada por idade, comparado aos países de baixo índice, destacando-se a Europa Ocidental e a América do Norte com as maiores taxas de mortalidade padronizadas por idade em 2017 (ALATAB et al., 2020).

A retocolite ulcerativa é confinada à mucosa e limitada ao reto, cólon e parte do íleo terminal (ABRAHAM; CHO, 2009). Está associada à maior morbidade nos países ocidentais, e sua incidência está aumentando nos países em desenvolvimento (RAMOS; PAPADAKIS, 2019). Sua fisiopatologia é multifatorial e inclui predisposição genética, defeitos da barreira epitelial, respostas imunes desreguladas, disbiose microbiana e fatores ambientais (RAMOS; PAPADAKIS, 2019; UNGARO et al., 2017). Entre esses fatores ambientais estão fumo, medicamentos, dietas, drogas e estresse (LOFTUS, 2004).

O fumo é o fator ambiental mais estudado (COSNES, 2004, 2008; LAKATOS; SZAMOSI; LAKATOS, 2007) e fumar aumenta o risco de desenvolver DC e está associado a uma maior taxa de doença pós-operatória (BIRRENBACH; BÖCKER, 2004). Os medicamentos como aspirina e anti-

inflamatórios não esteroidais em doses altas, com duração prolongada foram associados a um maior risco de desenvolver RCU e DC (ANANTHAKRISHNAN et al., 2015), além disso, há uma associação entre o uso de antibióticos na infância e o desenvolvimento de DII antes dos 12 anos de idade (SHAW; BLANCHARD; BERNSTEIN, 2010).

A deficiência de vitamina D é comum em pacientes com DII e níveis inferiores a faixa de referência contribuiu para o aumento do risco de DII (LESLIE et al., 2008). Um estudo feito em camundongos mostrou que a deficiência de vitamina D está associada a uma maior susceptibilidade à RCU induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) e sua suplementação melhora a severidade da doença (CANTORNA et al., 2000). O consumo de gorduras trans e ácidos graxos n-6 também tem sido correlacionado positivamente com o desenvolvimento de RCU (ANANTHAKRISHNAN et al., 2014; HART et al., 2008), por outro lado uma dieta rica em ácidos graxos n-3 foram associados a uma diminuição do risco de desenvolver RCU (IBD IN EPIC STUDY INVESTIGATORS et al., 2009). Além disso, o consumo de adoçantes artificiais vem aumentando nos últimos anos (QIN, 2012) e existe uma associação entre o consumo de adoçantes e açúcares adicionados e desenvolvimento de RCU (HANSEN et al., 2011; RACINE et al., 2016).

A dieta de um indivíduo influencia no desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais, interferindo positivamente ou negativamente na microbiota intestinal (BLACHIER et al., 2017), porém não há uma recomendação dietética específica para ajudar no tratamento da RCU (DROSSMAN, 2016). Intervenções dietéticas de curto e longo prazo levam a mudanças na microbiota intestinal e podem influenciar o estado pró-inflamatório da mucosa intestinal (EL-ZAATARI; KAO, 2017; MOSCHEN; WIESER; TILG, 2012). A maioria das fibras são fermentadas dentro do cólon por enzimas bacterianas, produzindo ácidos graxos de cadeia curta que podem ser usados como fonte de energia pela mucosa e portanto, há uma hipótese de que algumas fibras específicas reduzem a aderência e translocação bacteriana, e a diminuição da fibra dietética leva ao aumento do consumo da mucosa colônica por bactérias, aumentando o risco de inflamação (DESAI et al., 2016; GILL et al., 2018).

A disbiose microbiana, como resultado da diminuição da diversidade do microbioma, foi descrita em pacientes com DII (FRANK et al., 2007; SARTOR;

WU, 2017). Se esta é a causa ou consequência da inflamação intestinal observada, ou ambas, ainda não foi determinado (SARTOR; WU, 2017). Em pacientes com DII, há diminuição de grupos de bactérias com capacidade anti-inflamatória e aumento de grupos de bactérias com capacidade pró-inflamatória, quando comparados a indivíduos saudáveis (FRANK et al., 2007; PETERSON et al., 2008). As alterações mais frequentemente observadas incluem a diminuição de Firmicutes e aumento de Proteobacterias e Bacteroidetes (NISHIDA et al., 2018). O número de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta como *Faecalibacterium prausnitzii* demonstrou estar diminuído em pacientes com DII, conseqüentemente afetando a diferenciação e expansão de linfócitos T reguladores, bem como a proliferação de células epiteliais (ATARASHI et al., 2013). O aumento de Proteobacterias, principalmente *E. coli*, com capacidade de adesão ao epitélio intestinal afeta a permeabilidade do intestino, altera a diversidade e composição da microbiota e induz respostas inflamatórias ao regular a expressão de genes inflamatórios (AHMED et al., 2016). Conseqüentemente, leva a uma maior presença de bactérias associadas à inflamação da mucosa nesses pacientes (SCHULTSZ et al., 1999; VAN DER WAAIJ et al., 2005). Por fim, o número de bactérias redutoras de sulfato, como *Desulfovibrio*, está aumentado na DII resultando numa maior produção de sulfato de hidrogênio (H₂S), o qual danifica a barreira intestinal e permite a ativação da inflamação da mucosa (PNG et al., 2010).

A síntese e a secreção de mucinas está prejudicada na retocolite ulcerativa (VAN KLINKEN et al., 1999), aumentando a permeabilidade intestinal da mucosa aos patógenos e a captação de antígenos e conseqüentemente ativando células pró-inflamatórias do sistema imune (HELLER et al., 2005; ORDÁS et al., 2012). Além disso, há uma desregulação da resposta imune adaptativa devido a um desequilíbrio entre as células T reguladoras e as T efetoras, na qual a resposta Th2 ativa as células T assassinas naturais que secretam uma série de citocinas, incluindo IL-13, que induzem a apoptose de células epiteliais e interrompe as junções aderentes (HELLER et al., 2005, 2008).

Em relação à compreensão sobre as contribuições genéticas para as DII, houve alguns avanços com estudos de associações de genoma (GWAS) que identificam polimorfismos de nucleotídeo único (PNSs) (GAYA et al., 2006). Um estudo identificou genes associados a DII, sendo 110 associados para ambas as

doenças, 30 específicos para Crohn e 23 para retocolite (THE INTERNATIONAL IBD GENETICS CONSORTIUM (IIBDGC) et al., 2012). Muitos genes estão envolvidos com a imunidade intestinal, incluindo a barreira da mucosa intestinal, função, autofagia, defesa microbiana e regulação da imunidade adaptativa (THE INTERNATIONAL IBD GENETICS CONSORTIUM (IIBDGC) et al., 2012). Vale ressaltar que apesar de muitos indivíduos carregar os genes associados, a maioria nunca desenvolve a doença, uma observação que demonstra que a bagagem genética do indivíduo seja somente um componente parcial no desenvolvimento das DII e que, portanto, o ambiente e seus hábitos de vida, incluindo a dieta, seja determinante para o desenvolvimento da doença (BOUMA; STROBER, 2003; KHOR; GARDET; XAVIER, 2011).

1.2. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes e está associado a respostas inflamatórias e por isso tem sido investigado na propagação e exacerbação da retocolite ulcerativa (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). A infiltração de células imunes no tecido gera espécies reativas a oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) gerando um excesso de pró-oxidantes, contribuindo para lesão celular e aumento da permeabilidade da barreira da mucosa, acelerando o processo inflamatório (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). O estresse oxidativo pode estar implicado na patogênese das DII pois vários locais de risco genético relevantes para o estresse oxidativo foram associados à DII e é um dos principais desencadeantes da transformação neoplásica em pacientes com DII (TIAN; WANG; ZHANG, 2017).

As ROS e RNS, moléculas altamente reativas e instáveis, são geradas através do aumento de células reativas mediado por inflamação de várias lipoxigenases (LOX), mieloperoxidase (MPO) e isoformas induzíveis de óxido nítrico (NO) sintase (NOS2), ciclooxigenase (COX2) e NADPH oxidase (NOX2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Para que a homeostase celular seja preservada, a atividade dos pró-oxidantes deve ser contrabalançada pelos antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). A primeira linha de defesa engloba enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), peroxirredoxinas e paraoxonase (PON1), cuja principal função é prevenir a formação de radicais livres e a neutralização

dos já formados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). A segunda linha consiste em captadores de radicais livres, que neutralizam os radicais livres doando elétrons, incluindo glutathione (GSH), ácido úrico, cisteína, bilirrubina, carotenoides e vitaminas A, E e C (IGHODARO; AKINLOYE, 2018; MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018; NIMSE; PAL, 2015). A terceira e quarta linhas de defesa estão focadas na remoção dos danos causados por pró-oxidantes em nível molecular e celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

A superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione reduzida (GSH) têm demonstrado desempenhar um papel crítico na fisiopatologia da UC tanto em animais experimentais quanto em humanos (KARP; KOCH, 2006; PRAVDA, 2005). A glutathione (GSH) atua como protetor contra ROS e RNS, tanto diretamente, por sua eliminação, quanto indiretamente como cofator para várias enzimas, GPx e outras. Já a SOD converte o ânion superóxido no peróxido de hidrogênio metabólito facilmente difundível e estável (H₂O₂) e, em seguida, a catalase atua no H₂O₂ e o neutraliza em água.

Na RCU, foi relatada uma diminuição de GSH no soro (HAMOUDA, 2011) e eritrócitos (RANA et al., 2014). Já na mucosa inflamada, a atividade da GPx, bem como a concentração de seu cofator glutathione costuma estar diminuída (S. PINTO et al., 2013) enquanto a expressão de SOD aumentar (POULSEN et al., 2012). Em relação às enzimas pró-oxidantes, a SOD intracelular foi associada positivamente na RCU (RANA et al., 2014). Quanto aos marcadores de dano oxidativo às proteínas, as proteínas carboniladas formadas por proteínas com aldeídos reativos se acumulam significativamente no tecido intestinal de pacientes com DC e UC (KESHAVARZIAN, 2003)

1.3. Dieta hiperproteica

Embora haja uma falta de consenso sobre a definição formal de uma dieta rica em proteínas ou hiperproteica, a ingestão ideal de proteína dietética foi analisada por mais de um século e atualmente o Instituto de Medicina Americano recomenda uma ingestão média diária de proteína para pessoas adultas de 0,8 g/kg, ou seja, valores entre 1,2 a 2,0 g/kg/dia de proteína caracterizam uma dieta hiperproteica para seres humanos (INSTITUTE OF MEDICINE (US)

COMMITTEE TO REVIEW DIETARY REFERENCE INTAKES FOR VITAMIN D AND CALCIUM, 2011; PADOVANI et al., 2006).

Dietas ricas em proteínas vem sendo utilizadas para indivíduos com diabetes tipo 2, queimaduras e sarcopenia (KEMMLER et al., 2020; KREYMANN et al., 2006; VERREIJEN et al., 2017). Alguns dados em humanos mostraram uma hiperfiltração glomerular em indivíduos adeptos a uma alta ingestão de proteínas pode ter efeitos deletérios sobre a saúde renal na população com hiperfiltração preexistente ou com outros fatores de risco, como história prévia de doença cardiovascular (ESMEIJER et al., 2020; KALANTAR-ZADEH; KRAMER; FOUQUE, 2020; KAMPER; STRANDGAARD, 2017; KO et al., 2020).

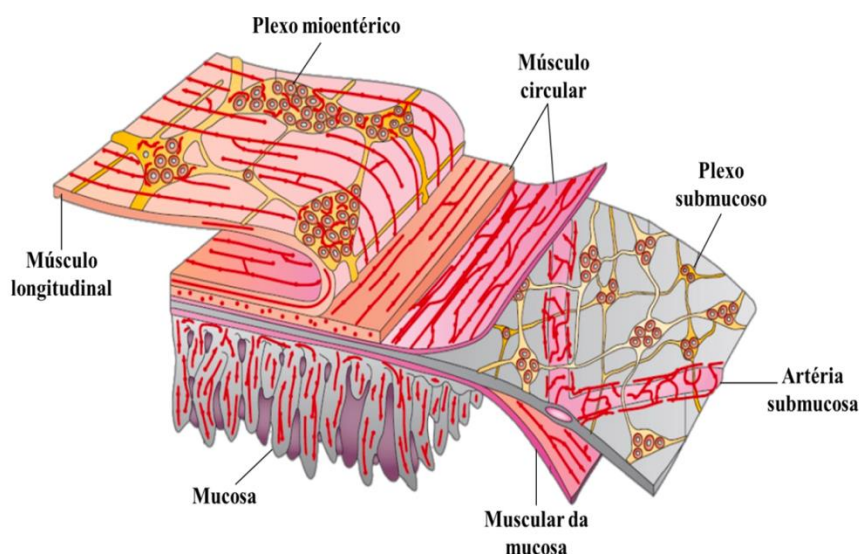
Além disso, a degradação de proteínas, peptídeos e aminoácidos leva à produção de vários metabólitos biologicamente ativos no lúmen intestinal, como ácidos graxos de cadeia ramificada, amônio, sulfeto de hidrogênio, p-cresol, derivados fenólicos e indólicos (ZHAO et al., 2018). Estes metabólitos podem causar um aumento da permeabilidade intestinal (LLEWELLYN *et al.*, 2017), variações no ambiente luminal (BLACHIER *et al.*, 2017), modificações na morfologia das células epiteliais (ANDRIAMIHAJA *et al.*, 2010) e exacerbação da inflamação aguda no cólon (LAN *et al.*, 2016; CUI e KIM, 2018). Algumas dessas atividades têm sido associadas à patogênese da DII e outras doenças gastrointestinais (GILBERT et al., 2011).

A carne vermelha mostrou exacerbar a colite induzida por dextran sulfato de sódio em camundongos (LE LEU et al., 2013) e o consumo elevado de carne vermelha, sobremesas açucaradas e alimentos ricos em gordura e grãos refinados, foram associados ao aumento da inflamação da mucosa medida pela calprotectina fecal em humanos (ABRAHAM; KANE, 2012). A indução da RCU experimental em camundongos alimentados com dieta hiperproteica levou a colite grave com alta mortalidade (VIDAL-LLETJÓS et al., 2019). Um estudo analisou a fonte e quantidade de macronutrientes descobriu que uma grande quantidade de caseína na dieta contribui de forma mais significativa para a sensibilidade à retocolite ulcerativa (LLEWELLYN et al., 2018). Alguns achados mostram que as proteínas podem influenciar à susceptibilidade a RCU experimental (LAN et al., 2016). Além disso, há um aumento na incidência de RCU em populações adeptas a dieta com alta ingestão proteica (JANTCHOU et al., 2010; RASHVAND et al., 2015).

1.4. Sistema Nervoso Entérico (SNE)

O Sistema Nervoso Entérico (SNE) é reconhecido como uma terceira divisão do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), juntamente com os sistemas nervosos simpático e parassimpático (FURNESS, 2006). O SNE é encontrado ao longo de todo trato gastrointestinal (TGI) e se estende do esôfago ao reto, além de estar presente no pâncreas e na vesícula biliar (FURNESS, 2006). É composto principalmente por células da glia entérica (CGE) e por neurônios entéricos e possui um amplo sistema de controle de reflexo para função digestiva que trabalha em conjunto com o sistema nervoso central (SNC) e as vias neurais que passam pelos gânglios simpáticos (FURNESS, 2006; FURNESS et al., 2014). Dentro desse sistema existem pequenos aglomerados, os gânglios entéricos, que são interconectados por feixes de fibras nervosas, sendo tão numerosos que o sistema como um todo contém milhões de células nervosas (FURNESS, 2006; FURNESS et al., 2014).

Figura 1- Representação Morfológica do Sistema Nervoso Entérico.



Fonte: Adaptado de Furness (2012).

O Sistema Nervoso Entérico (SNE) é composto por redes interconectadas de neurônios e suas fibras nervosas e estão dispostos em dois plexos: o plexo submucoso e o plexo mioentérico. O plexo submucoso está localizado na camada submucosa, entre a muscular da mucosa e a camada de músculo circular, e está relacionado ao controle do fluxo sanguíneo e fluidos através da mucosa. O plexo mioentérico, por sua vez, localiza-se entre a camada de músculo circular e

a camada de musculo longitudinal e é responsável pela inervação muscular e controle da motilidade intestinal.

O SNE é formado por várias redes interconectadas ou plexos, com inúmeros gânglios de vários tamanhos, onde no intestino, os dois principais plexos ganglionados são o plexo submucoso e o plexo mioentérico (Figura 1) (FURNESS, 2006). O plexo mioentérico ou de Auerbach (Figura 1) é uma rede de fios nervosos que está localizado entre as camadas muscular longitudinal externa e muscular circular interna, desde o esôfago até o reto, possui três componentes de fibras, o plexo primário, secundário e terciário (FURNESS, 2006). Os gânglios variam de tamanho, forma e orientação entre as espécies de animais e de uma parte do intestino para outra (FURNESS, 2006; SIŞU et al., 2008). Já o plexo submucoso ou de Meissner (Figura 1) é encontrado com mais facilidade nos intestinos delgado e grosso e é dividido em: plexo submucoso interno (plexo de Meissner) situado abaixo da mucosa, plexo submucoso externo (plexo de Shabadash ou de Henle) e plexo intermediário posicionado entre os plexos interno e externo no caso de animais de grande porte, incluindo o homem (FURNESS, 2006). Suas malhas são menores, suas fibras interconectadas são mais finas e o gânglio é menor quando comparadas ao plexo mioentérico (FURNESS, 2006, 2012). Cada plexo possui vários tipos de neurônios que reflexamente controlam as funções gastrintestinais (FURNESS, 2000; SAYEGH; RITTER, 2003).

1.4.1. Neurônios

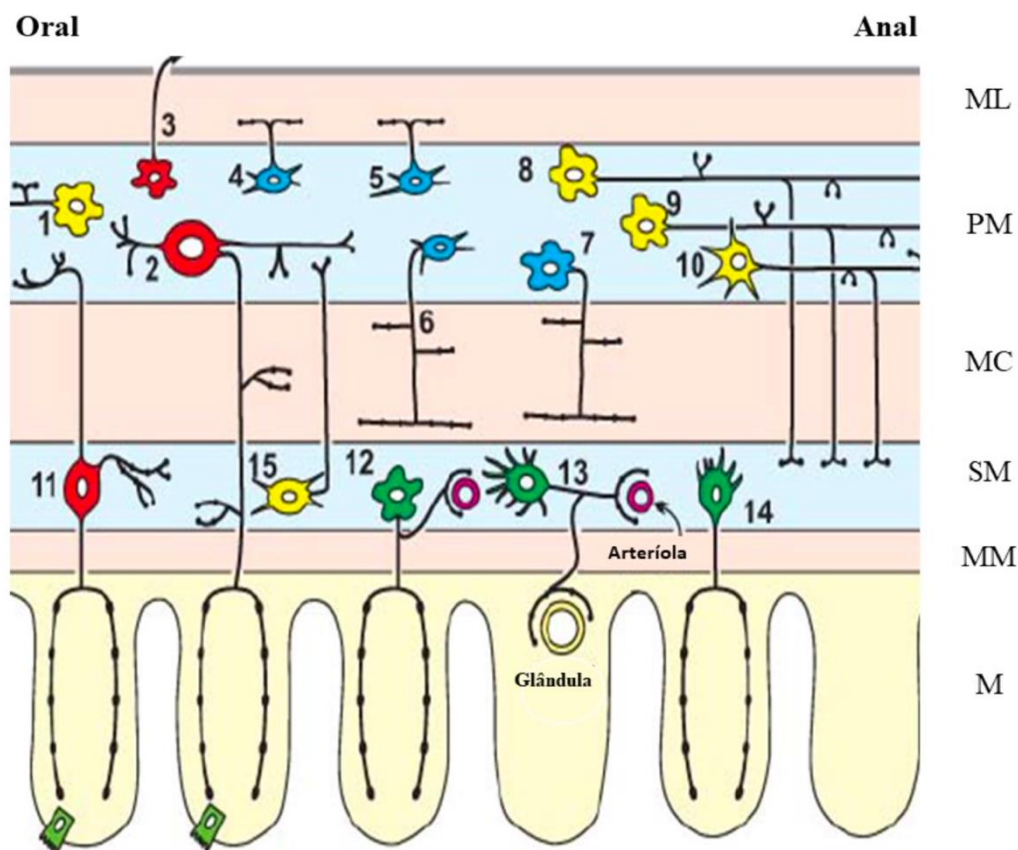
Os neurônios entéricos são classificados por sua morfologia, suas propriedades fisiológicas, coloração histoquímica e imuno-histoquímica específica e outras características distintivas, incluindo as estruturas que inervam, os transmissores que utilizam e as conexões que recebem (FURNESS, 2000). Inúmeros marcadores moleculares ajudam a identificar a heterogeneidade da população neuronal entérica como os neurotransmissores, receptores, proteínas citoesqueléticas, ou enzimas nos neurônios entéricos (FURNESS, 2012).

Furness descreveu dezessete tipos de neurônios entéricos, quatorze foram encontrados no intestino delgado de cobaias (FURNESS, 2000). Os

neurônios entéricos possuem vários papéis como determinar os padrões de movimento do trato gastrointestinal, controlar secreção de ácido gástrico, regular o movimento do fluido através do epitélio de revestimento, alteração do fluxo sanguíneo local, modificar o manuseio de nutrientes e interagir com os sistemas imunológico e endócrino do intestino (FURNESS, 2000, 2006, 2012). Podem ser classificados em neurônios motores, interneurônios e neurônios aferentes intrínsecos primários (IPANs) (FURNESS, 2000, 2006; LOMAX; ZHANG; FURNESS, 2000).

Os neurônios motores podem ser divididos em cinco grupos: neurônios motores excitatórios, neurônios motores inibitórios, neurônios secretomotores/vasodilatadores, neurônios motores que não são vasodilatadores e neurônios motores que inervam células entero-endócrinas (BROOKES, 2001; FURNESS, 2000, p. 199). Os neurônios motores excitatórios e inibitórios da musculatura intestinal encontram-se no plexo mioentérico, estão presentes ao longo de todo o intestino delgado e grosso, e são responsáveis pelo controle da motilidade intestinal (FURNESS, 2006, 2012) Os outros tipos de neurônios motores encontram-se no plexo submucoso e são responsáveis por regular a absorção, secreção e fluxo sanguíneo na mucosa (FURNESS, 2000, 2006).

Figura 2- Tipos de neurônios entéricos presentes no intestino delgado de cobaias e redes de conexões estabelecidas.



Fonte: Adaptado de Furness (2006).

Legenda: (1) Interneurônio ascendente; (2) Neurônio Aferente Primário Intrínseco (IPAN); (3) Neurônio intestínofugal; (4)- Neurônio motor excitatório da camada longitudinal; (5) Neurônio motor inibitório da camada longitudinal; (6)- Neurônio motor excitatórios da camada circular; (7) Neurônio motor inibitório da camada circular; (8) Interneurônio descendente (reflexo local); (9) Interneurônio descendente (reflexo secretomotor); (10) Interneurônio descendente (CMM); (11) IPAN submucoso; (12) Neurônio secretomotor/vasodilatador não colinérgico; (13) Neurônio secretomotor/vasodilatador colinérgico; (14) Neurônio secretomotor colinérgico não vasodilatador; (15) Neurônio uni-axonal que projeta para o plexo mioentérico. ML – Músculo longitudinal; PM – Plexo mioentérico; MC – Músculo circular; SM – Submucosa; MM – Muscular da mucosa; M - mucosa.

Os neurônios excitatórios são imunorreativos à enzima colina acetiltransferase (ChAT) e às enzimas produtoras de taquicininas (STEELE; BROOKES; COSTA, 1991). Os neurônios motores inibitórios, por sua vez, promovem o relaxamento do músculo liso do TGI por meio da secreção de óxido nítrico (NO) e, são imunorreativos à enzima óxido nítrico sintase neuronal

(nNOS), embora o NO não seja o único transmissor dos neurônios motores inibitórios (FURNESS, 2000).

Os neurônios secretomotores/vasodilatadores, presentes no plexo submucoso, estão relacionados a um circuito reflexo local, são responsáveis por regular o equilíbrio hidroeletrólítico e podem ser classificados como neurônios colinérgicos (FURNESS, 2000), que utilizam acetilcolina como neurotransmissor primário, e neurônios não colinérgicos, que utilizam o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) ou outro peptídeo associado como neurotransmissor primário (BANKS et al., 2005; FURNESS, 2000).

Os interneurônios podem ser classificados, de acordo com suas projeções, em ascendentes e descendentes. Interneurônios ascendentes possuem projeções em direção oral, são colinérgicos e estão relacionados aos movimentos de propulsão (FURNESS, 2000). Os interneurônios descendentes possuem projeções em direção anal, e podem ser de três tipos a depender do código químico (imunorreatividade) (FURNESS, 2000). O primeiro tipo está relacionado à motilidade reflexa local e apresenta ChAT, nNOS e VIP como código químico (BROOKES, 2001) e o segundo está relacionado à condução de impulsos mioelétricos no intestino delgado e é imunorreativo à ChAT e à Somatostatina (SOM) (PORTBURY et al., 1995) e o terceiro tipo é imunorreativo à ChAT e à 5-Hidroxitriptamina (5-HT) e está relacionado aos reflexos secretomotores (FURNESS, 2006).

Os IPANs são neurônios sensoriais imunorreativos à ChAT, Calbindina (Calb) e Calretinina (Calr) e estão presentes nos plexos mioentérico e submucoso (FURNESS et al., 2004). São considerados neurônios com morfologia Dogiel tipo II devido à uma classificação proposta por Aleksander S. Dogiel para designar neurônios com corpos celulares grandes e ovoides, de superfície lisa, núcleo excêntrico, que apresentam processos celulares longos, originando-se diretamente do corpo celular ou de um único processo (FURNESS, 2006), e que promovem longas ramificações dentro dos próprios gânglios entéricos (BORNSTEIN et al., 1991; FURNESS et al., 2004). Os IPANs possuem seus axônios projetados para a mucosa e diferem-se dos neurônios motores e interneurônios por suas propriedades fisiológicas (FURNESS et al., 2004).

1.4.2. Código químico

Os neurônios entéricos contêm muitas substâncias que lhes fornecem uma assinatura neuroquímica (FURNESS, 2006). Essas moléculas de assinatura incluem os transmissores primários dos neurônios, as enzimas sintetizadoras dos transmissores, moléculas que têm papéis transmissores ou hormonais em outros locais do corpo, mas não são necessariamente transmissores dos neurônios entéricos que os abrigam e outros marcadores, como proteínas de ligação ao cálcio (FURNESS, 2006).

A PGP 9.5 é uma proteína citoplasmática, específica para neurônios e amplamente distribuída em neurônios centrais e periféricos, bem como em paraneurônios (RODE et al., 1985; THOMPSON et al., 1983; WILSON et al., 1988). Foi originalmente detectada como uma nova proteína específica do cérebro por eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional de alta resolução de extratos de proteínas de órgãos humanos (JACKSON; THOMPSON, 1981). O método imuno-histoquímico usando a proteína é utilizado para visualizar toda a inervação incluindo fibras autonômicas e sensoriais (LUNDBERG et al., 1988).

A acetilcolina (ACh) foi o primeiro dos transmissores excitatórios entéricos a ser descoberto (DALE; FELDBERG, 1934). Ambos os estudos bioquímicos e histoquímicos mostraram a presença da enzima sintetizadora de ACh, colina acetiltransferase em neurônios entéricos (FURNESS; COSTA, 1980; STEELE; BROOKES; COSTA, 1991). No plexo mioentérico, a acetilcolina é o principal transmissor dos neurônios motores musculares excitatórios (FURNESS, 2000) atuando através de receptores muscarínicos para despolarizar o músculo (STEELE; BROOKES; COSTA, 1991). Já no plexo submucoso, existem dois tipos de neurônios secretomotores colinérgicos, os que também contêm NPY (e outros peptídeos) e os que contêm calretinina (FURNESS, 2000). Os neurônios ACh/calretinina inervam preferencialmente as glândulas na base da mucosa e possuem colaterais às arteríolas submucosas, enquanto os neurônios ACh/NPY parecem não inervar as arteríolas (FURNESS, 2000). Os neurônios sensoriais intrínsecos são imunorreativos (IPANs) para taquicininas e ChAT e seus processos varicosos são imunorreativos para o transportador vesicular de acetilcolina assim, suas terminações mucosas podem liberar acetilcolina e taquicininas, ambas as quais causam secreção (LI; FURNESS, 1998).

O óxido nítrico (NO) é produzido tonicamente em condições fisiológicas pela óxido nítrico sintase (NOS) I (NOS neuronal) expressa constitutivamente, e em maiores quantidades durante a inflamação quando a NOS II induzível (NOS indutível) é mobilizada (MONCADA; BOLAÑOS, 2006). A NOS é a enzima sintetizadora do NO, um transmissor primário de neurônios motores musculares inibitórios em todas as espécies de mamíferos (FURNESS, 2006). O óxido nítrico liberado de uma variedade de tipos de células, incluindo neurônios, pode afetar o transporte de íons epiteliais entéricos, agindo diretamente sobre o epitélio e através do plexo submucoso do SNE (MOURAD; TURVILL; FARTHING, 1999; REDDIX et al., 2000). A expressão da sintase de óxido nítrico neuronal em neurônios produtores de óxido nítrico permite que a enzima seja usada como um marcador (BREDT; HWANG; SNYDER, 1990). Mais de 90% dos neurônios imunorreativos para NOS são positivos para VIP no plexo mioentérico (QU et al., 2008).

O peptídeo intestinal vasoativo (VIP) é um peptídeo de 28 aminoácidos caracterizado pela primeira vez em 1970, que foi inicialmente isolado do duodeno suíno e é produzido nos neurônios do sistema nervoso central e periférico (SAID; MUTT, 1970). O VIP está localizado principalmente nos neurônios mioentéricos e submucosos e terminais nervosos no trato GI (COSTA; FURNESS, 1983; LARSSON et al., 1976). Os dois receptores que reconhecem VIP, denominados VPAC1 e VPAC2, por meio desses receptores, o VIP pode mediar um extenso número de funções gastrointestinais, como regulação da secreção de ácido gástrico, secreção intestinal de ânions, liberação de enzimas do pâncreas, motilidade celular, vasodilatação e contratilidade intestinal (HARMAR et al., 2012; PADUA et al., 2016; SHERWOOD; KRUECKL; MCRORY, 2000). No intestino delgado de cobaia, a maioria dos nervos VIP-positivos na mucosa e submucosa são neurônios secretomotores não colinérgicos (SANLIOGLU et al., 2012) e no plexo entérico neurônios inibitórios (FURNESS, 2006).

A calretinina (CR) faz parte da família “EF-Hand” de proteínas de ligação ao cálcio (BAIMBRIDGE; CELIO; ROGERS, 1992). O “EF-Hand” é uma sequência de aminoácidos com uma estrutura tridimensional hélice-alça-hélice característica com alta afinidade para Ca^{2+} (HEIZMANN; BRAUN, 1992). As proteínas de ligação ao cálcio estão envolvidas em inúmeras funções, incluindo sinalização celular, captação e transporte de cálcio, motilidade celular e

tamponamento de cálcio intracelular (ANDRESSEN; BLÜMCKE; CELIO, 1993; SCHWALLER, 2012). No intestino de mamíferos, CR é expressa em neurônios e fibras nervosas do sistema nervoso entérico (SNE) (FURNESS, 2000; MASLIUKOV et al., 2015; TIMMERMANS et al., 1997; WILHELM; LAWRENCE; GÁBRIEL, 2015). Em ratos e camundongos, as células CR-imunorreativas (IR) (CR-IR) representam uma população neuronal heterogênea, incluindo Dogiel tipo I, Dogiel tipo II e neurônios de pequeno a médio porte cujas formas não puderam ser definidas (QU et al., 2008; SAYEGH; RITTER, 2003). A maioria dos neurônios positivos para CR são colinérgicos (SANG; YOUNG, 1996; YOUNG et al., 1998) e a imunorreatividade da NOS e da calretinina quase nunca foram observadas nos mesmos neurônios (QU et al., 2008). Os neurônios imunorreativos a CA podem ser divididos em neurônios calretinina fortemente imunorreativos e neurônios calretinina fracamente imunorreativos. 88% dos neurônios VIP apresentam imunorreatividade fraca à calretinina e nenhum dos neurônios que foram fortemente imunorreativos para calretinina apresentou imunorreatividade VIP, ou seja, são neurônios colinérgicos (MONGARDI FANTAGUZZI et al., 2009).

1.5. Efeitos da retocolite ulcerativa sobre o SNE

Nas últimas décadas, houve um crescente interesse em examinar o sistema nervoso entérico durante a inflamação devido ao desenvolvimento e uso de modelos animais de inflamação (ELSON et al., 1995; MAYER; COLLINS, 2002). Durante a inflamação o SNE sofre algumas mudanças estruturais complexas no SNE nas doenças inflamatórias intestinais (LINDEN et al., 2005; SANOVIC; LAMB; BLENNERHASSETT, 1999).

Há redução do número de neurônios entéricos no colón inflamado que não está restrita às populações neurais específicas, essas mudanças foram observadas tanto no plexo mioentérico de cobaias e camundongos (BOYER et al., 2005; LINDEN et al., 2005), no plexo submucoso de ratos com colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) (SANOVIC; LAMB; BLENNERHASSETT, 1999) e no plexo mioentérico dos pacientes humanos com RCU (BERNARDINI et al., 2012; GEBOES; COLLINS, 1998). Durante a fase inflamatória aguda da RCU induzida por TNBS, os axônios entéricos sofrem um dano inicial seguido pelo brotamento axônico (LOURENSSEN; WELLS;

BLENNERHASSETT, 2005). Também há um aumento geral na densidade de axônios no músculo e na mucosa do intestino inflamado de ratos e cobaias após a inflamação induzida por TNBS (LOURENSSEN; WELLS; BLENNERHASSETT, 2005; NURGALI et al., 2011).

O conteúdo neuroquímico dos neurônios entéricos também muda durante a inflamação, a imunorreatividade para VIP diminui e a substância P (SP) aumenta nos tecidos do cólon de pacientes com DII em comparação com os controles (MAZUMDAR; DAS, 1992; NEUNLIST, 2003; VENTO et al., 2001). Além disso, a imunorreatividade para VIP, NO sintase e neuropeptídeo Y (NPY) aumenta nos tecidos do íleo de pacientes com doença de Crohn em comparação com os controles (BELAI et al., 1997).

Em repouso, os neurônios aferentes primários intrínsecos são praticamente inexcitáveis devido ao seu potencial hiperpolarizante prolongado, o que limita o disparo dos potenciais de ação (FURNESS et al., 2004). A hiperexcitabilidade de IPANs das regiões inflamadas do trato GI foi observada na colite induzida por TNBS em cobaias durante e depois da inflamação (KRAUTER et al., 2007; LINDEN; SHARKEY; MAWE, 2003; LOMAX et al., 2006; LOMAX; FERNANDEZ; SHARKEY, 2005). O aumento da excitabilidade desses neurônios gerou uma redução no AHP (LOMAX et al., 2006; LOMAX; FERNANDEZ; SHARKEY, 2005). A prostaglandina E2, que está elevada durante a colite, reduz o AHP e foi identificada como um possível mediador do aumento da excitabilidade do neurônio entérico (LINDEN et al., 2004; MANNING; SHARKEY; MAWE, 2002).

Outro efeito importante da colite é que ela altera a liberação de neurotransmissores entéricos bem como a resposta do tecido efetor a esses neurotransmissores (SANOVIC; LAMB; BLENNERHASSETT, 1999). A transmissão neuromuscular purinérgica para o músculo liso vascular e circular é reduzida durante a colite experimental em camundongos e ratos (ANTONIOLI et al., 2010; LOMAX et al., 2007; NESHAT et al., 2009). Estudos de arteríolas de pacientes com DII demonstraram que a inflamação prejudica a vasodilatação dependente do endotélio devido ao dano dos radicais livres às células endoteliais (HATOUM et al., 2003; MORI et al., 2005). Da mesma forma, a resposta secretora do epitélio aos neurotransmissores entéricos é inibida durante a colite devido aos efeitos dos radicais livres nas células epiteliais (ASFAHA et al., 1999).

1.6. Efeitos da dieta sobre o SNE

O impacto funcional das alterações no fenótipo e na atividade do sistema nervoso entérico induzidas por nutrientes não é tão claro, mas provavelmente serve para ajustar a motilidade, secreção e fluxo sanguíneo à presença de alimento no lúmen (NEUNLIST; SCHEMANN, 2014).

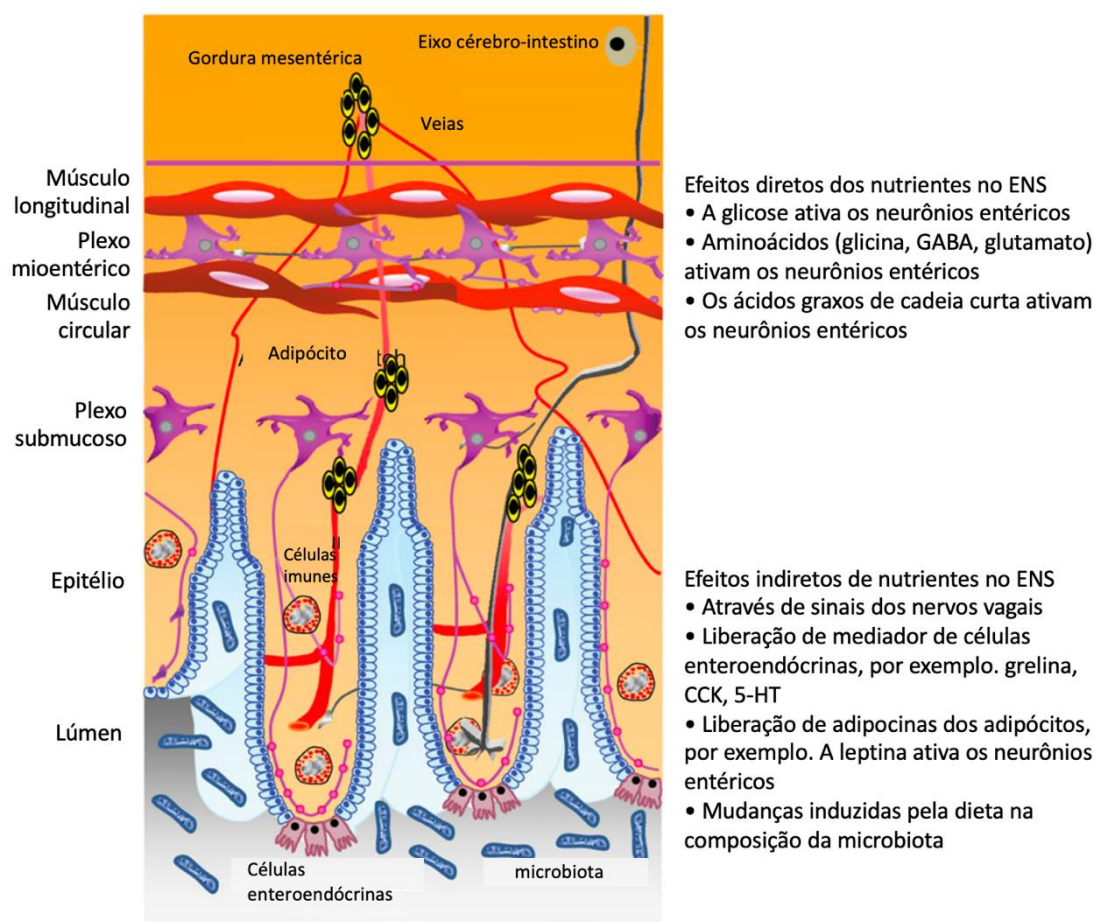
O aumento progressivo da quantidade de gorduras, proteínas e carboidratos leva ao aumento do número de enzimas para facilitar a digestão mais eficiente (BRANNON, 1990). Uma refeição com alto teor de açúcar pode fazer com que novos transportadores de glicose sejam ativados, permitindo uma absorção mais eficiente (YOUNG et al., 2013). Os nutrientes regulam a secreção da mucosa através das vias do SNE, como pela capacidade da glicose de aumentar a taxa de secreção de íons de sódio e cloreto (SEE; BASS, 1993). A excitação dos neurônios mioentéricos induzida pela glicose foi mediada pela inibição dos canais de potássio sensíveis ao ATP, que foi semelhante às propriedades e comportamento dos neurônios glucorresponsivos no hipotálamo ventromedial e células β pancreáticas sensíveis à glicose (LIU; SEINO; KIRCHGESSNER, 1999).

A aplicação direta dos aminoácidos GABA, glutamato ou glicina aumentou a excitabilidade em neurônios entéricos (Figura 3) (CHERUBINI; NORTH, 1984; LIU et al., 1997; NEUNLIST et al., 2001). Com relação ao glutamato, um estudo não mostrou efeito do glutamato ou agonistas de receptores na excitabilidade do neurônio entérico (WANG et al., 2014). Embora o glutamato e o GABA sejam sintetizados por neurônios entéricos, não se sabe até que ponto suas ações podem refletir uma resposta aos aminoácidos da dieta (NEUNLIST; SCHEMANN, 2014).

O nível de fibra não digerível ou oligossacarídeos na dieta também pode alterar as proporções relativas de bactérias no intestino e alterar o comportamento intestinal (Figura 3) (HALMOS et al., 2014, 2015). Acredita-se que um microbioma intestinal alterado seja um regulador independente da função intestinal e tenha sido associado à obesidade e outras doenças, como inflamação de baixo grau do trato GI (ARRIETA et al., 2014). A aplicação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) como acetato, propionato ou butirato na mucosa do cólon induziu a atividade peristáltica ou aumentou o tempo de trânsito através da ativação das vias do SNE (GRIDER; PILAND, 2007; SUPPLY et al.,

2012). Os AGCC também podem aumentar a secreção de cloreto no cólon e no intestino delgado, em parte por meio de vias entéricas mediadas neuralmente (DIENER; VUJICIC; SCHARRER, 1996; YAJIMA, 1988). A estimulação química da mucosa por AGCCs evocou a descarga do potencial de ação em neurônios entéricos através de mediadores liberados pelas células enteroendócrinas (EEC) (BERTRAND et al., 1997; KUNZE; BORNSTEIN; FURNESS, 1995). A aplicação do butirato em neurônios mioentéricos de cobaias evocou uma resposta bifásica consistindo inicialmente de uma descarga de pico aumentada seguida por uma hiperpolarização transitória (NEUNLIST; DOBREVA; SCHEMANN, 1999).

Figura 3 - As bases celulares e moleculares para efeitos diretos e indiretos de nutrientes em neurônios entéricos.



Fonte: Neunlist e Schemann (2014).

A administração crônica de uma dieta suplementada com amido resistente aumentou a produção de butirato no cólon, levando a alterações neuroplásticas em neurônios mioentéricos caracterizadas por um aumento na proporção de

neurônios colinérgicos sem alteração na população nitrérgica (SORET et al., 2010). Além disso, doses diárias de butirato em filhotes de ratos entre os dias 7 e 17 pós-natais aumentou a proporção de neurônios colinérgicos e, em contraste com animais adultos, também a proporção de neurônios nitrérgicos, o que sugeriu alterações neuroplásticas dependentes da idade induzidas pelo butirato (SUPLY et al., 2012). Isso foi associado a uma amplitude aumentada de respostas musculares mediadas por colinérgicos e nitrérgicos e, novamente, um tempo de trânsito colônico distal mais lento (SUPLY et al., 2012).

As gorduras podem afetar negativamente a sobrevivência dos neurônios entéricos, camundongos adultos e ratos alimentados com dietas ricas em gordura sofrem perda de neurônios mioentéricos ileais e colônicos, sendo associado ao trânsito intestinal atrasado (NEZAMI et al., 2014; VOSS et al., 2013). A administração de ácidos graxos poliinsaturados ω -3 (PUFAs) a porcas grávidas e leitões aumentou a proporção de neurônios colinérgicos, envolvendo metabólitos de PUFA, como o ácido eicosapentaenóico, e aumentou a mucosa paracelular mediada colinergicamente permeabilidade (DE QUELEN et al., 2011).

Mudar drasticamente o teor dos macronutrientes de uma dieta pode gerar algumas mudanças no trato gastrointestinal, a proporção de carboidratos, proteínas e gorduras pode ser alterada de acordo com as decisões pessoais ou com o aconselhamento de um nutricionista e para continuar processando os nutrientes da dieta alterada o intestino sofre algumas alterações em seus mecanismos de processamento (NEUNLIST; SCHEMANN, 2014). Portanto, devido a essas adaptações que o TGI sofre de acordo com a mudança da composição e teor de macronutrientes da dieta, é provável que o SNE detecte essas mudanças levando a algumas adaptações nos seus programas motores e secretores (NEUNLIST; SCHEMANN, 2014).

Metodologia

Este projeto foi submetido à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) previamente à realização dos experimentos (ofício 046/2020).

1. Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6 machos (20-25 g) provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da UNICAMP. Durante o experimento, os animais foram mantidos em caixas de polietileno padrão (30x19x12cm, Insight®), forradas com maravalha, com lotação máxima de 5 animais por caixa, no biotério setorial do Departamento de Histologia da Universidade Estadual de Londrina, com controle de temperatura entre 21 e 24°C e alternância de ciclos claro-escuro de 12 horas.

2. Dietas e Grupos Experimentais

Foi realizada análise bromatológica da ração para roedores comercializada pela NUVILAB® (22% de proteína) e as porcentagens de macro e micronutriente obtidas foram utilizadas como base para o preparo de duas dietas experimentais, uma com a mesma quantidade de proteína da ração comercial (Tabela 1) e outra com o dobro da quantidade de proteínas em relação à ração comercial (44% de proteína) (Tabela 1). Ambas as dietas eram isocalóricas para evitar a influência do nível de calorias nos parâmetros que serão avaliados. Para indução da RCU experimental, camundongos foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) dissolvido a 3% durante sete dias.

Tabela 1. Composição de dietas experimentais. SD - Dieta padrão (22% proteína); HP - Dieta de hiperproteína (44% de proteína).

	DP	HP
Ingredientes, g/kg		
Fibra	70	70
Carboidrato	735	515
Gordura	45	45
Proteína	220	440
Energia metabolizavel	3.976Mcal/kg	3.976Mcal/kg

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: 1) Grupo DP: animais que receberam DP por 7 dias sem serem submetidos ao protocolo de indução de RCU experimental (eutanásia no 7º dia de experimento). 2) Grupo DHP: animais que receberam DHP por 7 dias sem serem submetidos ao

protocolo de indução de RCU experimental (eutanásia no 7º dia de experimento). 3) Grupo DP/DSS: animais que receberam DP durante o período de indução de RCU experimental (eutanásia no 7º dia de experimento). 4) Grupo DHP/DSS: animais que receberam DHP durante o período de indução de RCU experimental (eutanásia no 7º dia de experimento). Um total de 48 camundongos foram utilizados para a realização deste protocolo experimental, sendo: 24 para análise histopatológica da parede intestinal e análise de estresse oxidativo no tecido colônico (n=6/grupo); e, por fim, 24 para análise de neurônios entéricos por intermédio da técnica de imunofluorescência em preparados totais e em cortes histológicos (n=6/grupo).

3. Avaliação clínica dos animais

Foi realizado o acompanhamento diário da massa corporal dos animais, da taxa de ingestão das dietas e do consumo de água. A análise do fenótipo das fezes foi realizada durante todo o período experimental. Foi verificado o número de pellets expelidos por animal a cada 24 horas e a massa úmida e seca das fezes para determinação da porcentagem de água. Os pellets foram mensurados quanto ao seu comprimento e espessura e foi verificada a presença de sangue oculto. O índice de atividade da doença (DAI) foi avaliado pela porcentagem de perda de peso, consistência das fezes e presença de sangue nas fezes. Para cada parâmetro, foi utilizada uma escala de 0 a 4 fazendo com que o DAI total seja até 12 (LAFFIN, M., *et al.*, 2019).

4. Eutanásia e coleta de material

Após o período experimental (7 ou 14 dias), ou apresentarem uma perda de massa corporal superior a 18%, os camundongos foram submetidos à eutanásia por inalação de isoflurano seguida perfusão. Em seguida, o íleo foi coletado, pesado e mensurado quanto ao seu comprimento e circunferência.

5. Estresse oxidativo

Após a coleta, a porção proximal do íleo foi homogeneizada durante 1 minuto com tampão fosfato 1,15% (5mL por grama de tecido). O sobrenadante

foi coletado, pipetado em eppendorfs e armazenado em -80 °C. Com auxílio do espectrofotômetro foi realizada a quantificação de proteína carboniladas (PCs) (STOCKS; DORMANDY, 1971), de superóxido dismutase (SOD) (MISRA; FRIDOVICH, 1972) e glutatona reduzida (MILLS, 1957).

6. Análise Histopatológica

Segmentos de 1 cm da porção final íleo foram coletados, fixados em paraformaldeído 4% pH 7,4 (3 horas, temperatura ambiente) e submetidos à rotina de processamento histológico para a confecção de cortes longitudinais corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Foi determinada também a espessura da parede intestinal total e de suas camadas, incluindo também a profundidade das criptas intestinais e altura de enterócitos. Para cada parâmetro, foram feitas 50 medidas em 10 cortes semiseriados de cada animal/grupo.

7. Avaliação de neurônios entéricos

Para imunofluorescência em cortes, segmentos do íleo foram fixados em PFA 4% e depois mantidos em PBSazida 0,5%. Para imunofluorescência em preparados totais, o íleo foi coletado, fixado em PFA 4% e posteriormente microdissecado com auxílio de um estereomicroscópio para a obtenção de dois tipos de preparados totais: um contendo a camada muscular, incluindo o plexo mioentérico (PM), e outro contendo a camada submucosa, incluindo o plexo submucoso (PS).

Os cortes e preparados totais foram utilizados para a realização do protocolo de imunofluorescência para evidenciação da população geral (PGP9.5⁺). As subpopulações neuronais do plexo mioentérico foram divididas em nitrérgica⁺ (PGP9.5/nNOS⁺), nitrérgica⁻ (PGP9.5/nNOS⁻) e no plexo submucoso em calretinina com fraca (PGP9.5/Calr⁺) e forte (PGP9.5/Calr⁺⁺) imunorreatividade (IR) para Calretinina (Calr) (Tabela 2). Foi estimado que 88% dos neurônios VIP apresentam imunorreatividade fraca à calretinina e nenhum dos neurônios que foram fortemente imunorreativos para calretinina apresentou imunorreatividade VIP, ou seja, são neurônios colinérgicos (MONGARDI FANTAGUZZI et al., 2009).

Tabela 2. Anticorpos primários e secundários utilizados em imunoreações para PGP9.5, nNOS e Calr.

Anticorpo	Espécie	Diluição	Companhia
PGP9.5 (primário)	Coelho	1:1000	Invitrogen
nNOS (primário)	Cabra	1:500	Biotecnologia de Santa Cruz
Calr (primário)	Cabra	1:1200	Merck millipori
IgG anti-coelho (secundário)	Burro	1:500	Invitrogen
IgG anti-cabra (secundário)	Burro	1:500	Biotecnology de Santa Cruz

PGP9.5 – Marcador populacional geral de neurônios; nNOS – População de neurônios nitérgicos; Calr – População de neurônios positivos para Calretinin

As quantificações de todas as populações e subpopulações neuronais foram realizadas na porção final do íleo dos preparados totais. Em ambos os plexos, para análise da densidade populacional de neurônios entéricos foram capturadas 32 imagens/animal na objetiva de 20x. Além disso, um total de 100 corpos celulares de neurônios/animal foi mensurado utilizando-se o software ImageJ.

8. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Dados com distribuição normal foram comparados pelo teste anova two-way seguido do pós test de Tukey. Dados com distribuição livre foram comparados pelo teste Kruskall-Wallis seguido pelo teste de Dunn. As análises estatísticas foram realizadas usando um software estatístico, considerando $p < 0,05$.

2. ARTIGO CIENTÍFICO

Este artigo será submetido ao Periódico Life Sciences (ISSN: 0024-3205), Fator de Impacto: 6.78, o qual é classificado como B1 no atual Qualis/CAPES área Medicina I. As instruções para autores deste periódico estão disponíveis no link: <https://www.elsevier.com/journals/life-sciences/0024-3205/guide-for-authors>.

Effects of high protein diet and induced-DSS ulcerative colitis on the ileum of mice

V. B. R. Coronado^a; C. C. A. Machado^a; G.B.C. Sodré^a; L.S. Bonassa^a; A. Oba^b; F. A. Guarnier^c; E. J. A. Araújo^a.

- a. Department of Histology, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil
- b. Department of Zootechnics, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil
- c. Department of Pathologic Science, State University of Londrina, Paraná, Brazil

Address for correspondence

Prof. Eduardo José de Almeida Araújo
Department of Histology, State University of Londrina
Rodovia Celso Garcia Cid PR 445, Km 380, 86051-990, Londrina, PR, Brazil

Tel: +55 (43) 3371 4327

ejaaraujo@gmail.com

Abstract

Aim: to investigate whether a high-protein diet (\uparrow 50%) interferes the inflammatory process during the acute phase of ulcerative colitis (UC), and, consequently, the structure of the enteric nervous system (ENS). **Main methods:** C57BL/6 male mice were assigned into four experimental groups using sodium dextran sulfate (DSS) as UC inducer: SD (standard diet), HP (high-protein diet), DP/DSS (standard diet and DSS 3%) and HP/DSS (high protein diet and DSS 3%). The body mass, stool consistency and presence of blood in the stools were checked daily in order to calculate the disease activity index (DAI). Segments of the ileum were submitted to histopathological analysis in cross sections stained with hematoxylin and eosin. Besides, whole-mounted preparations were submitted to immunofluorescence technique to evidence the general neuronal population (PGP9.5) and specific subpopulations in the submucosal and myenteric plexi. Normally distributed data were compared by two-way ANOVA test followed by Tukey's post-test. Freely distributed data were compared using the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test. **Key findings:** Experimental UC altered the size of ENS neurons and caused histopathological damage in the ileum. A high-protein diet exerted a negative influence on clinical signs and also on the conversion of superoxide radical into hydrogen peroxide during the acute phase of experimental UC. In addition, the high-protein diet intensified neuronal changes but did not influence the histopathological damage caused by ileitis.

Key words: enteric nervous system; inflammatory bowel disease; diet; high protein; ulcerative colitis

Introduction

Ulcerative colitis (UC) is one of the inflammatory bowel diseases (IBD), which affects the rectum, colon and terminal part of the ileum (1). Its pathophysiology consists of an increase in intestinal permeability, which favors the translocation of bacterial antigens from the lumen to the lamina propria, with consequent abnormal activation of immune cells and increased production of pro-inflammatory cytokines (2–4). Furthermore, phenotypic and functional alterations in the enteric nervous system (ENS) and changes in the extrinsic innervation of the gastrointestinal tract (GIT) play an important role in the generation of signs and symptoms of IBD (5,6) .

UC is associated with significant changes in small bowel function, which has been demonstrated both in patients and in experimental animal models (7,8). These abnormalities occur due to a decrease in intestinal fluid, amino acids, in the absorption of D-Xylose and fats, however, the pathophysiology of this phenomenon has not been well elucidated (9). Alterations in the function and structure of the intestinal innervation can affect distant intestinal areas, probably by stimulating immunological mechanisms that can contribute to the spread of inflammation to various parts of the gastrointestinal tract (8).

The factors that trigger the emergence of IBD are unknown, but it is known that genetic predisposition, exogenous and endogenous triggers can lead to its development. This may include environmental and immunological factors, infectious agents, microbiome, lifestyle and the diet (13,14). Some studies have shown the role of diet in the exacerbation or prevention of IBD (15,16), since the intestinal microbiota can vary as changes in diet occur (17).

Epidemiological studies demonstrate an increase in the incidence of UC in populations adhering to a high-protein diet (18). It is known that excessive consumption of proteins can cause changes in intestinal homeostasis due to changes in the production of microbial metabolites (19), increased intestinal permeability (20), variations in the luminal environment (21), changes in the morphology of epithelial cells (22) and exacerbation of acute inflammation in the colon (23,24).

The British Society of Gastroenterology advises that the diet of patients with IBD should be based on local healthy eating guidelines and include a wide variety of fruits and vegetables, cereals, grains, nuts and seeds, high protein

foods with moderation/reduced high fat content, particularly animal fat, high sugar content and processed meats, but there are no recommendations regarding macronutrient levels for patients with UC (25). The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism recommends increasing protein intake in active IBD to 1.2–1.5 g/kg body weight/day in adults and maintaining a level similar to that recommended for the general population during remission (about 1 g/kg of body weight/day) (26).

The effects of a high-protein diet on UC are not well established. We know that the protein content present in the diet is essential to worsen or improve inflammation, as well as the type of protein and amino acids used in supplementation (16,20,27). On this way, it is important to highlight that there several evidences that shown that nutrients can also trigger changes in the ENS phenotype and function (28,29). However, to date, little is known about the modulatory role of a high-protein diet on enteric neuron function during acute UC. Thus, this study aimed to investigate whether this type of diet increases the vulnerability of the ileum during the acute phase of UC, as well as intensifies the inflammatory process and possible changes in the ENS.

Material and methods

The project was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the State University of Londrina (CEUA/UEL) (protocol 046/2020).

1. Animals

Mice (*Mus musculus*) (20-25g) from the Multidisciplinary Center for Biological Research in the Area of Science in Laboratory Animals (CEMIB) at UNICAMP/Brazil were used. During the experiment, the animals were kept in standard polyethylene boxes (30x19x12cm, Insight[®]), lined with wood shavings, with a maximum capacity of 5 animals per box, in the animal house of the Department of Histology at the State University of Londrina, Brazil, under temperature control between 21 and 24°C and alternating light-dark cycles of 12 hours.

2. Diets and Experimental Groups

A bromatological analysis was performed on the commercial diet for rodents (NUVILAB®) and the percentages of macro and micronutrient obtained were used as a basis for the preparation of two experimental diets, one with the same amount of protein (22%) as the commercial chow (Table 1) and another with twice the amount of protein compared to commercial chow (44% protein) (Table 1). Both diets were isocaloric to avoid the influence of the calorie level on the parameters that will be evaluated. For induction of experimental UC, mice were kept in cages with free access to drinking water containing 3% dextran sulfate sodium (DSS) for seven days.

	SD	HP
Ingredients, g/kg		
Fiber	70	70
Carbohydrate	735	515
Fat	45	45
Protein	220	440
Metabolizable energy	3,976 Mcal/kg	3,976 Mcal/kg

Table 1. Composition of experimental diets. SD: standard diet (22% protein); HPD: Hyperprotein diet (44% protein).

The animals were assigned into four experimental groups: 1) SD group: animals that received SD for 7 days and no submitted to the experimental UC induction protocol (euthanasia on the day 7 of the experiment); 2) HPD group: animals that received HPD for 7 days without being submitted to the experimental UC induction protocol (euthanasia on the day 7 of the experiment); 3) SD/DSS group: animals that received SD during the experimental UC induction period (euthanasia on day 7 of the experiment); 4) HPD/DSS group: animals that received HPD during the experimental UC induction period (euthanasia on day 7 of the experiment). A total of 48 mice were used to carry out this experimental protocol, as follows: 24 for histopathological analysis of the intestinal wall and analysis of oxidative stress in the colonic tissue (n=6/group); and, finally, 24 for the analysis of enteric neurons through the immunofluorescence technique in total preparations and in histological sections (n=6/group).

3. Clinical evaluation

Daily monitoring of the animals' body mass, diet intake rate and water consumption was performed. The analysis of the feces phenotype was performed throughout the experimental period. The number of pellets expelled per animal every 24 hours and the wet and dry mass of feces were verified to determine the percentage of water present in the feces. The pellets were measured for their length and thickness and the presence of blood was verified. The disease activity index (DAI) was evaluated by the percentage of weight loss, stool consistency and presence of blood in the stool. For each parameter, a scale from 0 to 4 was used, making the total DAI up to 12 (27).

4. Euthanasia and tissue harvest

After the experimental period (7 or 14 days), or when the body mass loss reached over than 18%, the mice were euthanized by isoflurane inhalation followed by perfusion. Then, the ileum was collected, weighed, and measured in terms of length and circumference.

5. Oxidative stress

After collection, the proximal portion of the ileum was homogenized for 1 minute with 1.15% phosphate buffer (5mL per gram of tissue). The supernatant was collected, pipetted into eppendorf's and stored at -80 °C. With the aid of a spectrophotometer, the quantification of carbonyl proteins (PCs) (30), superoxide dismutase (SOD) (31) and reduced glutathione (32) were performed.

6. Histopathological Analysis

One centimeter segments of the final ileum portion were collected, fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) pH 7.4 (3 hours, room temperature) and submitted to routine histological processing to make longitudinal sections stained with Hematoxylin and Eosin (HE). The thickness of the total intestinal wall and its layers was also determined, including the depth of the intestinal crypts and the height of enterocytes. For each parameter, 50 measurements were made in 10 semi-serial sections of each animal/group.

7. Evaluation of enteric neurons

For immunofluorescence in sections, segments of the ileum were fixed in 4% PFA and then maintained in 0.5% PBSazide. For immunofluorescence in total preparations, the ileum was collected, fixed in 4% PFA and subsequently micro dissected with the aid of a stereomicroscope to obtain two types of total preparations: one containing the muscular layer, including the myenteric plexus (MP), and the other containing the submucosal layer, including the submucosal plexus (SP).

The sections and total preparations were used to carry out the immunofluorescence protocol for evidence of the general population (PGP9.5⁺). The neuronal subpopulations of the myenteric plexus were divided into nitrenergic immunoreactive (PGP9.5/nNOS⁺) and nitrenergic non-reactive (PGP9.5/nNOS⁻) and submucosal plexus into calretinin with weak (PGP9.5/Calr⁺) and strong (PGP9.5/Calr⁺⁺) immunoreactivity (IR) for Calretinin (Calr) (Table 2). It was estimated that 88% of VIP neurons show weak immunoreactivity to calretinin and none of the neurons that were strongly immunoreactive to calretinin showed VIP immunoreactivity, that is, they are cholinergic neurons (31).

Antibody	Host	Dilution	Company
PGP9.5 (primary)	Rabbit	1:1000	invitrogen
nNOS (primary)	goat	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Calr (primary)	goat	1:1200	Merck Millipor
Anti-rabbit IgG (secondary)	Donkey	1:500	invitrogen
Anti-goat IgG (secondary)	Donkey	1:500	Santa Cruz Biotechnology

Table 2. Primary and secondary antibodies used in immunoreactions for PGP9.5⁺, nNOS and Calr. PGP9.5 – General neuron population marker; nNOS – Population of nitrenergic neurons; Calr – Population of neurons positive for Calretinin

Quantifications of all neuronal populations and subpopulations were performed in the final portion of the ileum of the total preparations. In both plexi, to analyze the population density of enteric neurons, 32 images/animal were captured in the 20x objective. In addition, a total of 100 neuron/animal cell bodies were measured using ImageJ software.

8. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean. Normally distributed data were compared by the two-way ANOVA test followed by the Tukey posttest. Data with free distribution were compared by the test Kruskal-Wallis followed by Dunn's test. Statistical analyzes were performed using statistical software, considering $p < 0.05$.

Results and discussion

In the present study, we observed that a high-protein diet exerted a negative influence on clinical signs during the acute phase of experimental UC and may influence neuronal changes in the ENS of the ileum of mice exposed to DSS.

High protein diet enhances the disease activity index

The results related to DAI demonstrated that DSS caused the appearance of clinical signs characteristic of mice with ulcerative colitis. All mice exposed to DSS showed a progressive increase in the DAI until reaching score values greater than 8 (eight) on the 7th day of exposure (Figure 1). In addition, mice exposed to DSS and fed a high-protein diet presented a DAI even higher than mice fed a standard diet ($P < 0.05$) (Figure 1). This result was similar to that obtained in another study that compared a standard diet (14% protein) with a high protein diet (53% protein) in C57BL/6 mice induced to inflammation with a DSS of 3.5% (24).

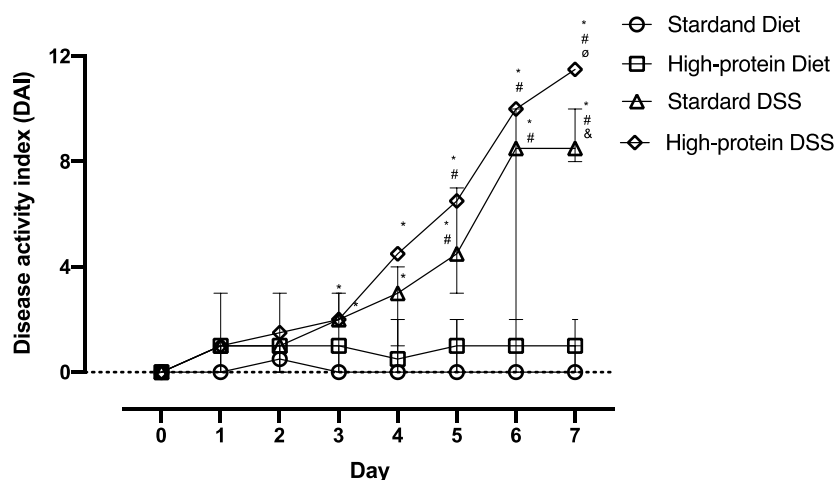


Figure 1. Disease Activity Index (DAI). Mice were fed Standard, High Protein, Standard with DSS in water and High Protein with DSS in water. Results were expressed as means and SD ($n = 6$) and analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's test. * = $P < 0.05$ compared to standard diet group; # = $P < 0.05$

compared to high protein diet group; $\emptyset = P < 0.05$ compared to standard diet DSS group; $\& = P < 0.05$ compared to high protein diet DSS group.

We know that diet can contribute to intestinal inflammation through changes in the composition of the intestinal microbiota, increased exposure of antigens and changes in intestinal permeability (33,34). There seems to be a relationship between protein intake and IBD, and there is some evidence of the participation of intestinal bacteria on this process (33). Gut bacterial communities are influenced by dietary proteins, specifically their concentration and source (34). Concentration is a primary factor that affects protein fermentation (36) and depending on the protein source in the diet, the availability to the microbiota may vary, thus providing different amounts of substrate for bacterial proliferation and metabolic activity (37). Normally, the inflamed mucosa of patients with UC has less Firmicutes and more Proteobacteria (38–40), which characterizes dysbiosis.

When fermenting proteins, proteobacteria generate some metabolites that are toxic, such as hydrogen sulfide (H₂S), ammonia and indole compounds, which have negative effects on the health of the host (41–43). H₂S is an extremely toxic agent (21), which is produced in the colonic lumen by the action of sulfate-reducing bacteria (SRB) on dietary and mucinous sulfate and sulfur amino acids such as methionine, cystine, cysteine and taurine (44,45). H₂S, in turn, hinders butyrate oxidation, which has been associated with mucosal hyperproliferation in UC (46,47) and increased disease activity (48). Butyrate is one of the short-chain fatty acids (SCFAs) produced by intestinal bacteria, which stands out as the main source of energy for the colonic mucosa (49). The effects of protein-rich diets occur quickly, with rapid changes in the microbiota and in the metabolites observed within 24 hours, both in experimental animals and in humans (17,50). Thus, we suggest that the higher DAI found in inflamed mice that received a high-protein diet may have been due to an alteration in the intestinal microbiota of these animals.

Oxidative stress indicates tissue damage in the ileum

There was no significant difference between the groups regarding the concentration of GSH (Figure 2 – B) and carbonyl proteins (Figure 2 – C). The amount of the enzyme superoxide dismutase was significantly higher in the group of animals that received the standard diet and were exposed to DSS ($P < 0.05$)

(Figure 2 – A). In the group that simultaneously received the high-protein diet and were exposed to DSS, there was no significant difference when compared to the groups that received the standard and high-protein diet.

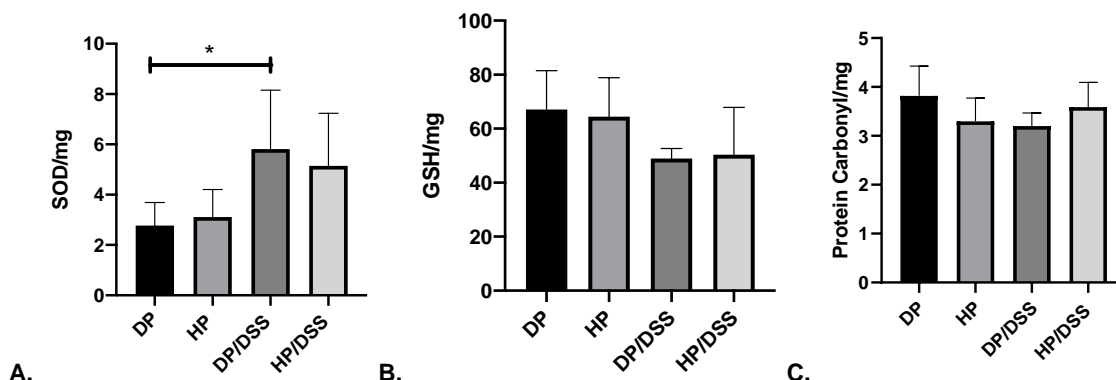


Figure 2. A – Amount of superoxide dismutase (SOD); B – Amount of glutathione peroxidase per animal; C – Amount of carbonyl protein. Mice were fed Standard, High Protein, Standard with DSS in water and High Protein with DSS in water. Results were expressed as means (n = 6) and analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's test. *P < 0.05.

In UC, ROS production overloads the endogenous antioxidant system, resulting in oxidative stress and consequent intestinal lesions (51). SOD has the role of converting the superoxide radical into hydrogen peroxide (52) and presents a pattern of positive correlation with the severity of the disease (53,54). Therefore, the high levels of SOD in the group of animals exposed to DSS indicates that there was probably an increase in ROS and, consequently, tissue damage in the ileum of mice.

Due to the role of modulating ROS levels in the intestine, the dysregulated expression of SOD leads to the worsening of IBD symptoms (55). Recent work has shown that *SOD1 knockout mice* exhibited greater susceptibility to DSS-induced colitis and that oral administration of SOD could improve the disease phenotype (55). As we did not observe a significant difference between the HP and HP/DSS groups, we suggest that the high-protein diet, through changes in the intestinal microbiota, negatively interferes with SOD expression and that this is associated with worsening of the clinical signs of the disease.

High protein diet does not interfere with the histopathological damage caused by ileitis

In recent years, researchers have observed that DSS also affects the integrity of the ileum (7,56–59). In the present study, histopathological analysis

(Figure 4) showed that DSS-induced inflammation caused a significant reduction in submucosal thickness (12.5%) (Figure 4. D.), intravillar mucosa (50.5%) (Figure 4. H.), villi height (29%) (Figure 4. I.) and ileal enterocytes (6.18%) (Figure 4. J.) ($p < 0.05$). Some studies have evaluated the effects of DSS on mucosal integrity throughout the gastrointestinal tract and have found extensive mucosal necrosis and granulocyte infiltration in the small intestine of rats and mice that received DSS (57,60) .

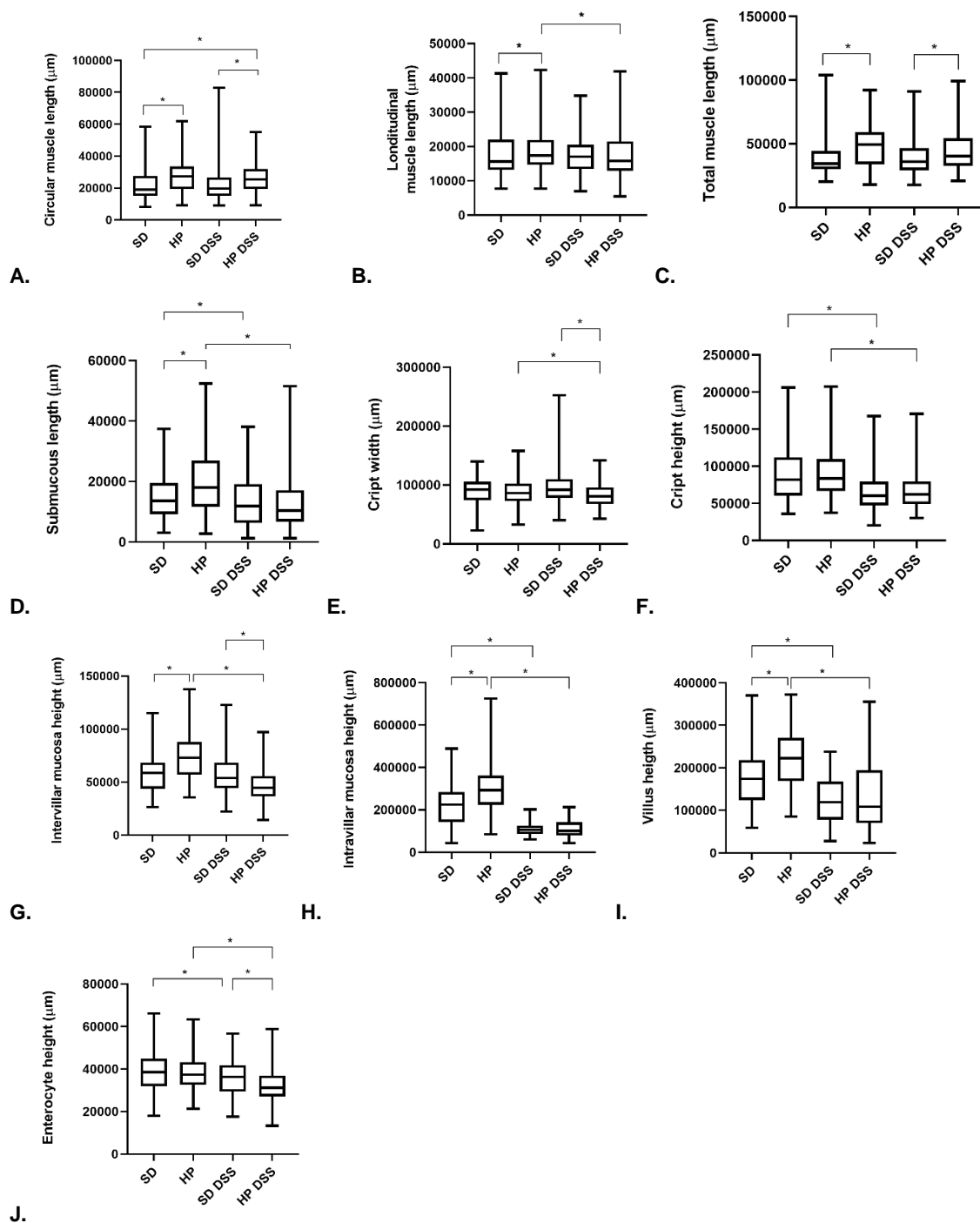


Figure 4. Histology of the ileum of mice fed standard, high-protein, standard with DSS and high-protein diets with DSS. Results were expressed as median (n = 5) and analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by the Duun's test. A – Circular Muscle layer; B – Longitudinal muscle layer; C – Total Muscle; D – Submucosal; E – Crypt width; F – Crypt height; G – Intervillar mucosa; H – Intravillar mucosa; I – Villus height; J – Enterocyte height. * = P<0,05.

The histopathological changes in the ileum during inflammation vary between different studies in the literature, which may be related to the species studied (57,60), sex (61) and model of induction of intestinal inflammation (62). A histopathological evaluation of the small intestine of rats undergoing colitis induced with iodoacetamide (62) or 2% DSS (7) showed no overt signs of inflammation. In the present study, we observed that DSS altered the structure of the ileum in C57BL/6 mice, but it is still unclear whether these changes are due to a direct DSS-mediated effect or a compensatory response secondary to damage in the colon. Furthermore, the decrease in enterocyte height in mice exposed to DSS indicates a possible change in immune system activity as enterocytes are involved in amino acid catabolism and play key roles in innate and adaptive immunity with modulation of intestinal barrier function (63).

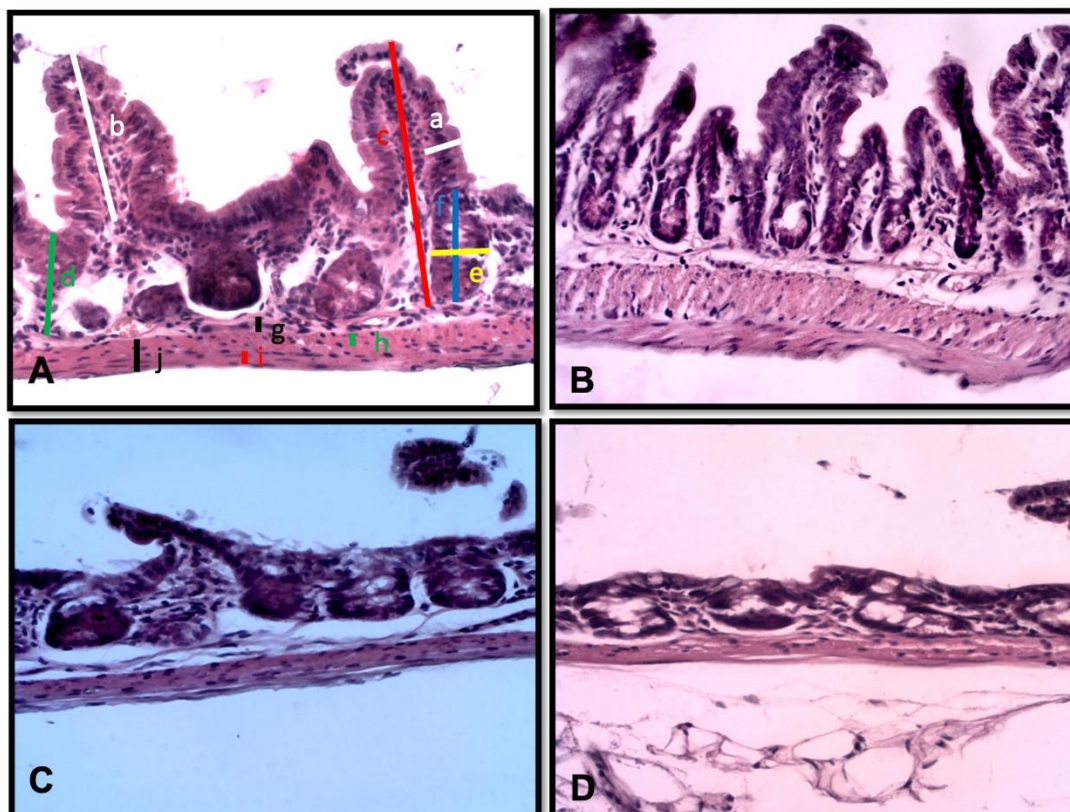


Figure 3. Photomicrograph of mouse ileum sections stained with Hematoxylin and Eosin from Standard and DSS groups (20x objective) (A – Animals that received a standard diet without inducing colitis with DSS; B – Animals that received high-protein diet without colitis induction with DSS; C – Animals that received the standard diet and DSS 3%; D – Animals that received a high-protein diet and DSS 3%). a – Enterocyte height; b – Villus height; c – Intravillar mucosa thickness; d – Intervillar mucosa thickness; e – Submucosal

layer; f – Crypt width; g – Crypt deep; h – Circular Muscle layer; i – Longitudinal muscle layer; j – Total muscle layer. * = $P < 0,05$.

We also observed that the animals fed a high-protein diet had a significant increase ($P > 0,05$) (Figure 4) in the thickness of the circular (21.4%) (Figure 4. A.), longitudinal (2.1%) (Figure 4. B.) and total muscular layer of the submucosa (31.7%) (Figure 4. C.), intervillar mucosa (25.07 %) (Figure 4. G.) and intravillar mucosa (35.3%) (Figure 4. H.), as well as in the height of the villi (26.8%) (Figure 4. I.). The structure of the mucosa is directly influenced by the composition of the diet, mainly the protein content, a diet with 26% protein significantly reduced the villi height and the villi area of the jejunum but did not influence the ileum morphology (64). Finally, the excessive number of amino acids seems to influence the microscopic anatomy of the ileal wall, increasing the structures due to the greater availability of amino acids, but when the animals were exposed to DSS, the high-protein diet did not interfere with the histopathological changes.

High protein diet and inflammation causes neuronal changes

In the myenteric plexus, inflammation with DSS caused an atrophy of nitrergic neurons (PGP9.5/nNOS+) ($\downarrow 7.64\%$) (Figure 6 – B; Figure 7. f.) and a hypertrophy of estimated cholinergic neurons (PGP9.5/nNOS⁻) ($\uparrow 4.97\%$) ($P < 0,05$) (Figure 6 – C; Figure 7. e.) in animals that received the standard diet. In animals that received the high-protein diet, inflammation caused an atrophy of nitrergic neurons even greater ($\downarrow \downarrow 22.3\%$) ($P < 0,05$) (Figure 6 – B; Figure 7. d.), but no cholinergic hypertrophy was observed. In animals that were not inflamed and that received a high-protein diet, there was an atrophy of the cholinergic neurons ($\downarrow 9.80\%$) ($p < 0,05$) (Figure 6 – C; Figure 7. c.), indicating a possible protective role of the diet in relation to these neurons.

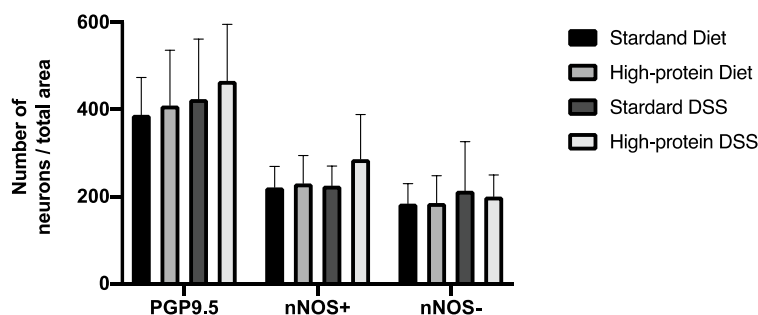


Figure 5. Count (number of neurons per total area). Results were expressed as means and SD (n = 6).

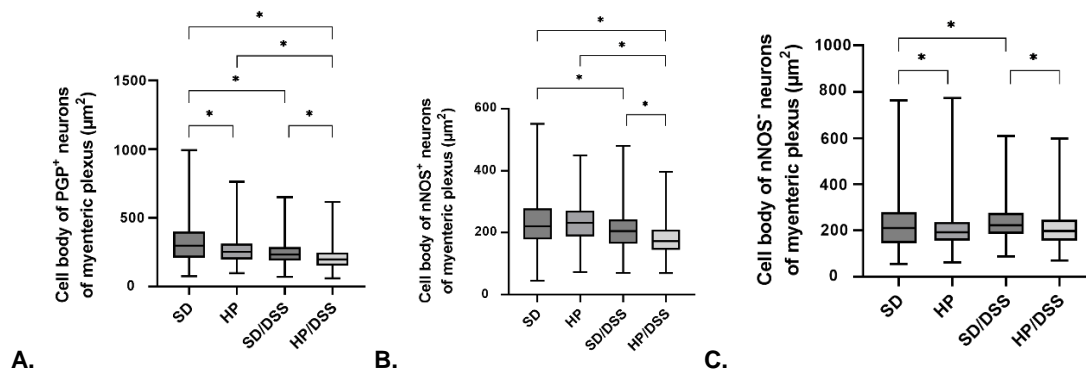


Figure 6. Morphometry (cell body size) of myenteric neurons. Results were expressed as median ($n = 6$) and analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by the Duun's test. * $P < 0.05$.

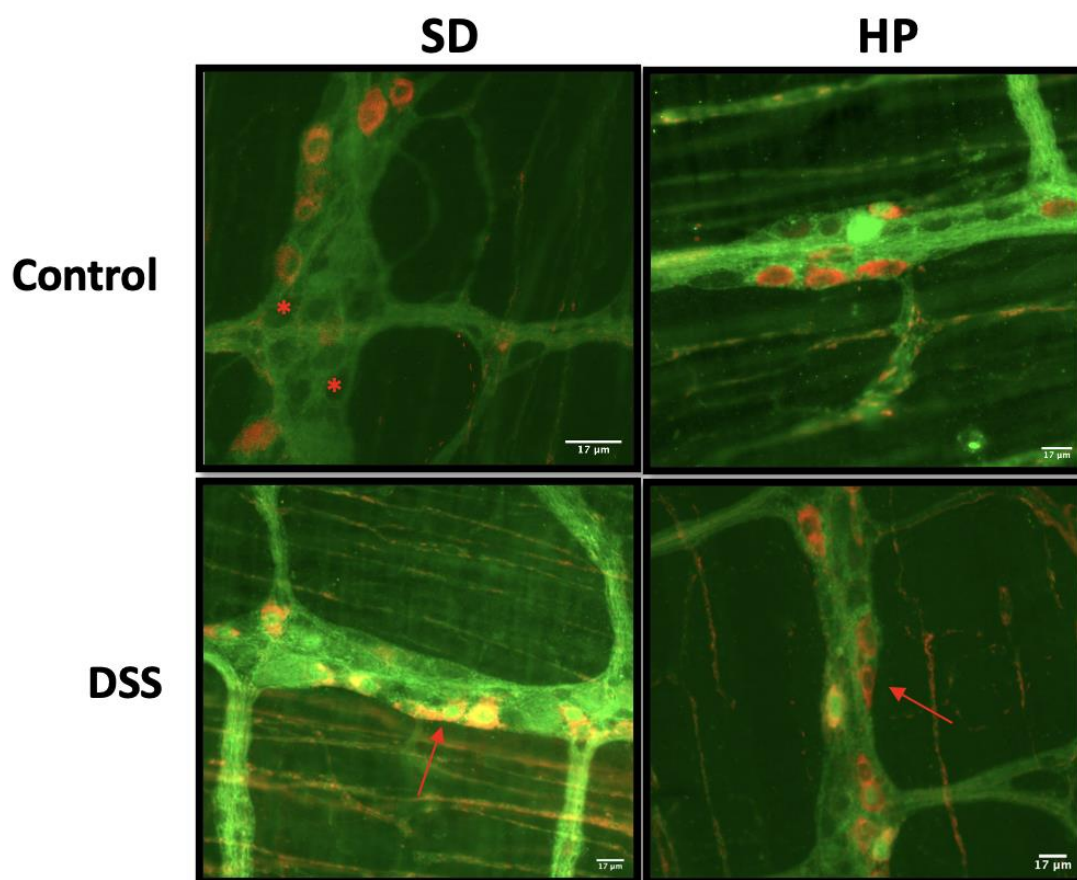


Figure 7. Myenteric plexus of ileum of mice exposed to DSS and feed with Standard Diet (SD) or High protein (HP) diet. In green, neurons immunoreactive to the protein PGP9.5 (general neuronal marker). In red, neurons immunoreactive to the neuronal nitric oxide synthase (nNOS). Neurons labeled in green but not in red (asterisk) were considered potentially cholinergic since the most of the myenteric neurons are either nitroergic or cholinergic according to Furness (2006). Observe atrophied neurons in images from the groups exposed to DSS when compared to their respective control (arrows).

Nitroergic and cholinergic neurons in the myenteric plexus can be inhibitory and excitatory motor neurons, respectively, in addition to interneurons and IPANs (65). These neurons play a crucial role in the control of GI motility, acting as mediators of muscle contraction and relaxation (65,66). Some researchers report

an increase in the permeability and myoelectric activity of the ileum in colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) and ethanol in rats (67,68). Furthermore, there is evidence that experimental colitis in rats leads to distinct alterations in the neural circuitry of non-inflamed regions of the intestine and this may be related to changes in small intestine motility that accompany colitis (69). These motility alterations seem to be directly related to the neuronal alterations of the myenteric plexus that we observed in the ileum.

In the submucosal plexus, both inflammation and a high-protein diet did not change the population density of PGP9.5 neurons without immunoreactivity for Calretinin (PGP9.5/Calr⁻) or with weak (PGP9.5/Calr⁺) or strong (PGP9.5/Calr⁺⁺) immunoreactivity (IR) for this protein ($P > 0.05$) (Figure 8). When observing the cell body area of submucous neurons, it was found that inflammation did not cause any change in animals that received a standard diet (Figure 9 – A). On the other hand, when fed a high-protein diet, inflammation caused atrophy in the two evaluated populations of submucous neurons: estimated cholinergic (PGP9.5/Calr⁺) ($\downarrow 12.2\%$) ($P < 0.05$) (Figure 9 – B; Figure 10. d.) and VIPergic (PGP9.5/Calr⁺⁺) ($\downarrow 8.64\%$) ($P < 0.05$) (Figure 9 – C; Figure 10. e.). When the effect of diet alone on the area of these neurons was evaluated, this atrophy was observed only in neurons estimated to be cholinergic (PGP9.5/Calr⁺) ($\downarrow 5.22\%$) ($P < 0.05$) (Figure 9 – B; Figure 10. c.).

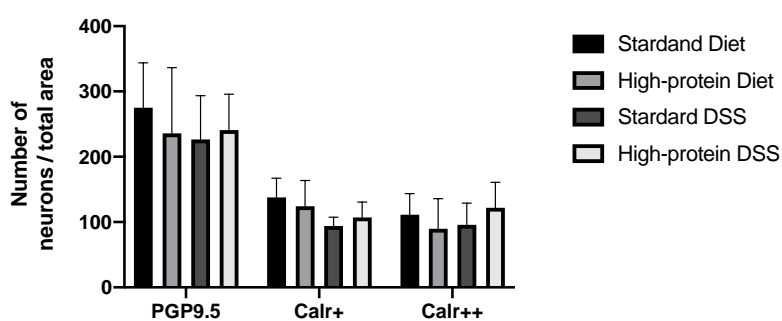


Figure 8. Count (number of neurons per total area). Results were expressed as means ($n = 6$).

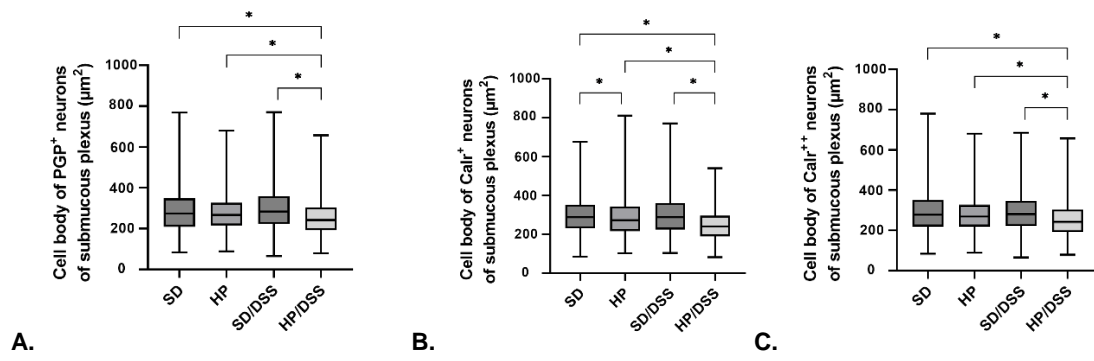
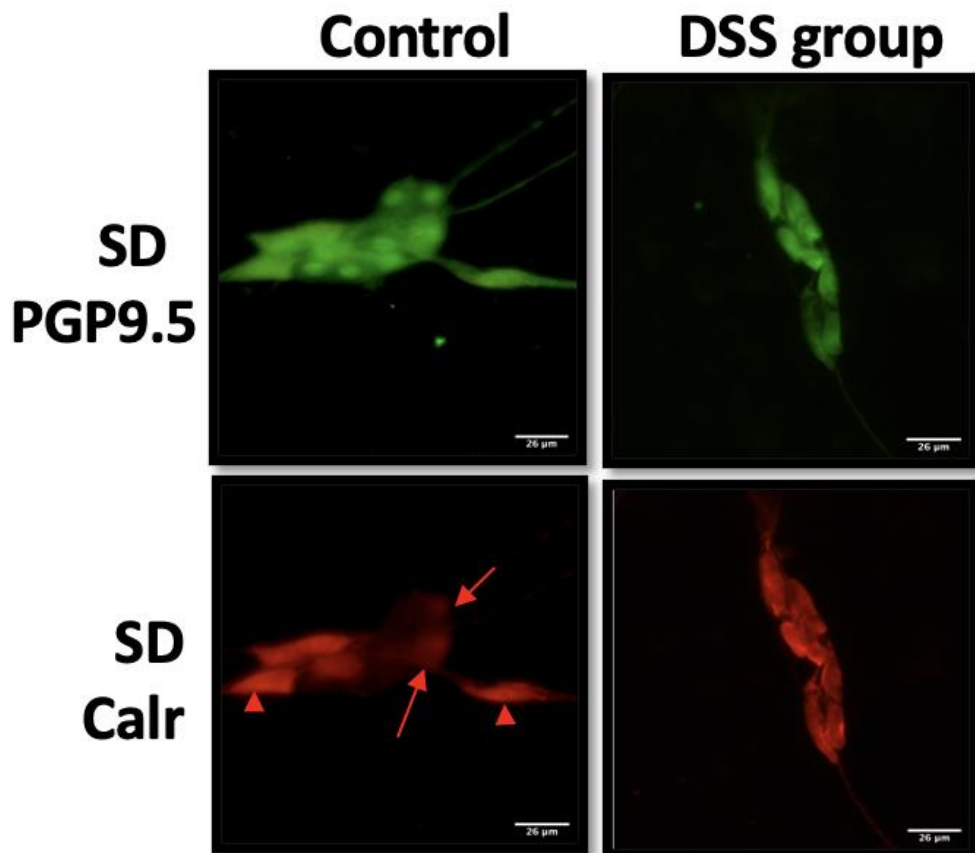


Figure 9. Morphometry (cell body size) of submucosal plexus neurons. Results were expressed as median (n = 6) and analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by the Duun's test. *P < 0.05.



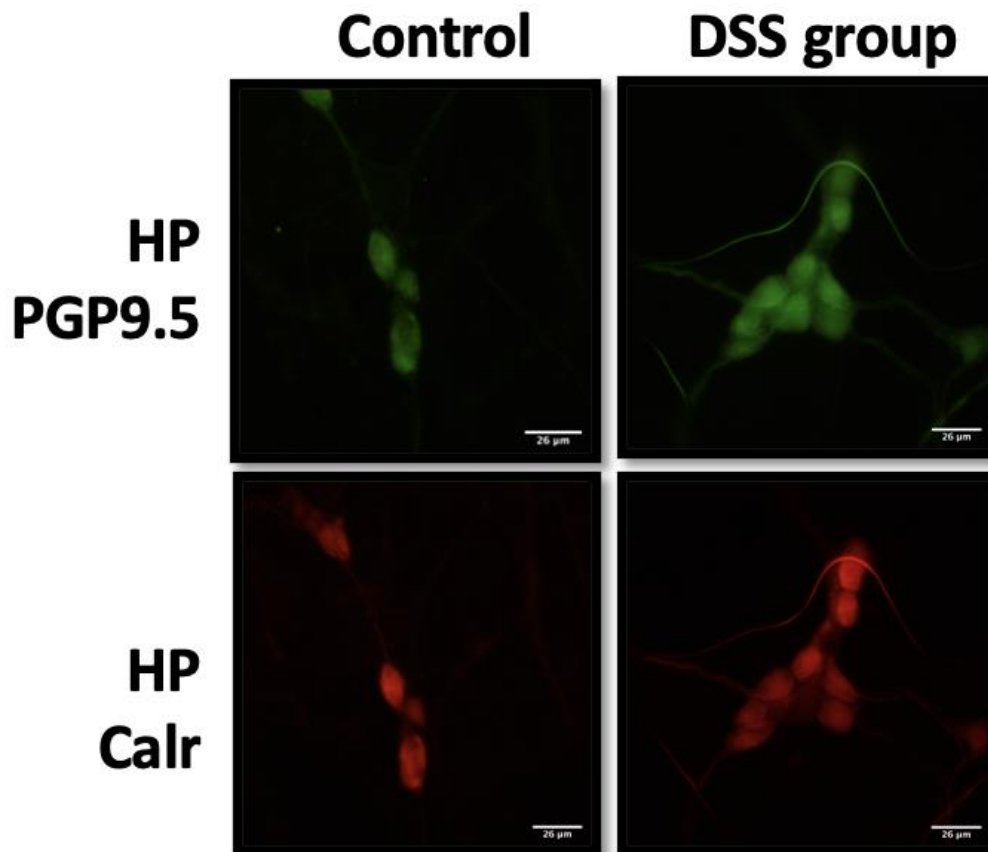


Figure 10. Submucosal ganglia of the ileum of mice exposed to DSS and feed with Standard Diet (SD) or High protein (HP) diet. In green, neurons immunoreactive to the protein PGP9.5 (general neuronal marker). In red, neurons immunoreactive to Calretin (Calr). Neurons strongly labelled with Calretin (head arrow) were considered cholinergic and the ones weakly labelled with Calretin (arrow) were considered VIPergic according to Fantaguzzi et al, 2009. Observe atrophied neurons in images from the groups exposed to DSS when compared to their respective control (arrows).

There is a decrease in the jejunal absorption of amino acids in iodoacetamide-induced colitis in rats (9). We believe that this decrease in amino acid absorption and the high protein diet may cause an increase in the concentration of proteins in the intestinal lumen and thus contribute to a greater than usual growth of proteolytic bacteria and consequently further exacerbate inflammation. Cholinergic populations in the submucosal plexus can be vasodilator secretomotor, non-vasodilator secretomotor and IPANs (65). Atrophied cholinergic neurons indicate lower metabolic activity (70) and, therefore, we suggest that there is a reduction in acetylcholine secretion by these neurons. VIPergic neurons in the submucosal plexus can be mainly non-cholinergic secretomotor/vasodilator neurons, as well as mucosal muscle inhibitory motor neurons and uniaxial neurons that project to the myenteric plexus

(65). There is a decrease in VIPergic neurons in the lamina propria and submucosa of the colon of patients with IBD (71). In support, plasma levels of VIP were measured, and a positive correlation was found between levels of this peptide and disease activity (72).

The alterations that we observed in the ENS neurons may also be related to the action of short-chain fatty acids, such as butyrate (72,73). This molecule is capable of causing an increase in cholinergic activity, a reduction in nitrenergic activity, an increase in intestinal motility and in the contractile response induced by electrical stimulation (74). As previously stated, the excessive amount of proteins in the intestinal lumen can inhibit butyrate oxidation (46,47) and together with inflammation, damage the mucosa and, consequently, decrease neuronal excitability and induce neurochemical plasticity in the ENS (75,76), causing atrophy of cholinergic neurons.

It is known that intestinal inflammation can cause structural changes in the ENS through the expression of neurotrophic receptors such as p75 and CD27 and antigens that bind to adhesion molecules in immune cells and nerve endings of patients with IBD (77). Structural alterations are accompanied by degeneration and necrosis of ganglion cells and the nervous process (78). The atrophy of the populations that we observed may be related to histopathological changes, as the plasticity and survival of autonomic neurons involves the need for interactions between neurons and the target tissue, associated with the production and responsiveness to neurotrophic factors derived from targets and component actions of the extracellular matrix (79). Decreased neuronal size of submucosal plexus populations are likely a consequence of metabolic derangements caused by excess protein present in the lumen.

There is a lack of dietary recommendations for patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. Due to the lack of studies, nutritionists are often left without guidance when dealing with patients with IBD, especially regarding the content of macronutrients in the diet. The Rome IV consensus says that the diet is very different in countries with a high prevalence of IBD compared to countries with a low prevalence, however, no dietary component is consistently to blame. Therefore, until strong scientific evidence supports a defined diet, patients with IBD should be advised to eat a varied diet to meet their energy and nutritional needs, including dietary fiber (25). The European Society for Clinical Nutrition

and Metabolism recommends increasing protein intake in active IBD to 1.2–1.5 g/kg body weight/day in adults and maintaining a level similar to that recommended for the general population during remission (about 1 g/kg of body weight/day) (26).

Despite the difficulty in establishing ideal recommendations, some researchers have sought to find an adequate protein content for patients with UC, while the 53% protein diet worsened the intensity and duration of inflammation induced by DSS treatment, the 30% diet, when compared to the 14% diet, accelerated epithelial repair, favoring the restoration of the architecture and function of the colonic barrier in mice with UC (80). Although a diet with 30% protein seems to be interesting, in clinical practice it is important to consider that when we increase the supply of protein through the main food sources such as meat, eggs and milk and derivatives, the fat in the diet also increases due to the composition of these foods, which is extremely harmful to the gut and IBD patients. In addition, fats have a high energy value, making a normocaloric diet often hypercaloric. So that this does not happen, and the diet remains high in protein, the individual should reduce the amount of carbohydrates ingested, which can be excellent sources of fiber.

Conclusion

We can conclude that a high-protein diet with 44% protein worsens the clinical signs of UC in the acute phase of the disease, as well as exerting an influence on the size of neurons in the ileum of mice. More studies are needed to find the optimal protein content for IBD patients.

Acknowledgments

This study was funded in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel — Brazil (CAPES) — Financial Code 001.

References

1. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory Bowel Disease. *Annu Rev Immunol.* 2010 Mar;28(1):573–621.
2. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2014 May;14(5):329–42.
3. Roberts-Thomson IC, Fon J, Uylaki W, Cummins AG, Barry S. Cells,

- cytokines and inflammatory bowel disease: a clinical perspective. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011 Nov;5(6):703–16.
4. Wehkamp J, Götz M, Herrlinger K, Steurer W, Stange EF. Inflammatory Bowel Disease: Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Aerzteblatt Online* [Internet]. 2016 Feb 5 [cited 2020 Oct 22]; Available from: <https://www.aerzteblatt.de/10.3238/arztebl.2016.0072>
 5. Brierley SM, Linden DR. Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Oct;11(10):611–27.
 6. Moynes DM, Lucas GH, Beyak MJ, Lomax AE. Effects of Inflammation on the Innervation of the Colon. *Toxicol Pathol*. 2014 Jan;42(1):111–7.
 7. Geier MS, Smith CL, Butler RN, Howarth GS. Small-Intestinal Manifestations of Dextran Sulfate Sodium Consumption in Rats and Assessment of the Effects of *Lactobacillus fermentum* BR11. *Dig Dis Sci*. 2009 Jun;54(6):1222–8.
 8. Mourad FH, Barada KA, Saade NE. Impairment of Small Intestinal Function in Ulcerative Colitis: Role of Enteric Innervation. *J Crohns Colitis*. 2016 Sep 21;jjw162.
 9. Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol*. 2004 Feb;72(2):143–64.
 10. Jacobs JP, Goudarzi M, Singh N, Tong M, McHardy IH, Ruegger P, et al. A Disease-Associated Microbial and Metabolomics State in Relatives of Pediatric Inflammatory Bowel Disease Patients. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2016 Nov;2(6):750–66.
 11. Loddo I, Romano C. Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis. *Front Immunol* [Internet]. 2015 Nov 2 [cited 2020 Oct 22];6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00551/abstract>
 12. Ananthkrishnan AN, Khalili H, Song M, Higuchi LM, Richter JM, Nimptsch K, et al. High School Diet and Risk of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: *Inflamm Bowel Dis*. 2015 Jul;1.
 13. Souza AL, Fiorini Aguiar SL, Gonçalves Miranda MC, Lemos L, Freitas Guimaraes MA, Reis DS, et al. Consumption of Diet Containing Free Amino Acids Exacerbates Colitis in Mice. *Front Immunol*. 2017 Nov 20;8:1587.
 14. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014 Jan;505(7484):559–63.
 15. Rashvand S, Somi MH, Rashidkhani B, Hekmatdoost A. Dietary protein intakes and risk of ulcerative colitis. *Med J Islam Repub Iran*. 2015;29:7.
 16. Geypens B, Claus D, Evenepoel P, Hiele M, Maes B, Peeters M, et al. Influence of dietary protein supplements on the formation of bacterial metabolites in the colon. *Gut*. 1997 Jul 1;41(1):70–6.
 17. Llewellyn SR, Britton GJ, Contijoch EJ, Vennaro OH, Mortha A, Colombel JF, et al. Interactions Between Diet and the Intestinal Microbiota Alter Intestinal Permeability and Colitis Severity in Mice. *Gastroenterology*. 2018 Mar;154(4):1037-1046.e2.
 18. Blachier F, Beaumont M, Andriamihaja M, Davila AM, Lan A, Grauso M, et al. Changes in the Luminal Environment of the Colonic Epithelial Cells and Physiopathological Consequences. *Am J Pathol*. 2017 Mar;187(3):476–86.

19. Blachier F, Davila AM, Mimoun S, Benetti PH, Atanasiu C, Andriamihaja M, et al. Luminal sulfide and large intestine mucosa: friend or foe? *Amino Acids*. 2010 Jul;39(2):335–47.
20. Cui X, Kim E. Dual Effects of High Protein Diet on Mouse Skin and Colonic Inflammation. *Clin Nutr Res*. 2018;7(1):56.
21. Lan A, Blais A, Coelho D, Capron J, Maarouf M, Benamouzig R, et al. Dual effects of a high-protein diet on DSS-treated mice during colitis resolution phase. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. 2016 Oct 1;311(4):G624–33.
22. Lamb CA, Kennedy NA, Raine T, Hendy PA, Smith PJ, Limdi JK, et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2019 Dec;68(Suppl 3):s1–106.
23. Forbes A, Escher J, Hébuterne X, Kłęk S, Krznaric Z, Schneider S, et al. ESPEN guideline: Clinical nutrition in inflammatory bowel disease. *Clin Nutr*. 2017 Apr;36(2):321–47.
24. Gaifem J, Gonçalves LG, Dinis-Oliveira RJ, Cunha C, Carvalho A, Torrado E, et al. L-Threonine Supplementation During Colitis Onset Delays Disease Recovery. *Front Physiol*. 2018 Sep 5;9:1247.
25. Neunlist M, Schemann M. Nutrient-induced changes in the phenotype and function of the enteric nervous system: Nutrient-induced responses in the enteric nervous system. *so*. 2014 Jul 15;592(14):2959–65.
26. Wang GD, Wang XY, Xia Y, Wood JD. Dietary Glutamate: Interactions With the Enteric Nervous System. *J Neurogastroenterol Motil*. 2014 Jan 31;20(1):41–53.
27. Laffin M, Fedorak R, Zalasky A, Park H, Gill A, Agrawal A, et al. A high-sugar diet rapidly enhances susceptibility to colitis via depletion of luminal short-chain fatty acids in mice. *Sci Rep*. 2019 Dec;9(1):12294.
28. Stocks J, Dormandy TL. The Autoxidation of Human Red Cell Lipids Induced by Hydrogen Peroxide. *Br J Haematol*. 1971 Jan;20(1):95–111.
29. Misra HP, Fridovich I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J Biol Chem*. 1972 May;247(10):3170–5.
30. Mills GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem*. 1957 Nov;229(1):189–97.
31. Mongardi Fantaguzzi C, Thacker M, Chiocchetti R, Furness JB. Identification of neuron types in the submucosal ganglia of the mouse ileum. *Cell Tissue Res*. 2009 May;336(2):179–89.
32. Chapman-Kiddell CA, Davies PSW, Gillen L, Radford-Smith GL. Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Jan;16(1):137–51.
33. Tayyem RF, Qalqili TR, Ajeen R, Rayyan YM. Dietary Patterns and the Risk of Inflammatory Bowel Disease: Findings from a Case-Control Study. *Nutrients*. 2021 May 31;13(6):1889.
34. Zhao WT, Luo Y, Zhang Y, Zhou Y, Zhao TT. High protein diet is of benefit for patients with type 2 diabetes: An updated meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Nov;97(46):e13149.
35. Neis E, Dejong C, Rensen S. The Role of Microbial Amino Acid Metabolism in Host Metabolism. *Nutrients*. 2015 Apr 16;7(4):2930–46.
36. Etheridge RD, Seerley RW, Wyatt RD. The Effect of Diet on Performance, Digestibility, Blood Composition and Intestinal Microflora of

- Weaned Pigs. *J Anim Sci*. 1984 Jun 1;58(6):1396–402.
37. Andoh A, Sakata S, Koizumi Y, Mitsuyama K, Fujiyama Y, Benno Y. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the diversity of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis: *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Aug;13(8):955–62.
 38. Lo Presti A, Zorzi F, Del Chierico F, Altomare A, Cocca S, Avola A, et al. Fecal and Mucosal Microbiota Profiling in Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease. *Front Microbiol*. 2019 Jul 17;10:1655.
 39. Ramakrishna B, Jayakanthan P, Pugazhendhi S, Kabeerdoss J. Alterations of mucosal microbiota in the colon of patients with inflammatory bowel disease revealed by real time polymerase chain reaction amplification of 16S ribosomal ribonucleic acid. *Indian J Med Res*. 2015;142(1):23.
 40. Cummings JH, Macfarlane GT. Colonic microflora: Nutrition and health. *Nutrition*. 1997 May;13(5):476–8.
 41. Ma N, Tian Y, Wu Y, Ma X. Contributions of the Interaction Between Dietary Protein and Gut Microbiota to Intestinal Health. *Curr Protein Pept Sci* [Internet]. 2017 Jun 2 [cited 2022 Jul 11];18(8). Available from: <http://www.eurekaselect.com/150179/article>
 42. Zhao J, Zhang X, Liu H, Brown MA, Qiao S. Dietary Protein and Gut Microbiota Composition and Function. *Curr Protein Pept Sci*. 2018 Nov 28;20(2):145–54.
 43. Florin T, Neale G, Gibson GR, Christl SU, Cummings JH. Metabolism of dietary sulphate: absorption and excretion in humans. *Gut*. 1991 Jul 1;32(7):766–73.
 44. Roediger WE, Moore J, Babidge W. Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 1997 Aug;42(8):1571–9.
 45. Christl SU, Eisner HD, Dusel G, Kasper H, Scheppach W. Antagonistic effects of sulfide and butyrate on proliferation of colonic mucosa: A potential role for these agents in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 1996 Dec;41(12):2477–81.
 46. Thibault R, Blachier F, Darcy-Vrillon B, de Coppet P, Bourreille A, Segain JP. Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: A transport deficiency. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Apr;16(4):684–95.
 47. De Preter V, Bulteel V, Suenart P, Geboes KP, De Hertogh G, Luybaerts A, et al. Pouchitis, Similar to Active Ulcerative Colitis, Is Associated with Impaired Butyrate Oxidation by Intestinal Mucosa: *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Mar;15(3):335–40.
 48. Roediger WE. THE COLONIC EPITHELIUM IN ULCERATIVE COLITIS: AN ENERGY-DEFICIENCY DISEASE? *The Lancet*. 1980 Oct;316(8197):712–5.
 49. Aguirre M, Eck A, Koenen ME, Savelkoul PHM, Budding AE, Venema K. Diet drives quick changes in the metabolic activity and composition of human gut microbiota in a validated in vitro gut model. *Res Microbiol*. 2016 Feb;167(2):114–25.
 50. Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease 1,2 1This article is part of a series of reviews on “Reactive Oxygen and Nitrogen in Inflammation.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. 2Guest Editor: Giuseppe Poli. *Free Radic Biol Med*. 2002 Aug;33(3):311–22.

51. Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller AF, Teixeira M, et al. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chem Rev.* 2014 Apr 9;114(7):3854–918.
52. Beltrán B, Nos P, Dasí F, Iborra M, Bastida G, Martínez M, et al. Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in immune cells of naïve and treated Crohn's disease: *Inflamm Bowel Dis.* 2010 Jan;16(1):76–86.
53. Sakthivel KM, Chandrasekaran G. Protective Effect of *Acacia ferruginea* against Ulcerative Colitis via Modulating Inflammatory Mediators, Cytokine Profile and NF- κ B Signal Transduction Pathways. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2014;33(2):83–98.
54. Hwang J, Jin J, Jeon S, Moon SH, Park MY, Yum DY, et al. SOD1 suppresses pro-inflammatory immune responses by protecting against oxidative stress in colitis. *Redox Biol.* 2020 Oct;37:101760.
55. Kim M, Galan C, Hill AA, Wu WJ, Fehlner-Peach H, Song HW, et al. Critical Role for the Microbiota in CX3CR1+ Intestinal Mononuclear Phagocyte Regulation of Intestinal T Cell Responses. *Immunity.* 2018 Jul;49(1):151-163.e5.
56. Ohtsuka Y. Dextran Sulfate Sodium--Induced Inflammation Is Enhanced by Intestinal Epithelial Cell Chemokine Expression in Mice. *Pediatr Res.* 2003 Jan 1;53(1):143–7.
57. Takahashi S, Kawamura T, Kanda Y, Taniguchi T, Nishizawa T, Iiai T, et al. Multipotential acceptance of Peyer's patches in the intestine for both thymus-derived T cells and extrathymic T cells in mice. *Immunol Cell Biol.* 2005 Oct;83(5):504–10.
58. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Hata K, Sugie S, Niho N, et al. Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in *ApcMin/+* mice: Inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. *Int J Cancer.* 2006 Jan 1;118(1):25–34.
59. Elsheikh W, Flannigan KL, Mcknight W, Ferraz JGP, Wallace JL. DEXTRAN SULFATE SODIUM INDUCES PAN-GASTROENTERITIS IN RODENTS: IMPLICATIONS FOR STUDIES OF COLITIS. 2012;7.
60. Kim EJ, Chung MY, Son MW, Kwon JW, Yoo M, Chung HJ, et al. Pharmacokinetics of 7-carboxymethoxy-3',4',5-trimethoxy flavone (DA-6034), a derivative of flavonoid, in mouse and rat models of chemically-induced inflammatory bowel disease. *J Pharm Pharmacol.* 2010 Feb 18;58(1):27–35.
61. Mourad FH, Barada KA, Bou Rached NA, Khoury CI, Saadé NE, Nassar CF. Inhibitory effect of experimental colitis on fluid absorption in rat jejunum: role of the enteric nervous system, VIP, and nitric oxide. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 2006 Feb;290(2):G262–8.
62. Grohmann U, Bronte V. Control of immune response by amino acid metabolism: Metabolic regulation of immune responses. *Immunol Rev.* 2010 Jun 15;236(1):243–64.
63. Li Z, Tang W, Gong S, Li Y, Xia S, Zhang B, et al. Effects of dietary protein on gut development, microbial compositions and mucin expressions in mice. *J Appl Microbiol.* 2022 Mar;132(3):2262–9.
64. Furness JB. *The Enteric Nervous System.* Blackwell, Oxford; 2006.
65. Groneberg D, Voussen B, Friebe A. Integrative Control of Gastrointestinal Motility by Nitric Oxide. *Curr Med Chem.* 2016 Aug 30;23(24):2715–35.

66. Aube, Cherbut, Barbier, Xing, Roze, Galmiche. Altered myoelectrical activity in noninflamed ileum of rats with colitis induced by trinitrobenzene sulphonic acid. *Neurogastroenterol Motil.* 1999 Feb;11(1):55–62.
67. Cui N, Madsen KL, Friend DR, Stevenson BR, Fedorak RN. Increased permeability occurs in rat ileum following induction of pancolitis. *Dig Dis Sci.* 1996 Feb;41(2):405–11.
68. Blandizzi C, Fornai M, Colucci R, Baschiera F, Barbara G, Giorgio RD, et al. Altered prejunctional modulation of intestinal cholinergic and noradrenergic pathways by α_2 -adrenoceptors in the presence of experimental colitis: Prejunctional α_2 -adrenoceptors in colitis. *Br J Pharmacol.* 2003 May;139(2):309–20.
69. Barada KA, Kafrouni MI, Khoury CI, Saade NE, Mourad FH, Szabo SS, et al. Experimental colitis decreases rat jejunal amino acid absorption Role of capsaicin sensitive primary afferents. *Life Sci.* 2001;11.
70. Halder N, Lal G. Cholinergic System and Its Therapeutic Importance in Inflammation and Autoimmunity. *Front Immunol.* 2021 Apr 15;12:660342.
71. Kubota Y, Petras RE, Ottaway CA, Tubbs RR, Farmer RG, Fiocchi C. Colonic vasoactive intestinal peptide nerves in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1992 Apr;102(4 Pt 1):1242–51.
72. Duffy LC, Zielezny MA, Riepenhoff-Talty M, Byers TE, Marshall J, Weiser MM, et al. Vasoactive intestinal peptide as a laboratory supplement to clinical activity index in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 1989 Oct;34(10):1528–35.
73. Leonel AJ, Alvarez-Leite JI. Butyrate: implications for intestinal function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012 Sep;15(5):474–9.
74. Neunlist M, Dobрева G, Schemann M. Characteristics of mucosally projecting myenteric neurones in the guinea-pig proximal colon. *J Physiol.* 1999 Jun;517(2):533–46.
75. Soret R, Chevalier J, De Coppet P, Poupeau G, Derkinderen P, Segain JP, et al. Short-Chain Fatty Acids Regulate the Enteric Neurons and Control Gastrointestinal Motility in Rats. *Gastroenterology.* 2010 May;138(5):1772-1782.e4.
76. Moriez R, Abdo H, Chaumette T, Faure M, Lardeux B, Neunlist M. Neuroplasticity and neuroprotection in enteric neurons: Role of epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 May;382(3):577–82.
77. Tixier E, Lalanne F, Just I, Galmiche JP, Neunlist M. Human mucosa/submucosa interactions during intestinal inflammation: involvement of the enteric nervous system in interleukin-8 secretion. *Cell Microbiol.* 2005 Dec;7(12):1798–810.
78. Geboes K, Collins S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol Motil.* 1998 Jun;10(3):189–202.
79. Dvorak AM, Onderdonk AB, McLeod RS, Monahan-Earley RA, Cullen J, Antonioli DA, et al. Axonal Necrosis of Enteric Autonomic Nerves in Continent Heal Pouches Possible Implications for Pathogenesis of Crohn's Disease: *Ann Surg.* 1993 Mar;217(3):260–71.
80. Gavazzi I, Cowen T. Can the neurotrophic hypothesis explain degeneration and loss of plasticity in mature and ageing autonomic nerves? *J Auton Nerv Syst.* 1996 Apr;58(1–2):1–10.
81. Vidal-Lletjós S, Andriamihaja M, Blais A, Grauso M, Lepage P, Davila

AM, et al. Dietary Protein Intake Level Modulates Mucosal Healing and Mucosa-Adherent Microbiota in Mouse Model of Colitis. *Nutrients*. 2019 Feb 28;11(3):514.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos epidemiológicos vêm demonstrando um aumento na incidência de RCU em populações adeptas a dieta com alta ingestão proteica, essa dieta vem se popularizando cada vez mais devido alguns benefícios em relação ao emagrecimento e hipertrofia muscular. Além disso, não existe um teor de macronutrientes recomendado para pacientes com RCU, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença e muitos nutricionistas ficam sem norte no momento de prescrever um cardápio para esses pacientes.

Em nosso estudo, mostramos que a dieta hiperproteica com o dobro da recomendação habitual (44% de proteína) piora os sinais clínicos da RCU durante a fase aguda, além de causar a atrofia de neurônios no íleo dos camundongos expostos ao DSS. Futuros estudos devem investigar outros teores de proteína, fonte e distribuição ao longo do dia na fase aguda e crônica da doença para finalmente chegarmos a uma conclusão quanto ao teor proteico ideal para os pacientes com RCU.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DOS ITENS 1 a 3

- ABRAHAM, B. P.; KANE, S. Fecal Markers: Calprotectin and Lactoferrin. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 41, n. 2, p. 483–495, jun. 2012.
- ABRAHAM, C.; CHO, J. H. Inflammatory Bowel Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 21, p. 2066–2078, 19 nov. 2009.
- AHMED, I. et al. Microbiome, Metabolome and Inflammatory Bowel Disease. **Microorganisms**, v. 4, n. 2, p. E20, 15 jun. 2016.
- ALATAB, S. et al. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 1, p. 17–30, jan. 2020.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. et al. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. **Gut**, v. 63, n. 5, p. 776–784, maio 2014.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. et al. High School Diet and Risk of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: **Inflammatory Bowel Diseases**, p. 1, jul. 2015.
- ANDRESSEN, C.; BLÜMCKE, I.; CELIO, M. R. Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. **Cell and Tissue Research**, v. 271, n. 2, p. 181–208, fev. 1993.
- ANTONIOLI, L. et al. Control of enteric neuromuscular functions by purinergic A3 receptors in normal rat distal colon and experimental bowel inflammation: Adenosine A3 receptors and gut motility in colitis. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, n. 4, p. 856–871, out. 2010.
- ARRIETA, M.-C. et al. The intestinal microbiome in early life: health and disease. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 427, 2014.
- ASFAHA, S. et al. Prolonged colonic epithelial hyporesponsiveness after colitis: role of inducible nitric oxide synthase. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 276, n. 3, p. G703–G710, 1 mar. 1999.
- ATARASHI, K. et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. **Nature**, v. 500, n. 7461, p. 232–236, 8 ago. 2013.
- BAIMBRIDGE, K. G.; CELIO, M. R.; ROGERS, J. H. Calcium-binding proteins in the nervous system. **Trends in Neurosciences**, v. 15, n. 8, p. 303–308, ago. 1992.
- BANKS, M. R. et al. Antisecretory actions of a novel vasoactive intestinal polypeptide (VIP) antagonist in human and rat small intestine. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, n. 7, p. 994–1001, abr. 2005.
- BELAI, A. et al. Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. **Gut**, v. 40, n. 6, p. 767–774, 1 jun. 1997.
- BERNARDINI, N. et al. Immunohistochemical analysis of myenteric ganglia and interstitial cells of Cajal in ulcerative colitis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 16, n. 2, p. 318–327, fev. 2012.
- BERTRAND, P. P. et al. Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. **The American Journal of Physiology**, v. 273, n. 2 Pt 1, p. G422–435, ago. 1997.
- BIRRENBACH, T.; BÖCKER, U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 10, n. 6, p. 848–859, nov. 2004.
- BLACHIER, F. et al. Changes in the Luminal Environment of the Colonic

- Epithelial Cells and Physiopathological Consequences. **The American Journal of Pathology**, v. 187, n. 3, p. 476–486, mar. 2017.
- BORNSTEIN, J. C. et al. Ramifications of the axons of AH-neurons injected with the intracellular marker biocytin in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 314, n. 3, p. 437–451, 15 dez. 1991.
- BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 7, p. 521–533, jul. 2003.
- BOYER, L. et al. Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. **Autonomic Neuroscience**, v. 117, n. 1, p. 41–53, jan. 2005.
- BRANNON, P. M. Adaptation of the exocrine pancreas to diet. **Annual Review of Nutrition**, v. 10, p. 85–105, 1990.
- BRETT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, n. 6295, p. 768–770, out. 1990.
- BROOKES, S. J. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. **The Anatomical Record**, v. 262, n. 1, p. 58–70, 1 jan. 2001.
- CANTORNA, M. T. et al. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 11, p. 2648–2652, nov. 2000.
- CHERUBINI, E.; NORTH, R. A. Actions of gamma-aminobutyric acid on neurones of guinea-pig myenteric plexus. **British Journal of Pharmacology**, v. 82, n. 1, p. 93–100, maio 1984.
- COSNES, J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. **Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 3, p. 481–496, jun. 2004.
- COSNES, J. What is the link between the use of tobacco and IBD? **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 14 Suppl 2, p. S14-15, out. 2008.
- COSTA, M.; FURNESS, J. B. The origins, pathways and terminations of neurons with VIP-like immunoreactivity in the guinea-pig small intestine. **Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 665–676, abr. 1983.
- DALE, H. H.; FELDBERG, W. The chemical transmitter of vagus effects to the stomach. **The Journal of Physiology**, v. 81, n. 3, p. 320–334, 9 jun. 1934.
- DE QUELEN, F. et al. n-3 polyunsaturated fatty acids in the maternal diet modify the postnatal development of nervous regulation of intestinal permeability in piglets. **The Journal of Physiology**, v. 589, n. 17, p. 4341–4352, 1 set. 2011.
- DESAI, M. S. et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. **Cell**, v. 167, n. 5, p. 1339–1353.e21, 17 nov. 2016.
- DIENER, M.; VUJICIC, Z.; SCHARRER, E. Neuronally mediated anion secretion induced by short-chain fatty acids in the rat distal small intestine. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 157, n. 1, p. 33–40, maio 1996.
- DROSSMAN, D. A. Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features, and Rome IV. **Gastroenterology**, v. 150, n. 6, p. 1262–1279.e2, maio 2016.
- ELSON, C. O. et al. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 109, n. 4, p. 1344–1367, out. 1995.
- EL-ZAATARI, M.; KAO, J. Y. Role of Dietary Metabolites in Regulating the Host

- Immune Response in Gastrointestinal Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 27 jan. 2017.
- ESMEIJER, K. et al. Dietary protein intake and kidney function decline after myocardial infarction: the Alpha Omega Cohort. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 35, n. 1, p. 106–115, 1 jan. 2020.
- FRANK, D. N. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 34, p. 13780–13785, 21 ago. 2007.
- FUMERY, M. et al. Natural History of Adult Ulcerative Colitis in Population-based Cohorts: A Systematic Review. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 3, p. 343–356.e3, mar. 2018.
- FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 81, n. 1–3, p. 87–96, jul. 2000.
- FURNESS, J. B. et al. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. **Progress in Neurobiology**, v. 72, n. 2, p. 143–164, fev. 2004.
- FURNESS, J. B. **The Enteric Nervous System**. Blackwell, Oxford, , 2006.
- FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, n. 5, p. 286–294, 6 mar. 2012.
- FURNESS, J. B. et al. The Enteric Nervous System and Gastrointestinal Innervation: Integrated Local and Central Control. Em: LYTE, M.; CRYAN, J. F. (Eds.). **Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease**. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer New York, 2014. v. 817p. 39–71.
- FURNESS, J. B.; COSTA, M. Types of nerves in the enteric nervous system. **Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 1–20, 1980.
- GAYA, D. R. et al. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? **The Lancet**, v. 367, n. 9518, p. 1271–1284, abr. 2006.
- GEBOES, K.; COLLINS, S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 10, n. 3, p. 189–202, jun. 1998.
- GILBERT, J.-A. et al. Effect of proteins from different sources on body composition. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, p. B16–B31, set. 2011.
- GILL, P. A. et al. Review article: short chain fatty acids as potential therapeutic agents in human gastrointestinal and inflammatory disorders. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 48, n. 1, p. 15–34, jul. 2018.
- GRIDER, J. R.; PILAND, B. E. The peristaltic reflex induced by short-chain fatty acids is mediated by sequential release of 5-HT and neuronal CGRP but not BDNF. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 292, n. 1, p. G429–437, jan. 2007.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Fifth edition ed. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, 2015.
- HALMOS, E. P. et al. A diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**, v. 146, n. 1, p. 67–75.e5, jan. 2014.
- HALMOS, E. P. et al. Diets that differ in their FODMAP content alter the colonic luminal microenvironment. **Gut**, v. 64, n. 1, p. 93–100, jan. 2015.

- HAMOUDA, H. E. p53 antibodies, metallothioneins, and oxidative stress markers in chronic ulcerative colitis with dysplasia. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 19, p. 2417, 2011.
- HANSEN, T. S. et al. Environmental factors in inflammatory bowel disease: a case-control study based on a Danish inception cohort. **Journal of Crohn's & Colitis**, v. 5, n. 6, p. 577–584, dez. 2011.
- HARMAR, A. J. et al. Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 1, p. 4–17, maio 2012.
- HART, A. R. et al. Diet in the aetiology of ulcerative colitis: a European prospective cohort study. **Digestion**, v. 77, n. 1, p. 57–64, 2008.
- HATOUM, O. A. et al. Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease: loss of nitric oxide-mediated vasodilation. **Gastroenterology**, v. 125, n. 1, p. 58–69, jul. 2003.
- HEIZMANN, C. W.; BRAUN, K. Changes in Ca(2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders. **Trends in Neurosciences**, v. 15, n. 7, p. 259–264, jul. 1992.
- HELLER, F. et al. Interleukin-13 Is the Key Effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis That Affects Epithelial Tight Junctions, Apoptosis, and Cell Restitution. **Gastroenterology**, v. 129, n. 2, p. 550–564, ago. 2005.
- HELLER, F. et al. Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. S1, p. S58–S61, nov. 2008.
- IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287–293, 1 dez. 2018.
- INSTITUTE OF MEDICINE (US) COMMITTEE TO REVIEW DIETARY REFERENCE INTAKES FOR VITAMIN D AND CALCIUM. **Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D**. Washington (DC): National Academies Press (US), 2011.
- JACKSON, P.; THOMPSON, R. J. The demonstration of new human brain-specific proteins by high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 49, n. 3, p. 429–438, mar. 1981.
- JANTCHOU, P. et al. Animal Protein Intake and Risk of Inflammatory Bowel Disease: The E3N Prospective Study. **American Journal of Gastroenterology**, v. 105, n. 10, p. 2195–2201, out. 2010.
- KALANTAR-ZADEH, K.; KRAMER, H. M.; FOUQUE, D. High-protein diet is bad for kidney health: unleashing the taboo. **Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 35, n. 1, p. 1–4, 1 jan. 2020.
- KAMPER, A.-L.; STRANDGAARD, S. Long-Term Effects of High-Protein Diets on Renal Function. **Annual Review of Nutrition**, v. 37, p. 347–369, 21 ago. 2017.
- KARP, S. M.; KOCH, T. R. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. **Disease-a-month: DM**, v. 52, n. 5, p. 199–207, maio 2006.

- KEMMLER, W. et al. Safety of a Combined WB-EMS and High-Protein Diet Intervention in Sarcopenic Obese Elderly Men. **Clinical Interventions in Aging**, v. 15, p. 953–967, 2020.
- KESHAVARZIAN, A. Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 52, n. 5, p. 720–728, 1 maio 2003.
- KHOR, B.; GARDET, A.; XAVIER, R. J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 307–317, jun. 2011.
- KO, G.-J. et al. The Effects of High-Protein Diets on Kidney Health and Longevity. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 31, n. 8, p. 1667–1679, ago. 2020.
- KRAUTER, E. M. et al. Changes in colonic motility and the electrophysiological properties of myenteric neurons persist following recovery from trinitrobenzene sulfonic acid colitis in the guinea pig. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 0, n. 0, p. 070817233248003-???, 17 ago. 2007.
- KREYMANN, K. G. et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Intensive care. **Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 25, n. 2, p. 210–223, abr. 2006.
- KUNZE, W. A.; BORNSTEIN, J. C.; FURNESS, J. B. Identification of sensory nerve cells in a peripheral organ (the intestine) of a mammal. **Neuroscience**, v. 66, n. 1, p. 1–4, maio 1995.
- LAKATOS, P. L.; SZAMOSI, T.; LAKATOS, L. Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 46, p. 6134–6139, 14 dez. 2007.
- LAN, A. et al. Dual effects of a high-protein diet on DSS-treated mice during colitis resolution phase. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 311, n. 4, p. G624–G633, 1 out. 2016.
- LARSSON, L. I. et al. Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 9, p. 3197–3200, set. 1976.
- LE LEU, R. K. et al. Dietary red meat aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice whereas resistant starch attenuates inflammation. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 12, p. 3475–3482, dez. 2013.
- LESLIE, W. D. et al. Vitamin D status and bone density in recently diagnosed inflammatory bowel disease: the Manitoba IBD Cohort Study. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 103, n. 6, p. 1451–1459, jun. 2008.
- LI, Z. S.; FURNESS, J. B. Immunohistochemical localisation of cholinergic markers in putative intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig small intestine. **Cell and Tissue Research**, v. 294, n. 1, p. 35–43, 2 set. 1998.
- LINDEN, D. R. et al. Cyclooxygenase-2 contributes to dysmotility and enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea pig distal colon: Cyclooxygenase-2 activation and neuroplasticity in colitis. **The Journal of Physiology**, v. 557, n. 1, p. 191–205, maio 2004.
- LINDEN, D. R.; SHARKEY, K. A.; MAWE, G. M. Enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea-pig distal colon. **The Journal of Physiology**, v. 547, n. 2, p. 589–601, mar. 2003.
- LINDEN, D. R. et al. Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 17, n. 5, p. 751–760, out. 2005.

- LIU, M.; SEINO, S.; KIRCHGESSNER, A. L. Identification and characterization of glucoreponsive neurons in the enteric nervous system. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 23, p. 10305–10317, 1 dez. 1999.
- LIU, M. T. et al. Glutamatergic enteric neurons. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 12, p. 4764–4784, 15 jun. 1997.
- LLEWELLYN, S. R. et al. Interactions Between Diet and the Intestinal Microbiota Alter Intestinal Permeability and Colitis Severity in Mice. **Gastroenterology**, v. 154, n. 4, p. 1037- 1046.e2, mar. 2018.
- LOFTUS, E. V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v. 126, n. 6, p. 1504–1517, maio 2004.
- LOMAX, A. E. et al. Effects of gastrointestinal inflammation on enteroendocrine cells and enteric neural reflex circuits. **Autonomic Neuroscience**, v. 126–127, p. 250–257, jun. 2006.
- LOMAX, A. E. et al. Sympathetic vasoconstrictor regulation of mouse colonic submucosal arterioles is altered in experimental colitis: Sympathetic regulation of colonic submucosal arterioles. **The Journal of Physiology**, v. 583, n. 2, p. 719–730, set. 2007.
- LOMAX, A. E.; ZHANG, J. Y.; FURNESS, J. B. Origins of cholinergic inputs to the cell bodies of intestinofugal neurons in the guinea pig distal colon. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 416, n. 4, p. 451–460, 24 jan. 2000.
- LOMAX, A. E.; FERNANDEZ, E.; SHARKEY, K. A. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 17, n. 1, p. 4–15, fev. 2005.
- LOURENSSEN, S.; WELLS, R. W.; BLENNERHASSETT, M. G. Differential responses of intrinsic and extrinsic innervation of smooth muscle cells in rat colitis. **Experimental Neurology**, v. 195, n. 2, p. 497–507, out. 2005.
- LUNDBERG, J. M. et al. Neuropeptide y- and alpha-adrenergic receptors in pig spleen: Localization, binding characteristics, cyclic amp effects and functional responses in control and denervated animals. **Neuroscience**, v. 24, n. 2, p. 659–672, fev. 1988.
- MANNING, B. P.; SHARKEY, K. A.; MAWE, G. M. Effects of PGE₂ in guinea pig colonic myenteric ganglia. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, n. 6, p. G1388–G1397, 1 dez. 2002.
- MASLIUKOV, P. M. et al. Development of non-catecholaminergic sympathetic neurons in para- and prevertebral ganglia of cats. **International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 40, p. 76–84, fev. 2015.
- MAYER, E. A.; COLLINS, S. M. Evolving pathophysiologic models of functional gastrointestinal disorders. **Gastroenterology**, v. 122, n. 7, p. 2032–2048, jun. 2002.
- MAZUMDAR, S.; DAS, K. M. Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in the colon from normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 87, n. 2, p. 176–181, fev. 1992.
- MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in**

Medical Sciences, v. 63, n. 1, p. 68–78, mar. 2018.

MONCADA, S.; BOLAÑOS, J. P. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1676–1689, jun. 2006.

MONGARDI FANTAGUZZI, C. et al. Identification of neuron types in the submucosal ganglia of the mouse ileum. **Cell and Tissue Research**, v. 336, n. 2, p. 179–189, maio 2009.

MORI, M. et al. Colonic blood flow responses in experimental colitis: time course and underlying mechanisms. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 289, n. 6, p. G1024–G1029, dez. 2005.

MOSCHEN, A. R.; WIESER, V.; TILG, H. Dietary Factors: Major Regulators of the Gut's Microbiota. **Gut and Liver**, v. 6, n. 4, p. 411–416, 15 out. 2012.

MOURAD, F. H.; TURVILL, J. L.; FARTHING, M. J. G. Role of nitric oxide in intestinal water and electrolyte transport. **Gut**, v. 44, n. 2, p. 143–147, 1 fev. 1999.

NESHAT, S. et al. Loss of purinergic vascular regulation in the colon during colitis is associated with upregulation of CD39. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 296, n. 2, p. G399–G405, fev. 2009.

NEUNLIST, M. et al. Glycine activates myenteric neurones in adult guinea-pigs. **The Journal of Physiology**, v. 536, n. Pt 3, p. 727–739, 1 nov. 2001.

NEUNLIST, M. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. **Gut**, v. 52, n. 1, p. 84–90, 1 jan. 2003.

NEUNLIST, M.; DOBREVA, G.; SCHEMANN, M. Characteristics of mucosally projecting myenteric neurones in the guinea-pig proximal colon. **The Journal of Physiology**, v. 517, n. 2, p. 533–546, jun. 1999.

NEUNLIST, M.; SCHEMANN, M. Nutrient-induced changes in the phenotype and function of the enteric nervous system: Nutrient-induced responses in the enteric nervous system. **so**, v. 592, n. 14, p. 2959–2965, 15 jul. 2014.

NEZAMI, B. G. et al. MicroRNA 375 mediates palmitate-induced enteric neuronal damage and high-fat diet-induced delayed intestinal transit in mice. **Gastroenterology**, v. 146, n. 2, p. 473–483.e3, fev. 2014.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.

NISHIDA, A. et al. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Clinical Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 1, p. 1–10, fev. 2018.

NURGALI, K. et al. Morphological and functional changes in guinea-pig neurons projecting to the ileal mucosa at early stages after inflammatory damage: Damage to myenteric neurons after inflammation. **The Journal of Physiology**, v. 589, n. 2, p. 325–339, 15 jan. 2011.

ORDÁS, I. et al. Ulcerative colitis. **The Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1606–1619, nov. 2012.

PADOVANI, R. M. et al. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 741–760, dez. 2006.

PADUA, D. et al. The Role of Neuropeptides in Mouse Models of Colitis. **Journal of molecular neuroscience: MN**, v. 59, n. 2, p. 203–210, jun. 2016.

PETERSON, D. A. et al. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Cell Host & Microbe**, v. 3, n. 6,

- p. 417–427, 12 jun. 2008.
- PNG, C. W. et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 105, n. 11, p. 2420–2428, nov. 2010.
- PORTBURY, A. L. et al. Cholinergic, somatostatin-immunoreactive interneurons in the guinea pig intestine: morphology, ultrastructure, connections and projections. **Journal of Anatomy**, v. 187 (Pt 2), p. 303–321, out. 1995.
- POULSEN, N. A. et al. Comparative analysis of inflamed and non-inflamed colon biopsies reveals strong proteomic inflammation profile in patients with ulcerative colitis. **BMC Gastroenterology**, v. 12, n. 1, p. 76, dez. 2012.
- PRAVDA, J. Radical induction theory of ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 16, p. 2371–2384, 28 abr. 2005.
- QIN, X. Etiology of inflammatory bowel disease: a unified hypothesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 15, p. 1708–1722, 21 abr. 2012.
- QU, Z.-D. et al. Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. **Cell and Tissue Research**, v. 334, n. 2, p. 147–161, nov. 2008.
- RACINE, A. et al. Dietary Patterns and Risk of Inflammatory Bowel Disease in Europe: Results from the EPIC Study. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 22, n. 2, p. 345–354, fev. 2016.
- RAMOS, G. P.; PAPADAKIS, K. A. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 94, n. 1, p. 155–165, jan. 2019.
- RANA, S. V. et al. Role of oxidative stress & antioxidant defence in ulcerative colitis patients from north India. p. 4, 2014.
- RASHVAND, S. et al. Dietary protein intakes and risk of ulcerative colitis. **Med J Islam Repub Iran**, v. 29, p. 7, 2015.
- REDDIX, R. A. et al. Constitutive nitric oxide release modulates neurally-evoked chloride secretion in guinea pig colon. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 86, n. 1–2, p. 47–57, 28 dez. 2000.
- RODE, J. et al. PGP 9.5, a new marker for human neuroendocrine tumours. **Histopathology**, v. 9, n. 2, p. 147–158, fev. 1985.
- S. PINTO, M. A. et al. Does active Crohn's disease have decreased intestinal antioxidant capacity? **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 7, n. 9, p. e358–e366, out. 2013.
- SAID, S. I.; MUTT, V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. **Science (New York, N.Y.)**, v. 169, n. 3951, p. 1217–1218, 18 set. 1970.
- SANDS, B. E. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. **Journal of Gastroenterology**, v. 42, n. 1, p. 16–25, jan. 2007.
- SANG, Q.; YOUNG, H. M. Chemical coding of neurons in the myenteric plexus and external muscle of the small and large intestine of the mouse. **Cell and Tissue Research**, v. 284, n. 1, p. 39–53, abr. 1996.
- SANLIOGLU, A. D. et al. Therapeutic potential of VIP vs PACAP in diabetes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 49, n. 3, p. R157-167, dez. 2012.
- SANOVIC, S.; LAMB, D. P.; BLENNERHASSETT, M. G. Damage to the Enteric Nervous System in Experimental Colitis. **The American Journal of Pathology**, v. 155, n. 4, p. 1051–1057, out. 1999.
- SARTOR, R. B.; WU, G. D. Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. **Gastroenterology**, v. 152, n. 2, p. 327- 339.e4, fev. 2017.
- SAYEGH, A. I.; RITTER, R. C. Morphology and distribution of nitric oxide

- synthase-, neurokinin-1 receptor-, calretinin-, calbindin-, and neurofilament-M-immunoreactive neurons in the myenteric and submucosal plexuses of the rat small intestine. **The Anatomical Record**, v. 271A, n. 1, p. 209–216, mar. 2003.
- SCHULTSZ, C. et al. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. **Gastroenterology**, v. 117, n. 5, p. 1089–1097, nov. 1999.
- SCHWALLER, B. The use of transgenic mouse models to reveal the functions of Ca²⁺ buffer proteins in excitable cells. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1820, n. 8, p. 1294–1303, ago. 2012.
- SEE, N. A.; BASS, P. Glucose-induced ion secretion in rat jejunum: a mucosal reflex that requires integration by the myenteric plexus. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 42, n. 1, p. 33–40, jan. 1993.
- SHAW, S. Y.; BLANCHARD, J. F.; BERNSTEIN, C. N. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 105, n. 12, p. 2687–2692, dez. 2010.
- SHERWOOD, N. M.; KRUECKL, S. L.; MCRORY, J. E. The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 6, p. 619–670, dez. 2000.
- SIȘU, A. M. et al. Enteric nervous system development in cavitory viscera allocated to the celiac plexus. **Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie**, v. 49, n. 1, p. 63–67, 2008.
- SORET, R. et al. Short-Chain Fatty Acids Regulate the Enteric Neurons and Control Gastrointestinal Motility in Rats. **Gastroenterology**, v. 138, n. 5, p. 1772- 1782.e4, maio 2010.
- STEELE, P. A.; BROOKES, S. J. H.; COSTA, M. Immunohistochemical identification of cholinergic neurons in the myenteric plexus of guinea-pig small intestine. **Neuroscience**, v. 45, n. 1, p. 227–239, jan. 1991.
- SUPLY, E. et al. Butyrate enemas enhance both cholinergic and nitrenergic phenotype of myenteric neurons and neuromuscular transmission in newborn rat colon. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 302, n. 12, p. G1373-1380, 15 jun. 2012.
- THE INTERNATIONAL IBD GENETICS CONSORTIUM (IIBDGC) et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 119–124, nov. 2012.
- THOMPSON, R. J. et al. PGP 9.5—a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. **Brain Research**, v. 278, n. 1–2, p. 224–228, nov. 1983.
- TIAN, T.; WANG, Z.; ZHANG, J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–18, 2017.
- TIMMERMANS, J. P. et al. Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Physiology**, v. 118, n. 2, p. 331–340, out. 1997.
- UNGARO, R. et al. Ulcerative colitis. **The Lancet**, v. 389, n. 10080, p. 1756–1770, abr. 2017.
- VAN DER WAAIJ, L. A. et al. Bacterial population analysis of human colon and terminal ileum biopsies with 16S rRNA-based fluorescent probes: commensal bacteria live in suspension and have no direct contact with epithelial cells.

- Inflammatory Bowel Diseases**, v. 11, n. 10, p. 865–871, out. 2005.
- VAN KLINKEN, B. J.-W. et al. Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis. **Gut**, v. 44, n. 3, p. 387–393, 1 mar. 1999.
- VENTO, P. et al. Quantitative Comparison of Growth-associated Protein-43 and Substance P in Ulcerative Colitis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 749–757, jun. 2001.
- VERREIJEN, A. M. et al. Effect of a high protein diet and/or resistance exercise on the preservation of fat free mass during weight loss in overweight and obese older adults: a randomized controlled trial. **Nutrition Journal**, v. 16, n. 1, p. 10, 6 fev. 2017.
- VIDAL-LLETJÓS, S. et al. Dietary Protein Intake Level Modulates Mucosal Healing and Mucosa-Adherent Microbiota in Mouse Model of Colitis. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 514, 28 fev. 2019.
- VOSS, U. et al. Enteric neuropathy can be induced by high fat diet in vivo and palmitic acid exposure in vitro. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81413, 2013.
- WANG, G.-D. et al. Dietary Glutamate: Interactions With the Enteric Nervous System. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. 20, n. 1, p. 41–53, 31 jan. 2014.
- WILHELM, M.; LAWRENCE, J. J.; GÁBRIEL, R. Enteric plexuses of two choline-acetyltransferase transgenic mouse lines: chemical neuroanatomy of the fluorescent protein-expressing nerve cells. **Brain Research Bulletin**, v. 111, p. 76–83, fev. 2015.
- WILSON, P. O. et al. The immunolocalization of protein gene product 9.5 using rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 69, n. 1, p. 91–104, fev. 1988.
- YAJIMA, T. Luminal propionate-induced secretory response in the rat distal colon in vitro. **The Journal of Physiology**, v. 403, p. 559–575, set. 1988.
- YOUNG, H. M. et al. Identification of neurons that express stem cell factor in the mouse small intestine. **Gastroenterology**, v. 115, n. 4, p. 898–908, out. 1998.
- YOUNG, R. L. et al. Disordered control of intestinal sweet taste receptor expression and glucose absorption in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 62, n. 10, p. 3532–3541, out. 2013.
- ZHAO, J. et al. Dietary Protein and Gut Microbiota Composition and Function. **Current Protein & Peptide Science**, v. 20, n. 2, p. 145–154, 28 nov. 2018.

5. ANEXOS



Londrina, 08 de abril de 2021.

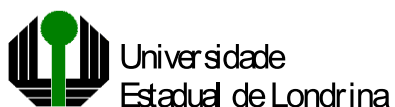
Ao Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEUA / UEL

Solicito avaliação e aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UEL) para inclusão de mais dois grupos experimentais ao projeto intitulado “**Efeitos da dieta hiperproteica sobre a retocolite ulcerativa experimental em camundongos**” o qual foi previamente aprovado por este comitê sob **OF. CIRC. CEUA nº 46/2020**, processo nº **1262.2020.47**. Os grupos experimentais a serem incluídos são:

- 1) **DP***: animais que receberão DP por 14 dias sem serem submetidos ao protocolo de indução de RCU experimental.
- 2) **DHP***: animais que receberão DHP por 14 dias sem serem submetidos ao protocolo de indução de RCU experimental.

Um total de 44 camundongos serão utilizados para a formação dos grupos complementares, sendo: 20 para a análise manométrica do cólon (n=10/grupo); 12 para análise histológica, dosagem de citocinas e análise de estresse oxidativo no tecido (n=6/grupo); 12 para análise de neurônios entéricos (n=6/grupo).

Os grupos serão formados por camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6 machos (20 – 25g) provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da UNICAMP. O transporte, manejo e demais procedimentos de cuidado e bem estar animal, previamente aprovados, **não** serão alterados com a aprovação desta solicitação. A inclusão destes grupos auxiliará na compreensão das alterações que a dieta hiperproteica pode causar na parede intestinal após os 14 dias de consumo, e como tais contribuem durante a fase de recuperação epitelial dos animais submetidos a RCU.



Ainda por meio deste, solicito avaliação e aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UEL) para utilizar o óleo, testículos, epidídimos, próstatas, ductos deferentes, glândulas seminais e espermatozoides dos animais pertencentes ao projeto intitulado **“Efeitos da dieta hiperproteica sobre a retocolite ulcerativa experimental em camundongos”** o qual foi previamente aprovado por este comitê sob **OF. CIRC. CEUA nº 46/2020**, processo nº **1262.2020.47**.

Sabe-se que o modelo de indução de RCU por DSS estimula o aumento da produção de óxido nítrico no íleo levando a inflamação. Analisar o íleo nos permitirá compreender os efeitos da dieta hiperproteica durante a RCU neste segmento intestinal, e por fim, comparar os achados com alterações encontradas no intestino grosso.

A avaliação dos testículos, epidídimos, próstatas, ductos deferentes, glândulas seminais e espermatozoides possibilitará a avaliação da possível relação de quadros de colite sobre o sistema reprodutor masculino, uma vez que não há estudo prévio sobre essa relação. Justifico essa solicitação pelo fato de que a RCU atinge homens em idade reprodutiva e que muitos deles possuem diagnóstico de infertilidade idiopática. Esses órgãos serão submetidos a análises histopatológicas, funcionais e bioquímicas em parceria com a Profa Dra Glaura S. A. Fernandes (BIO/ CCB /UEL). Informo também que os demais procedimentos de cuidados e bem estar animal, previamente aprovados, não serão alterados com a aprovação desta solicitação.

Atenciosamente

Eduardo José de Almeida Araújo
Coordenador do projeto



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 46/2020

Londrina, 30 de abril de 2020.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto intitulado: "Efeitos da dieta hiperproteica sobre a retocolite ulcerativa experimental em camundongos" protocolo CEUA n° 1262.2020.47 sob a responsabilidade de Eduardo José de Almeida Araújo, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UDEL) em **30/04/2020**.

Este projeto tem por objetivo avaliar as consequências do consumo de uma dieta hiperproteica antes, durante e após a indução experimental de retocolite ulcerativa para o intestino delgado e grosso de camundongos C57BL/6. **Grau de invasividade: 2.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/05/2020 a 01/05/2023
Espécie/ linhagem/ raça	Camundongos isogênicos C57BL/6
N° de animais	154
Peso/ Idade	20-25g/ 2 meses
Sexo	Machos
Origem	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da UNICAMP.
Amostras a serem coletadas	Sangue, jejuno, cólon total.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UDEL anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,

Maria Fernanda R. Graciano
Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UDEL

Profª Drª Maria Fernanda
Rodrigues Graciano
Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
ceua@uel.br / (43) 3371-5454

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr (a). **Eduardo José de Almeida Araújo**

Responsável pelo projeto

C/C para a Chefia do Departamento de Histologia/ CCB

C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas

PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PLEXO MIOENTERICO E SUBMUCOSO PARA ÍLEO DE CAMUNDONGO

1º ETAPA

1. Lavagem com PBS 3 X 5 minutos
2. Bloqueio antigênico - 2 horas
 - PBS + triton X100 0,5% + BSA 2% + Soro de burro 20%
3. Lavagem com PBS 3 X 5 minutos
4. Incubação com anticorpo primário - 48 horas
 - PBS + triton X100 0,5% + BSA 1% + Soro de burro 10%
 - Anticorpo produzido em coelho contra PGP9.5 (1:1000)
 - Anticorpo produzido em cabra contra nNOS (1:500)
 - Anticorpo produzido em cabra contra Calretinina (1:1200)

2º ETAPA

5. Lavagem com PBS 3 X 5 minutos
6. Incubação com anticorpo secundário - 2 horas
 - PBS + triton X100 0,5% + BSA 1% + Soro de burro 10%
 - 488 anticorpo contra IgG de coelho produzido por burro (1:500)
 - 568 anticorpo contra IgG de cabra produzido por burro (1:500)
7. Lavagem com PBS 3 X 5 minutos
8. Montagem das lâminas