



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA CRISTINA ALVES MACHADO

**EFEITOS DE UMA DIETA HIPERPROTEICA SOBRE PARÂMETROS
HISTOPATOLÓGICOS DO CÓLON DE CAMUNDONGOS C57BL/6
COM RETOCOLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR DEXTRAN
SULFATO DE SÓDIO (DSS)**

Londrina
2023

CAMILA CRISTINA ALVES MACHADO

**EFEITOS DE UMA DIETA HIPERPROTEICA SOBRE PARÂMETROS
HISTOPATOLÓGICOS DO CÓLON DE CAMUNDONGOS C57BL/6
COM RETOCOLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR DEXTRAN
SULFATO DE SÓDIO (DSS)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo

Londrina
2023

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

Machado, Camila Cristina Alves.

Efeitos de uma dieta hiperproteica sobre os parâmetros histopatológicos do cólon de camundongos C57BL/6 com Retocolite Ulcerativa induzida por Dextran Sulfato de Sódio (DSS) / Camila Cristina Alves Machado. - Londrina, 2023.

78 f. : il.

Orientador: Eduardo José de Almeida Araújo.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Inflamação intestinal - Tese. 2. Retocolite Ulcerativa - Tese. 3. Dieta - Tese. 4. Sistema Nervoso Entérico - Tese. I. Araújo, Eduardo José de Almeida . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

CAMILA CRISTINA ALVES MACHADO

**EFEITOS DE UMA DIETA HIPERPROTEICA SOBRE PARÂMETROS
HISTOPATOLÓGICOS DO CÓLON DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM
RETOCOLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR DEXTRAN SULFATO DE SÓDIO
(DSS)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr Eduardo José de Almeida Araújo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Alessandra L. Cecchini Armani
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Dra Débora de Mello Gonçalves Sant Ana
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Profa. Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 26 de abril 2023

Não foram preciso palavras.
Se hoje sei o que é amor foi porque vocês me mostraram
Se hoje estou aqui, foi porque vocês me apoiaram
Aos meus pais, Alberto e Rosimeire,
dedico este trabalho de pesquisa

AGRADECIMENTOS

“Não que eu seja tanta coisa, sou um grão de areia na imensidão, mas cabe quase o mundo inteiro no meu peito”

Aos meus pais que sempre estiveram comigo e que nunca me disseram que algo era impossível. São as pessoas mais sábias que eu conheço e as que eu mais admiro.

Aos meus irmãos e minhas sobrinhas. As vezes a distância não ajuda, mas cuidado, amor e carinho não tem barreiras. Parece “*cliché*”, mas não é.

Às minhas amigas mais chegadas que entenderam a minha demora em responder ligações e mensagens nos últimos anos. Sou um pouco enrolada, confesso, mas amo todas vocês: Joana, Isabela, Keila e Andreia.

A todas as pessoas que o doutorado me proporcionou conhecer. Todos, aqueles direta e indiretamente contribuíram para que este percurso pudesse ser concluído. Em especial aos professores que contribuíram com meu crescimento! Ensinar é um ato de amor e exige muita coragem e dedicação, vidas são transformadas através de vocês.

Ao Professor Eduardo Araújo que sempre me ajudou em tudo. Não existem palavras para descrever o quanto sou grata. A realidade em que nasci e cresci não é ruim, porém, ela segue um padrão, e a tendência é que as coisas continuem iguais. E pessoas como o você, Professor, são essenciais para que isto mude. Muito obrigada pelas oportunidades concedidas, por todo conhecimento e sabedoria. Você é um exemplo para mim, Professor!

A Deus, agradeço, por tudo. Deixei por último, não porque seja o menos importante, mas devido a fato de que sem Ele ou sem Sua orientação eu não conhecia nenhuma das pessoas acima mencionadas.

“Mas se tiver que definir em uma só palavra, resumir a minha história numa só canção, se dessa vida eu levasse um só nome, Ele é Cristo”

*Eu aprendi qual é o valor de um sonho alcançar
Eu entendi que o caminho pedras terá
Eu vi em campo aberto se erguer construção
E foi com muitas pedras, e foi com muitas mãos*

*Eu vi o meu limite vir diante de mim
Eu enfrentei batalhas que eu não venci
Mas o troféu não é de quem não fracassou
Eu tive muitas quedas, mas não fiquei no chão
(Pedro Valença, 2019)*

MACHADO, Camila Cristina Alves. **Efeitos de uma dieta hiperproteica sobre parâmetros histopatológicos do cólon de camundongos C57BL/6 com Retocolite Ulcerativa induzida por Dextran Sulfato de Sódio (DSS)**. 2023. 78f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

A incidência de Retocolite Ulcerativa (RCU) aumentou nos últimos anos e a tendência é que em países cuja prevalência da doença é alta, o número se estabilize com passar do tempo, enquanto nos demais ele continue aumentando. Frente a isto, é essencial compreender como os diferentes fatores que podem estar relacionados ao seu desenvolvimento e/ou exacerbação, como é o caso da dieta hiperproteica. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos do consumo de uma dieta hiperproteica durante a indução experimental de RCU para o intestino grosso de camundongos C57BL/6. Para isto camundongos C57BL/6 machos foram distribuídos em 4 grupos experimentais: DP (alimentados com dieta padrão); HP (alimentados com dieta hiperproteica); DP/DSS (alimentados com dieta padrão e induzidos a RCU); e, HP/DSS (alimentados com dieta hiperproteica e induzido a RCU). Para indução da RCU experimental, os camundongos foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água contendo dextran sulfato de sódio a 3% durante sete dias. A ração hiperproteica continha o dobro de teor proteico que a padrão e a fonte utilizada foi a caseína e a proteína de soja. Foram avaliados o índice de atividade da doença (DAI), trânsito gastrointestinal, análise de fenótipo de fezes e avaliação dos neurônios do plexo mioentérico e submucoso do cólon. Como resultado observou-se que os camundongos que ingeriram a dieta hiperproteica apresentaram sinais clínicos da doença mais intensos e isso resultou em DAI maior quando comparado aos demais grupos. Encurtamento do cólon foi observado em ambos os grupos induzidos a RCU, alimentados com a dieta hiperproteica e com a dieta padrão. O escore histológico entre os grupos DSS também foi semelhante e diferiu em relação aos controles. Todavia, as alterações a nível de sistema nervoso entérico foram mais intensas no cólon distal de camundongos alimentados com a dieta hiperproteica. Foram observadas mudanças numéricas e morfológicas em todas as populações neuronais avaliadas indicando possíveis alterações funcionais. Embora o trânsito gastrointestinal, o peso bruto e o percentual de água nas fezes não tenham diferido

entre os grupos experimentais, a expressiva alteração na consistência das fezes e diminuição no número de pellets expelidos por dia pelos camundongos que ingeriram a dieta hiperproteica demonstram que perturbações podem estar ocorrendo no intestino grosso como resultado das alterações no plexo mioentérico e submucoso. Logo, para uma maior compreensão de como a dieta hiperprotéica pode influenciar a saúde dos indivíduos com RCU, a interação entre proteínas da alimentação e sistema nervoso entérico precisa ser mais bem explorada. Todavia, os resultados encontrados destacam que os nutrientes presentes no lúmen intestinal podem modular a atividade dos diferentes componentes presentes na parede intestinal, principalmente em indivíduos com RCU.

Palavras-chave: Retocolite ulcerativa; dietas; proteínas; cólon.

MACHADO, Camila Cristina Alves. **Effects of a high-protein diet on histopathological parameters of the colon of C57BL/6 mice with ulcerative colitis induced by Dextran Sulfate Sodium (DSS)**. 2023. 7f. Doctoral Thesis in Experimental Pathology. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

The incidence of Ulcerative Colitis (UC) has increased in recent years. In countries where the prevalence of the disease is high, the number will be stabilizing over time, while in others will continue to increase. So, it is essential to understand how the different factors that may be related to its development and/or exacerbation, as is the case with a high-protein diet. Thus, the aim of this research was to evaluate the repercussions of consuming a high-protein diet during the experimental induction of UC in the large intestine of C57BL/6 mice. For this, male C57BL/6 mice were distributed into 4 experimental groups: DP (fed standard diet); HP (fed with high protein diet); DP/DSS (fed standard diet and induced to UC); and HP/DSS (fed a high-protein diet and induced UC). To induction of experimental UC, the mice were kept in cages with free access to water containing 3% sodium dextran sulfate for seven days. The high-protein diet contained twice protein as the standard diet and the source used was casein and soybean. The disease activity index (DAI), gastrointestinal transit, analysis of feces phenotype and evaluation of colonic myenteric plexus neurons were evaluated. As a result, it was observed that the mice that ingested the high-protein diet showed more intense clinical signs of the disease, and this resulted in a higher DAI when compared to the other groups. Colon shortening was observed in both UC-induced groups fed the high-protein diet and the standard diet. The histological score between DSS groups was also similar and differed from controls. However, changes in the enteric nervous system were more intense in the distal colon of mice fed a high-protein diet. Numerical and morphological changes were observed in all evaluated neuronal populations, indicating possible functional alterations. Although the gastrointestinal transit, the gross weight, and the percentage of water in the feces did not differ between the experimental groups, the expressive change in the consistency of the feces and the decrease in the number of pellets expelled per day by the mice that ingested the high-protein diet demonstrate that disturbances can be occurring in the large intestine because of changes in the myenteric and submucosal plexus. Therefore, for a better understanding of how a high-protein diet can influence the health

of individuals with UC, the interaction between dietary proteins and the enteric nervous system needs to be better explored. However, the results found highlight that the nutrients present in the intestinal lumen can modulate the activity of the different components present in the intestinal wall, mainly in individuals with UC.

Key-words: Ulcerative colitis; diets; proteins; colon.

LISTA DE FIGURAS DA TESE

Figura 1. Disrupção do epitélio induzida pelo DSS.....	25
Figura 2. Inervação extrínseca do TGI	27
Figura 3. Organização do sistema nervoso entérico	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS DA REVISÃO DA LITERATURA

Ach	Acetilcolina
ATP	Trifosfato de Adenosina
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BCFA	Ácidos graxos de cadeia ramificada
Ca ⁺⁺	Cálcio
CCK	Colecistocinina
CEG	Células entéricas gliais
CGRP	Calcitonin gene related peptide
ChAT	Colina acetiltransferase
5-HT	Serotonina
CMMC	Complexos motores de migração do cólon
CXCL8	Ligante de quimiocina 8
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DC	Doença de Crohn
DII	Doenças Inflamatórias Intestinais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRG	Gânglios de raiz dorsal
DSS	Dextran sulfato de sódio
EC	Células Enterocromafins
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
IFN	Interferon
IL	Interleucinas
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IPANs	Intrinsic primary afferent neurons
K	Potássio
kDa	Quilodalton
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
Na ⁺	Sódio
NETs	Neutrophil Extracellular Traps

NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Natural Killer
NKA	Neuroquinina A
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS	Óxido nítrico sintase
NPY	Neuropeptídeo Y
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PCL	Fosfolipase C
PepT1	Transportador de peptídeos 1
PKC	Proteína quinase C
RCU	Retocolite Ulcerativa
SCFA	Ácidos graxos de cadeia curta
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TGI	Trato Gastrointestinal
Th1	T <i>helper</i> 1
Th2	T <i>helper</i> 2
Th17	T <i>helper</i> 17
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TLR	<i>Toll Like Receptors</i>
Treg	Linfócitos T reguladores
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1. Disease activity index (A), body mass loss (B), fecal hematochezia/blood score (C), fecal consistency score (C) and histological inflammation score of DSS-induced ulcerative colitis mice fed a standard diet or hyperproteic diet.....	57
Figure 2. Water/DSS (A) and feed intake (B) of the animals during the experimental period of DSS-induced ulcerative colitis.	58
Figure 3. Number (A), mass (B and C) of pellets/day, amount of water in the feces (D) and gastrointestinal transit time (E) of the animals during the experimental period of DSS-induced ulcerative colitis.	59
Figure 4. Weight of total colon (A), proximal colon (B), distal colon (C) and spleen (D) of DSS-induced ulcerative colitis mice fed a standard diet or hyperproteic diet	61
Figure 5. Population density of neurons in the proximal (A) and distal (C) colon projected to the area of the analyzed segment. Area of the cell body of general (PGP 9.5 ⁺), nitrenergic (nNOS ⁺) and estimated cholinergic neurons (PGP 9.5 ⁺ / nNOS ⁻) of the proximal (B) and distal (D) colon.	62
Figure 6. An illustration the labeling of total (PGP 9.5 ⁺) and nitrenergic neurons (nNOS ⁺) in myenteric plexus of proximal colon. Arrows indicate some neurons estimated to be cholinergic	63
Figure 7. An illustration the labeling of total (PGP 9.5 ⁺) and nitrenergic neurons (nNOS ⁺) in myenteric plexus of distal colon. Arrows indicate some neurons estimated to be cholinergic	64
Figure 8. Population density of neurons in the proximal (A) and distal (C) colon projected to the area of the analyzed segment. Area of the cell body of general (PGP 9.5 ⁺), calretinin strong (Calr ⁺⁺) and calretinin weak (Calr ⁺) of the proximal (B) and distal (D) colon.	65
Figure 9. A illustration the labeling of total (PGP 9.5 ⁺) and calretinin weak (Calr ⁺) and strong (Calr ⁺⁺) in submucosal plexus of proximal colon. Arrows indicate examples of neurons Calr ⁺	66
Figure 10. A illustration the labeling of total (PGP 9.5 ⁺) and calretinin weak (Calr ⁺) and strong (Calr ⁺⁺) in submucosal plexus of distal colon. Arrows indicate examples of neurons Calr ⁺	67

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1. Composition of standart and high-protrein diets.....	54
Table 2. Disease activity index (DAI)	55
Table 3. Histological findings of colitis	56
Table 4. Area, length and width of the total, proximal and distal colon of DSS-induced colitis mice fed a standard diet or hyperproteic diet.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS DO ARTIGO

BSG	British Society of Gastroenterology
ESPEN	European Society for Clinical Nutrition and Metabolism
DAI	Disease Activity Index
ENS	Enteric Nervous System
HE	Hematoxylin and eosin
IBD	Inflammatory bowel disease
PFA	Paraformaldehyde
UC	Ulcerative Colitis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 RETOCOLITE ULCERATIVA (RCU).....	21
2.1.1 Fisiopatologia da RCU	21
2.1.2 Curso clínico, sintomas e tratamento da RCU	24
2.1.3 RCU experimental induzida por Dextran Sulfato de Sódio (DSS).....	25
2.2 CIRCUITOS NEURONAIS DO TRATO GASTROINTESTINAL (TGI).....	26
2.2.1 Inervação extrínseca do cólon	27
2.2.2 Inervação intrínseca do cólon	28
2.2.3 Principais neurotransmissores do SNE.....	31
2.2.4 Motilidade intestinal e os reflexos de secreção e vasodilatação	32
2.3 INFLUÊNCIA DA DIETA NA SAÚDE INTESTINAL E NO SNE	34
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4. ARTIGO CIÊNTÍFICO	38
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
6. REFERÊNCIAS UTILIZADA NA TESE	69
ANEXOS.....	76
ANEXO A – Carta da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	77

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) compreendem um grupo de doenças crônicas que acometem o trato gastrointestinal (TGI). A doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU) são suas principais representantes (KAPPELMAN *et al.*, 2008; KAISER; ZEISSIG; BLUMBERG, 2010). Por causarem inflamação e desordens funcionais no TGI, a DC e a RCU apresentam sintomas clínicos semelhantes que incluem diarreia, dor abdominal, sangramento retal e perda de peso (BAUMGART; SANDBORN, 2007).

Quanto as suas diferenças, a DC pode causar inflamação em qualquer parte do TGI, desde a boca até o reto (SEYEDIAN; NOKHOSTIN; MALAMIR, 2019), enquanto a RCU acomete principalmente a parte terminal do íleo, cólon e reto (KAISER; ZEISSIG; BLUMBERG, 2010). Elas diferem também quanto a extensão da inflamação na parede intestinal, visto que a DC causa um processo inflamatório que pode atingir todas as camadas, desde o epitélio até a muscular, e na RCU as principais alterações localizam-se principalmente na região da mucosa (BAUMGART; SANDBORN, 2007).

Não existe cura para as DII e por isto indivíduos com estas patologias terão que conviver com elas ao longo de sua vida. Sua persistência traz como consequências principais para pessoas com DC problemas na pele e o desenvolvimento de cálculos biliares. Já a RCU, quando presente a mais de 8 anos, pode causar osteoporose e estar associada ao desenvolvimento de câncer do cólon retal (MEHDIZADEH *et al.*, 2007).

Um estudo evidenciou que a incidência de DII no Brasil, mais especificamente na cidade de São Paulo, era de 13,3 novos casos para cada 100 mil habitantes por ano e a prevalência da doença era de 52,6 casos por 100 mil habitantes (GASPARINI; SASSAKI; SAAD-HOSSNE, 2018). Quando estes números são analisados em conjunto a pesquisa de outros autores (VICTORIA; SASSAKI; NUNES, 2009; PARENTE *et al.*, 2015; LIMA-MARTINS; VOLPATO; ZAGO-GOMES, 2018) fica evidente que a prevalência e incidência da DII aumentaram nos últimos anos no Brasil e que a maior parte dos casos se localizam nas regiões mais desenvolvidas (QUARESMA; KAPLAN; KOTZE, 2019).

Os fatores que desencadeiam o surgimento das DII são desconhecidos, porém, é reconhecido que a predisposição genética associada a gatilhos exógenos e endógenos podem levar ao seu desenvolvimento. Isso pode incluir fatores ambientais, imunológicos, agentes infecciosos, microbioma, estilo de vida e a própria dieta (JACOBS *et al.*, 2016; LODDO; ROMANO, 2015).

Sabe-se que por meio da alimentação ocorre a chegada de inúmeros antígenos ao lúmen intestinal e cabe as células residentes diferenciar nutrientes de patógenos e toxinas (MARGOLIS; GERSHON, 2016). Variações na dieta levam a produção de diferentes metabólitos microbianos intestinais que podem interferir na regulação gênica local e na síntese proteica resultando em alterações na barreira epitelial intestinal e na regulação do sistema imune (DAVID *et al.*, 2014; RICHARDS *et al.*, 2016). Frente a isto, muitos estudos buscam entender o papel da dieta no surgimento, exacerbação ou prevenção das DII (ANANTHAKRISHNAN *et al.*, 2015; KNIGHT-SEPULVEDA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2017).

É importante destacar que estudos epidemiológicos já demonstram um aumento na incidência de RCU em populações adeptas à uma alta ingestão proteica (RASHVAND *et al.*, 2015). Isto ocorre pois o consumo em excesso de proteínas pode causar mudanças na produção de metabólitos microbianos (GEYPENS *et al.*, 1997), aumento da permeabilidade intestinal (LLEWELLYN *et al.*, 2018), 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 (CUI; KIM, 2018; LAN *et al.*, 2016).

O sistema nervoso entérico (SNE) exerce importante papel na geração de sinais clínicos e sintomas DII (BRIERLEY; LINDEN, 2014; MOYNES *et al.*, 2014). Entretanto, poucas pesquisas abordaram como a dieta, mais especificamente a do tipo hiperproteica, pode modular os neurônios entéricos durante este quadro inflamatório. Assim, a presente pesquisa partiu da pergunta: uma dieta com elevada quantidade de proteínas durante a fase ativa da RCU pode interferir no curso inflamatório e induzir modificações á nível de SNE?

Para melhor compreensão sobre a temática, a presente tese encontra-se dividida em três partes principais: a primeira contém uma revisão de literatura elencando informações essenciais para o entendimento do estudo, a segunda os objetivos do trabalho e a terceira o artigo resultante do projeto de pesquisa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RETOCOLITE ULCERATIVA (RCU)

A RCU é uma inflamação crônica que acomete indivíduos de ambos os sexos e inicia-se entre a segunda e quarta década de vida (SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017). Nota-se que a incidência de RCU aumentou nos últimos anos e a tendência é que em países cuja prevalência da doença é alta, o número se estabilize com passar do tempo, enquanto nos demais ele continue aumentando (KAPLAN *et al.*, 2019). Visto que esta doença, assim como a DC, causa grande prejuízo a qualidade de vida e aumenta o risco para o desenvolvimento de câncer de colorretal, é necessário compreender os fatores que tem contribuído para o aumento em sua incidência e prevalência.

Por ser uma doença idiopática, ainda não existem fatores que podem ser associados diretamente ao desenvolvimento da RCU (KUCCHARZIK *et al.*, 2020). Pressupõe-se que ela seja o resultado de uma desregulação do sistema imunológico em resposta a mudanças no microambiente intestinal (JACOBS *et al.*, 2016). Logo, os principais fatores de risco para a RCU de acordo com Kobayashi *et al.* (2020) são uso de antibióticos, alterações na dieta, consumo em excesso de alimentos industrializados que contém aditivos alimentares como estabilizantes, espessantes, corantes e flavorizantes, histórico familiar e doenças psiquiátricas. Estes fatores de risco são considerados “gatilhos” para o desenvolvimento da RCU em indivíduos que são geneticamente pré-dispostos.

2.1.1 Fisiopatologia da RCU

Fisiologicamente, a resposta imunológica do intestino grosso é hábil em identificar e eliminar possíveis patógenos que podem penetrar através da barreira epitelial e causar danos (TOMMASO; GASBARRINI; PONZIANI, 2021). Essa defesa é indispensável para o organismo pois inúmeros microrganismos e antígenos adentram o corpo humano por intermédio da alimentação e caso não sejam identificados e neutralizados podem desencadear processos patológicos (PAONE;

CANI, 2020). Células dendríticas, *natural killer* (NK) e neutrófilos reconhecem os antígenos presentes no intestino e promovem sua eliminação a fim de manter a homeostase local (ALLAIRE *et al.*, 2018).

Além das células do sistema imune inato, existe uma camada de muco revestindo o epitélio do cólon e ela atua como uma barreira físico-química que separa a mucosa intestinal de bactérias e outros antígenos que estão no lúmen (PAONE; CANI, 2020). Células caliciformes presentes na mucosa secretam glicoproteínas denominadas de mucinas que posteriormente se unem e formam a barreira de muco. As mucinas podem ser ácidas ou básicas, e permanecem ancoradas a membrana ou são secretadas (JOHANSSON *et al.*, 2008).

Todavia, mesmo frente a estas defesas, alguns antígenos presentes no lúmen conseguem se aproximar da parede do intestino, e nesse momento, complexos juncionais que promovem a coesão entre as células epiteliais irão impedir sua translocação para o interior da parede (SUZUKI, 2020). As junções de aderência, desmossomos e “*tight junctions*” embora apresentem funções específicas atuam em conjunto na manutenção e regulação da barreira epitelial intestinal (PARADIS *et al.*, 2021).

As bactérias que estão no lúmen intestinal, a microbiota residente, convive com o hospedeiro simbioticamente (STRANDWITZ *et al.*, 2018). Ou seja, sua presença é benéfica para o ser humano pois esses microrganismos contribuem para manutenção da resposta imune local, absorvem e metabolizam hidratos de carbono e proteínas formando ácidos graxos de cadeia curta, regulam a motilidade local e impedem que o intestino seja colonizado por patógenos prejudiciais (CRYAN *et al.*, 2019). Entretanto, diferentes fatores podem levar a alterações na microbiota do intestino, como por exemplo, uso de antibióticos, *stress* e mudanças e na alimentação (TOMMASO; GASBARRINI; PONZIANI, 2021).

Assim, para o desenvolvimento da RCU, aumento na permeabilidade acompanhada de alterações na integridade do epitélio intestinal devem ocorrer devido a alterações na expressão de diferentes proteínas de junção e mudanças na microbiota intestinal (KOBAYASHI *et al.*, 2020). As bactérias que normalmente encontram-se no lúmen aproximam-se da parede intestinal por causa da redução da camada protetora de muco e conseguem invadir o epitélio intestinal que se encontra rompido. Isto leva a ativação da resposta imune local e o desenvolvimento da inflamação aguda (DU; HA, 2020).

Receptores *Toll-like* (TLR) presentes no epitélio intestinal reconhecem os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) levando a ativação de macrófagos e células apresentadoras de antígenos (APCs) que passam a liberar quimiocinas que atraem outras células imunológicas para o local (KOBAYASHI *et al.*, 2020).

Os neutrófilos formam a primeira linha de defesa por meio das *neutrophil extracellular traps* (NETs) que visam capturar os patógenos (DINALLO *et al.*, 2019). Intensifica-se a produção de fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL) do tipo 12, 23 e 6 no local da inflamação levando a ativação de uma resposta T *helper* 1 (Th 1) com o objetivo principal de fagocitar as bactérias invasoras (KAŁUZNA; OLCZYK; KOMOSI NSKA-VASSEV, 2022).

As respostas T *helper* 2 (Th2) e T *helper* 17 (Th17) exercem também um importante papel na fisiopatologia da RCU (IMAM *et al.*, 2018). Elas são ativadas por macrófagos e células dendríticas e promovem a produção de TNF- α , interferon gama (IFN- γ) e IL-13. Sabe-se que a IL-13 pode induzir a apoptose de células epiteliais e alterar a composição das proteínas de junção. Tudo isto contribui para uma maior disfunção da barreira epitelial associada a intensificação da resposta inflamatória (KAŁUZNA; OLCZYK; KOMOSI NSKA-VASSEV, 2022).

Linfócitos T reguladores (Treg) são inibidos pela IL-36 produzida pelas células epiteliais intestinais (LEON; HUSSEY; WALSH, 2021). A IL-36 é uma citocina pertencente à família da IL-1 que induz a um *status* pró-inflamatório por meio da ativação do fator nuclear *kappa B* (NF- κ B) e de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Como resultado, mais mediadores inflamatórios são produzidos e liberados resultando no recrutamento celular e intensificação inflamação (YUAN *et al.*, 2019). Concomitantemente as *NETs* produzidas pelos neutrófilos exercem efeitos citotóxicos diretos sobre as células epiteliais e a integridade da parede fica ainda mais prejudicada (DINALLO *et al.*, 2019).

Leucócitos circulantes são recrutados para o local da inflamação através da liberação de moléculas de atração como a IL-8 e o ligante de quimiocina 8 (CXCL8) pelas células do epitélio intestinal amplificando a inflamação (ZHU *et al.*, 2021). Como consequência da intensa chegada e ativação de células imunológicas, a concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio aumenta no cólon, resultando em estresse oxidativo e intensificação do dano tecidual. Destacam-se o ânion superóxido, ácido hipocloroso e peróxido de hidrogênio (WAN *et al.*, 2022).

Logo, o desenvolvimento, intensificação e estabelecimento da RCU é mediado pela liberação mediadores pro-inflamatórios, recrutamento de células imunes e produção de grandes quantidades de ERO no epitélio intestinal (WAN *et al.*, 2022).

2.1.2 Curso clínico, sintomas e tratamento da RCU

O curso típico da RCU são quadros recorrentes de ativação e remissão da inflamação intestinal (SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017). Os sintomas mais comuns da doença são diarreia acompanhada da presença de sangue nas fezes, porém, de acordo com a severidade da inflamação pode ocorrer dor abdominal, presença de muco nas fezes, tenesmo e desidratação. Geralmente a intensidade dos sintomas associa-se a extensão do dano a mucosa, ou seja, quanto maior for, mais severas são as manifestações clínicas da doença (FEUERSTEIN *et al.*, 2019).

A gravidade da RCU é classificada em leve, severa e fulminante com base nos seguintes parâmetros: presença de sangue nas fezes, temperatura corporal, frequência cardíaca, níveis de hemoglobina, taxa de sedimentação de eritrócitos, sinais clínicos, número de evacuações diárias, consistência das fezes, achados nos exames histológicos e de imagem (SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017).

Pacientes com RCU leve evacuam de 4 a 5 vezes ao dia e a presença de sangue nas fezes nem sempre é identificada. Aqueles com RCU severa evacuam mais de 6 vezes ao dia, a presença de sangue é visível e apresentam taquicardia, anemia, febre e marcadores inflamatórios elevados. Já os com quadros fulminantes da doença, evacuam com sangue mais de 10 vezes ao dia, necessitando de transfusão e a dilatação do cólon é visível em exames radiográficos (DANESE; FIOCCHI, 2011).

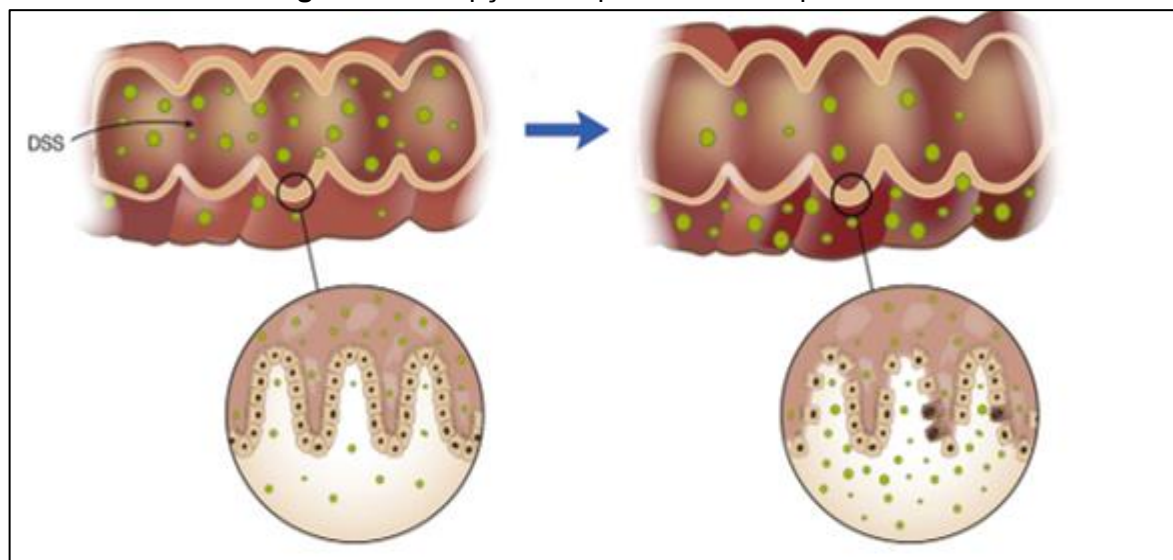
Durante a fase ativa da inflamação o tratamento padrão consiste no uso de medicamentos que auxiliarão no controle da inflamação e da sintomatologia. O uso de corticosteroides tem melhorado a qualidade de vida dos pacientes e aumentado a sobrevida, porém, em alguns casos, o tratamento cirúrgico é requerido (SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017). Tiopurinas são usadas durante a fase da remissão com o propósito principal de impedir que a inflamação volte a ficar ativa (FEUERSTEIN *et al.*, 2019).

2.1.3 RCU experimental induzida por Dextran Sulfato de Sódio (DSS)

Atualmente existem vários modelos experimentais de RCU que possibilitam que diferentes facetas da doença sejam compreendidas, como por exemplo, patogênese, sintomatologia, diagnóstico e tratamento (KIESLER; FUSS; STROBER, 2015). A escolha do protocolo que faz uso do Dextran Sulfato de Sódio (DSS) ocorre na maioria das vezes devido a sua facilidade de reprodução e manejo (CHASSAING *et al.*, 2015).

O DSS é um polissacarídeo solúvel em água cujo peso molecular pode variar entre 5 a 1400 kDa, entretanto, a RCU é induzida por meio da administração de DSS com 40 a 50 kDa (CHASSAING *et al.*, 2015). Ele provoca danos a camada epitelial do intestino possibilitando a disseminação de bactérias para dentro da parede intestinal (Figura 1). Como resultado, um processo inflamatório é desencadeado localmente com o recrutamento de células imunes e produção de mediadores pró-inflamatórios (KIESLER; FUSS; STROBER, 2015).

Figura 1. Disrupção do epitélio induzida pelo DSS



Fonte: Kiesler; Fuss e Strober (2015, p.157)

Os primeiros sinais da RCU podem ser identificados após o primeiro dia de administração do DSS e eles resultam do aumento na produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumento da permeabilidade intestinal resultante de alterações na expressão de proteínas de junção (KIESLER; FUSS; STROBER, 2015). Pressupõe-se que ele adentre a mucosa do cólon por meio da formação de nano-lipo

complexos com ácidos graxos de cadeia média e induza a erosão e dano a parede por ser tóxico a células (CHASSAING *et al.*, 2015).

Para mimetizar quadros agudos, crônicos ou recidivas da inflamação intestinal, os modelos experimentais podem variar quanto ao tempo de administração do DSS e a porcentagem fornecida aos animais (OKAYASU *et al.*, 1990). Para indução da RCU é sugerida a utilização de 2 a 5% de DSS dissolvidos em água e como a microbiota intestinal é um fator essencial para o desenvolvimento do quadro inflamatório, os animais utilizados precisam ter a mesma origem e linhagem (CHASSAING *et al.*, 2015).

É importante destacar que embora o DSS seja utilizado para mimetizar a RCU humana em modelos murinos, o quadro inflamatório gerado apresenta algumas distinções. Em humanos a presença de neutrófilos nas criptas e no epitélio da mucosa é comum na RCU, todavia, na indução da inflamação por DSS nota-se que células imunológicas mais proeminentes são os linfócitos (KIESLER; FUSS; STROBER, 2015).

2.2 CIRCUITOS NEURONAIS DO TRATO GASTROINTESTINAL (TGI)

Devido as recidivas da RCU, importantes alterações funcionais podem ocorrer no cólon como consequência do quadro inflamatório. O TGI é inervado intrinsecamente por uma rede de neurônios e feixes nervosos, o SNE. (HOLLAND *et al.*, 2021). Brierley e Linden (2014) destacam que os sinais clínicos e sintomas das DII, como diarreia e dor, são em grande parte transmitidos por neurônios que se encontram na parede do cólon e captam as alterações locais.

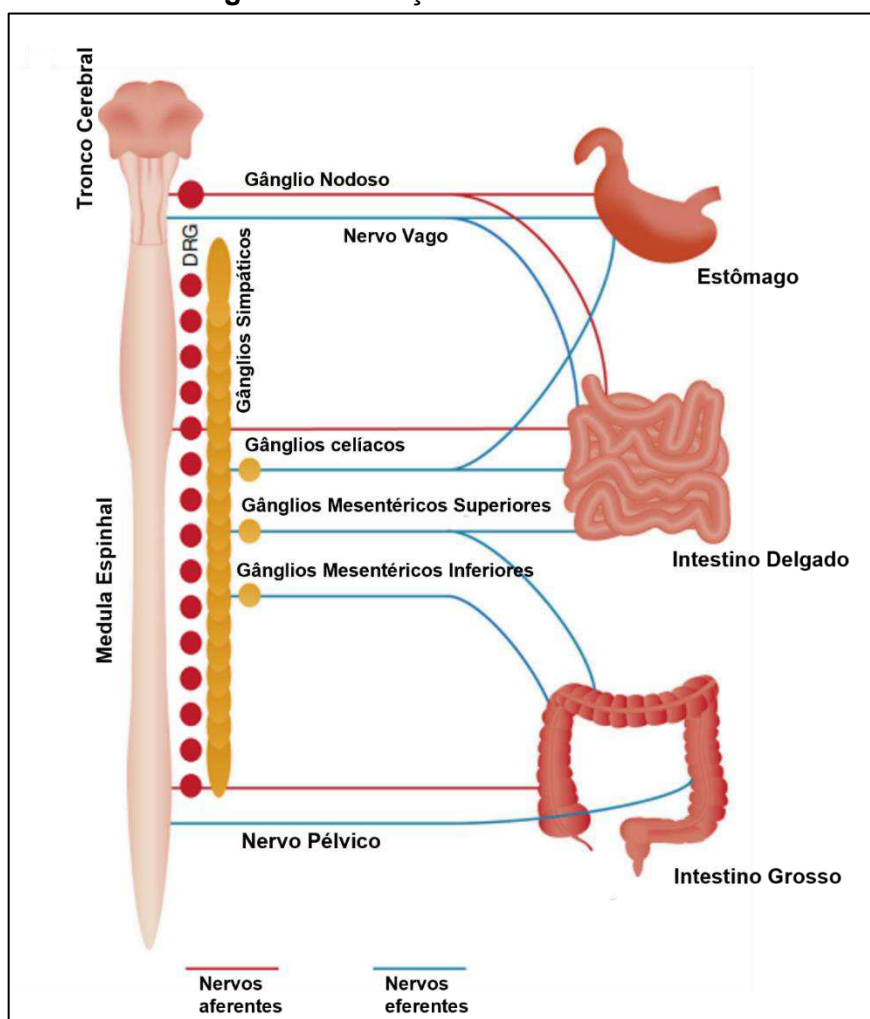
Entre as alterações no SNE resultantes da RCU que já foram descritas na literatura destacam-se redução e/ou aumento no número de neurônios entéricos de populações neuronais específicas, hipertrofia ou atrofia neuronal, redução da síntese e liberação de neurotransmissores, e comprometimento da secreção de água e eletrólitos pelo epitélio colônico (MOYNES *et al.*, 2014). Estudos correlacionando os danos ao SNE causado pela RCU em associação a diferentes tipos dieta ainda são escassos, porém, antes de avançar com a discussão é imprescindível apresentar a inervação extrínseca e intrínseca do TGI, seus neurotransmissores e como acontece o processo de motilidade e secreção.

Anatomicamente o TGI pode ser dividido em região superior e inferior. A primeira é formada pela boca, faringe, esôfago e estômago, enquanto a segunda pelo intestino delgado e grosso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Uma vez que o presente trabalho tem como foco principal o cólon, as informações a respeito da inervação extrínseca e intrínseca do TGI aqui apresentadas encontram-se relacionadas a este segmento.

2.2.1 Inervação extrínseca do cólon

Extrínsecamente o TGI é innervado por processo nervosos oriundos de vias parassimpáticas e simpáticas que se originam do tronco encefálico e medula espinhal, conforme é possível observar na Figura 2 (FURNESS *et al.*, 2014).

Figura 2. Inervação extrínseca do TGI



Fonte: Adaptado de Jacobson *et al.* (2021)

O nervo vago é um dos mais mencionados quando se trata de inervação extrínseca do TGI. Ele origina-se na medula oblonga e inerva os músculos que compõem a faringe e a laringe promovendo a deglutição e vocalização (BREIT *et al.*, 2018). No estômago e intestino delgado atua regulando o processo de contração da musculatura lisa e secreção glandular (FURNESS *et al.*, 2004). No intestino grosso, a inervação vagal é composta principalmente pela via eferente e tem uma menor influência quando comparada ao intestino delgado, entretanto, tem se mostrado um alvo terapêutico importante para o tratamento de DII, especialmente da DC (BONAZ, 2018).

Já a inervação simpática atua no intestino grosso promovendo a inibição da motilidade, vasoconstrição e bloqueio da secreção glandular. Isto acontece por intermédio da liberação de catecolaminas, principalmente de epinefrina que se ligam nos receptores β -adrenérgicos das células alvo (CERVI; LUKEWICH; LOMAX, 2014). O cólon, mais especificamente a região distal e o reto, são inervados por axônios oriundos de nervos pélvicos (FURNESS, 2012).

Os corpos celulares de neurônios eferentes que inervam o cólon se agrupam e formam gânglios de raiz dorsal (DRG, do inglês "*dorsal root ganglia*") (SPENCER; HU, 2020). Morfologicamente, são neurônios pseudo-unipolares que apresentam processos nervosos que promovem a comunicação entre Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP) (JACOBSON *et al.*, 2021). Os principais neurotransmissores destes neurônios são a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP, do inglês "*calcitonin gene related peptide*") (ENGEL *et al.*, 2012).

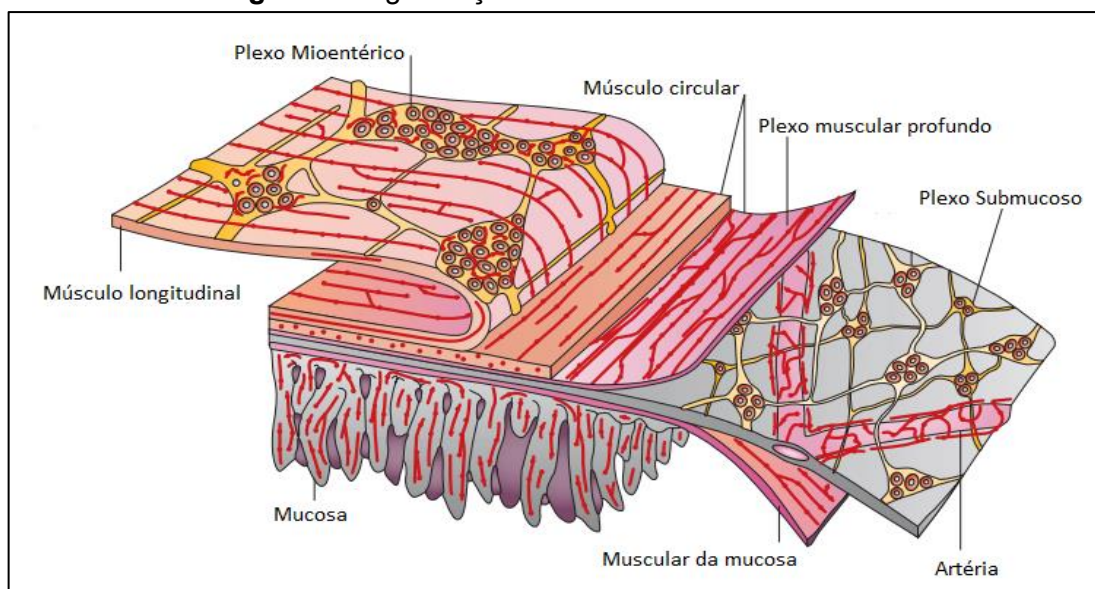
2.2.2 Inervação intrínseca do cólon

A distribuição do SNE ao longo da parede do TGI, embora possa apresentar diferenças regionais, tem início no esôfago, passa por estômago, intestino delgado e intestino grosso, finalizando na região anal (LYTE; CRYAN, 2014). É importante compreender que embora o SNE possa ser regulado pelo SNC, ou seja, receber e enviar estímulos por intermédio de neurônios originados no tronco encefálico ou

medula espinhal, uma de suas principais características é a capacidade de atuar de forma independente (FURNESS, 2012).

O SNE é constituído de plexos ganglionados e aganglionados que são nomeados de acordo com sua localização e função (FURNESS; STEBBING, 2017). Assim, no cólon, entre as camadas musculares externas encontra-se o plexo mioentérico ou de *Auerbach*, e mais internamente, logo abaixo da mucosa e da sua muscular, o plexo submucoso, chamado também de *Meissner* (FURNESS, 2012). Os plexos aganglionados, que se distinguem dos demais pela ausência de corpos celulares de neurônios, podem ser identificados entre as camadas da parede do TGI e recebem nomes conforme a sua localização (Figura 3).

Figura 3. Organização do sistema nervoso entérico



Fonte: Furness (2012)

O plexo mioentérico é responsável pela motilidade intestinal e seus gânglios são grandes, bem delimitados e estão associados a feixes nervosos formando uma malha extensiva. Já plexo submucoso é formado por fibras nervosas mais finas e gânglios menores e sua função principal é regular o fluxo de água no cólon por intermédio da secreção de cloreto (FURNESS, 2006) (Figura 3). Os principais tipos de neurônios que inervam intrinsicamente o colón são: neurônios motores, interneurônios e neurônios aferentes intrínsecos primários (IPANs sigla do inglês “*intrinsic primary afferent neurons*”) (FURNESS, 2000).

No plexo mioentérico encontram-se os neurônios motores inibitórios e excitatórios da musculatura lisa do intestino (FURNESS, 2006). Os interneurônios presentes ali podem ser classificados em ascendentes ou descendentes de acordo com a direção de seus axônios. Sua principal função é promover a comunicação entre diferentes partes do intestino, sinalizando para os neurônios motores o momento em que devem promover o relaxamento ou contração da musculatura lisa (SPENCER; HU, 2020).

Já no plexo submucoso os neurônios motores são divididos em secretomotores/vasodilatadores e secretomotores (FURNESS, 2000). Os interneurônios são mais escassos e geralmente se projetam de forma unilateral para o plexo mioentérico. De acordo com Furness (2006), sua principal função é promover a comunicação entre os plexos do SNE.

Os IPANs compreendem em neurônios cujo corpo celular por ser encontrado em ambos os plexos, mioentérico e submucosos, e cujo axônios estão projetados para a mucosa ou camadas musculares a fim de detectar variações químicas e físicas (FURNESS *et al.*, 2004). Existem ainda os neurônios aferentes extrínsecos primários que se diferenciam dos IPANs por seus corpos celulares estarem localizados fora do SNE (FURNESS, 2006).

Os IPANs mioentéricos são responsáveis por detectar distorções nas camadas musculares e mudanças químicas no lúmen e por isto seus axônios encontram-se projetados para a musculatura externa do intestino ou para a mucosa (FURNESS *et al.*, 2004). Enquanto os IPANs submucosos identificam distorções físicas e variações químicas no lúmen e suas terminações nervosas localizam-se unicamente na mucosa (FURNESS, 2006).

Junto com os corpos neuronais que formam os gânglios estão as células entéricas gliais (CEG), um conjunto de células satélites nucleadas que auxiliam na manutenção do SNE (GULBRANSEN; SHARKEY, 2012). Elas conseguem interagir com o microambiente intestinal e outras células gliais através de vasto repertório de sinais de cálcio e são essenciais para o desenvolvimento, sobrevivência e diferenciação neuronal (OCHOA-CORTES *et al.*, 2016).

Para manter a homeostase no TGI, os constituintes do SNE necessitam interagir entre si e com células efectoras, sejam elas células musculares lisas, enterócitos, células imunes, entre outros. A comunicação e transmissão de

informações ocorre através da liberação de diferentes tipos de neurotransmissores na fenda sináptica.

2.2.3 Principais neurotransmissores do SNE

A acetilcolina (ACh) é sintetizada pelos neurônios motores excitatórios através da ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT). Ela é o principal neurotransmissor excitatório do plexo mioentérico e após sua síntese fica armazenada em vesículas dentro dos neurônios. Quando requerida é liberada por exocitose e atua por meio da ligação a receptores muscarínicos ou nicotínicos presentes na membrana pós-sináptica (VENTURA *et al.*, 2010).

Os receptores muscarínicos presente na musculatura lisa intestinal são o M3 e M2 e a cascata de sinalização que eles disparam para que ocorra a contração difere (LECCI, SANTICIOLI e MAGGI, 2002). Normalmente, o M3 é o mais envolvido na contração intestinal e desencadeia a liberação de cálcio (Ca^{++}) dos depósitos intracelulares associada ativação de fosfolipase C (PCL) e proteína quinase C (PKC) (FURNESS, 2006).

A ligação da ACh com receptores M2 por sua vez inibe a ação da adenilato ciclase reduzindo a capacidade desta enzima de inibir a contração muscular (GERTHOFFER, 2005). Existem ainda os receptores nicotínicos de ACh que após sua ligação ao neurotransmissor mudam de conformação permitindo a entrada de íons de sódio (Na^{+}) para o meio intracelular (VENTURA *et al.*, 2010).

Normalmente a ligação da ACh a receptores nicotínicos acontece quando é requerida uma resposta de contração mais rápida, porém, com uma duração menor. Por outro lado, a ativação de receptores muscarínicos leva a um tônus muscular mais sustentado (VENTURA *et al.*, 2010). Neurônios motores excitatórios também podem apresentar receptores para substância P e neuroquinina A (NKA) (FURNESS, 2006).

O óxido nítrico (NO) por sua vez é o neurotransmissor inibitório da musculatura lisa mais proeminente, mas o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e o trifosfato de adenosina (ATP) também podem ser utilizados para identificar esta classe de neurônios (SANDERS *et al.*, 2012). Tanto o NO quanto o VIP, promovem relaxamento da musculatura intestinal por meio da ativação de canais de potássio (K) e da diminuição da sensibilidade ao Ca^{++} (LECCI, SANTICIOLI e MAGGI, 2002).

O NO é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) que apresenta três isoformas: NOS neuronal (nNOS), NOS induzida (iNOS) e NOS endotelial (eNOS). No caso da nNOS ela é produzida e liberada por neurônios presentes no SNC e SNP, promovendo além do relaxamento muscular, a regulação da plasticidade neuronal (HAN *et al.*, 2021).

Normalmente, neurônios submucosos liberam Ach ou VIP e por isto estes dois neurotransmissores são utilizados para diferenciá-los. Assim, neurônios colinérgicos podem ser secretomotores/vasodilatadores ou secretomotores que não promovem a vasodilatação, ao passo que os VIPérgicos são somente secretomotores/vasodilatadores (FURNESS, 2006).

Fantaguzzi *et al.* (2009) apresentam a calcitonina como um neurotransmissor útil para diferenciar neurônios VIPérgicos e colinérgicos. Os autores identificaram que existe dois padrões de imunomarcagem quando este neurotransmissor é utilizado, sugerindo que neurônios fortemente imunomarcados provavelmente liberam Ach enquanto os demais, menos imunomarcados, são VIPérgicos.

O neuropeptídeo Y (NPY), somatostatina, CGRP, taquicinas e calbindina podem ser identificados também no plexo submucoso, porém, são utilizados em menor escala em estudos (FURNESS *et al.*, 2003).

2.2.4 Motilidade intestinal e os reflexos de secreção e vasodilatação

A motilidade intestinal compreende nos padrões de movimento realizados pela musculatura lisa que tem como objetivo principal promover a propulsão do conteúdo luminal ao longo do TGI. Eles podem variar de acordo com região do intestino e são coordenados pelo SNE por meio da captação de mudanças no microambiente luminal (SMITH; PARK; HENNIG, 2014).

Li *et al.* (2019) apresentam que o cólon de camundongos realiza os seguintes padrões de movimento: segmentação e peristalse. As contrações segmentares são responsáveis pela mistura do conteúdo luminal e caracterizam-se como contrações fásicas resultantes da despolarização das células musculares lisas sem influência direta dos neurônios do SNE (SPENCER; HU, 2020). Pressupõe-se que estes movimentos são desencadeados pela presença de nutrientes no lúmen intestinal,

através de um mecanismo que envolve a liberação de colecistocinina (CCK) e serotonina (5-HT) (FUNG; BERGHE, 2020).

O peristaltismo, por sua vez, acontece somente através de influência direta do SNE. Células enterocromafins (EC) presentes no epitélio intestinal captam mudanças químicas ou físicas no lúmen e produzem 5-HT, que de acordo com Furness (2006), é um potente estimulador de IPANs. Estes neurônios captam as informações e transmite para os interneurônios ascendentes e descendentes que coordenam o movimento de contração ou relaxamento de determinadas regiões do cólon para passagem do quimo.

No cólon proximal predomina-se as contrações segmentares visando a mistura do conteúdo luminal para facilitar a reabsorção de água, enquanto na região distal, o bolo fecal é expelido através de ondas peristálticas que formam os complexos motores de migração do cólon (CMMC). Além disto, as conexões entre os neurônios do SNE são mais complexas na região proximal que responde de forma mais intensa a ACh. Outra grande diferença entre as regiões é que no cólon proximal os CMMC são gerados de forma constante, já no distal eles são dependentes da presença de conteúdo no lúmen (LI *et al.*, 2019).

Diferentes estímulos podem desencadear os reflexos de secreção e vasodilatação no TGI, incluindo alterações mecânicas, presença de patógenos, variações químicas e ainda detecção de determinados nutrientes, como por exemplo, a glicose no lúmen (FUNG; BERGHE, 2020). Estes reflexos ocorrem na maior parte do cólon e são regulados por meio de vias aferentes simpáticas (FURNESS, 2006).

Os reflexos iniciam-se a partir da ativação dos IPANs pela 5-HT liberada pelas células EC do epitélio intestinal quando detectam variações no meio luminal. Após isto, eles podem seguir três vias distintas, sendo que a primeira envolve a ativação de um único neurônio, geralmente um IPAN submucoso, que capta a informação e já promove a secreção como resposta. A segunda é mediada por IPANs que se comunicam com neurônios secretomotores e secretomores/vasodilatadores que respondem ao estímulo por meio da secreção e/ou vasodilatação. Enquanto a terceira abrange também neurônios mioentéricos, finalizando na ativação da secreção e/ou vasodilatação (FUNG; BERGHE, 2020).

Os reflexos de secreção no cólon são ativados tanto em situações fisiológicas, como nas patológicas. Na região proximal, eles são essenciais pois promovem a reabsorção de água através da secreção de cloreto, visando a homeostase corporal

(FURNESS, 2006). Além disto, a vasodilatação mediada pelo plexo submucoso regula o fluxo sanguíneo no órgão (FUNG; BERGHE, 2020).

2.3 INFLUÊNCIA DA DIETA NA SAÚDE INTESTINAL E NO SNE

Alterações funcionais no SNE podem estar relacionadas a patogênese de diferentes processos patológicos e isto indica que existe uma relação muito estreita entre a homeostase intestinal e a saúde dos indivíduos (KHOSHBIN; CAMILLERI, 2020). Diante disto, muitas pesquisas têm buscado compreender como a dieta pode contribuir para a regulação das funções intestinais e concomitantemente auxiliar na saúde do organismo como um todo.

Todavia, a presença em excesso de determinados nutrientes no intestino, como por exemplo de proteínas, não interfere unicamente no processo de secreção e motilidade, mas pode causar alterações na barreira intestinal por provocar mudanças na integridade e/ou permeabilidade do órgão (LLEWELLYN *et al.*, 2018).

De acordo com Cui e Kim (2018), a ingestão em excesso de proteínas pode exacerbar um quadro inflamatório já estabelecido no intestino. Por outro lado, pesquisadores como Lan *et al.* (2016) e Liu, Wang e Hu (2017) demonstraram que a suplementação de proteínas e aminoácidos contribui positivamente para o processo de restauração do epitélio intestinal após um quadro inflamatório agudo.

Uma vez que as consequências da ingestão de proteínas em quantidades acima do recomendado, tanto para indivíduos saudáveis quanto para os com RCU, é uma temática recorrente, principalmente no que diz respeito a manutenção da integridade e permeabilidade intestinal, compreender como acontece o processo de digestão das proteínas e absorção dos aminoácidos ao longo do TGI é imprescindível para discussões mais aprofundadas sobre a temática.

As proteínas ingeridas são inicialmente quebradas em partículas menores na boca através da mastigação. No estômago, a ação da pepsina em associação ao movimento peristáltico promove a proteólise de forma limitada possibilitando que peptídeos cheguem ao duodeno como forma de sinalizar a composição do quimo (LOVEDAY, 2022). No duodeno, bile e enzimas pancreáticas são adicionadas ao conteúdo luminal, já bicarbonato, muco e água são excretados ao longo de todo o

jejuno e íleo para facilitar o trânsito do quimo pelo intestino delgado (LE FEUNTEUN *et al.*, 2021).

Para serem absorvidos os peptídeos que chegam ao jejuno necessitam ser clivados em aminoácidos, dipeptídeos ou tripeptídeos. Existem duas classes de enzimas que auxiliam neste processo: endopeptidases e exopeptidases. A primeira abrange a pepsina, tripsina e quimiotripsina, e a segunda classe é composta pelas aminopeptidases e carboxipeptidases (VAN DER VELDEN; HULSMANN, 1999).

As endopeptidases promovem a dissolução das ligações internas dos peptídeos formando moléculas menores, os di e tripeptídeos que adentram os enterócitos através do transportador de peptídeos 1 (PepT1), um transportador que atua de forma dependente de prótons (WANG *et al.*, 2017). As exopeptidases atuam nas porções N-terminal e C-terminal dos peptídeos promovendo a liberação de aminoácidos que são co-transportados com Na⁺ através dos enterócitos (VAN DER VELDEN; HULSMANN, 1999).

Pressupõe-se que mais de 80% de toda proteína ingerida seja absorvida no intestino delgado, porém, uma pequena porção pode chegar ao intestino grosso em forma de proteína não digerida, peptídeo ou aminoácido (LOVEDAY, 2022). Estas moléculas são utilizadas pela microbiota residente para o seu próprio metabolismo culminando na produção de diferentes metabólitos (DALLAS *et al.*, 2022).

Os principais metabólitos microbianos produzidos neste processo são amônia, sulfeto de hidrogênio (H₂S), ácidos graxos de cadeia curta (SCFA, do inglês “*short-chain fatty acids*”), ácidos graxos de cadeia ramificada (BFA do inglês “*branched-chain fatty acids*”), aminas e compostos aromáticos (BLACHIER; ANDRIAMIHAJA; KONG, 2022). Yao, Muir e Gibson (2016) destacam que a capacidade de os produtos gerados pela fermentação de proteínas no cólon exercer danos locais e sistêmicos depende de sua concentração no lúmen intestinal e isso é regulado principalmente pela capacidade de desintoxicação do próprio epitélio colônico e do teor proteico consumido.

Elevados níveis de amônia, por exemplo, podem afetar a capacidade absorptiva dos colonócitos, intensificar o processo de renovação das células da mucosa e induzir produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios (ANDRIAMIHAJA *et al.*, 2010; PIEPER *et al.*, 2012). Já os compostos aromáticos, como o p-cresol, e as aminas podem induzir a destruição da barreira epitelial do cólon por provocarem dano

ao ácido desoxirribonucleico (DNA) das células (BINGHAM *et al.*, 1996; TODEN *et al.*, 2006).

A exposição prolongada ao H₂S por sua vez, prejudica a respiração celular e causa danos ao DNA resultando na morte por apoptose dos colonócitos e células caliciformes (COOPER; BROWN, 2008). Porém, as consequências do aumento na quantidade de SCFA e BCFA no cólon ainda continuam a ser investigadas, entretanto, elas podem envolver alterações na secreção de íons e água pelo epitélio colônico (YAO; MUIR; GIBSON, 2016).

Além disto, mudanças na microbiota intestinal podem ocorrer quando a quantidade de proteínas que chega ao cólon intensifica-se (BLACHIER; ANDRIAMIHAJA; KONG, 2022). Aumento de *Clostridium perfringens* e redução na população de *Bifidobacterium spp* já foram identificados em estudos *in vitro* (SHEN; CHEN YA; TUOHY, 2010). Os efeitos deste tipo de alteração no microambiente luminal do cólon continuam a ser estudados, porém, pressupõe-se que estejam relacionados a uma maior susceptibilidade à colonização patogênica do segmento e a produção de moléculas que causam danos a mucosa intestinal (HEO *et al.*, 2009; ROUND; MAZMANIAN, 2009).

Alguns metabolitos gerados e aminoácidos podem causar efeitos no SNE, de forma direta e indireta, influenciando a motilidade e secreção. Aumento de H₂S no lúmen, por exemplo, leva a maior secreção intestinal e inibição da motilidade intestinal (QUAN *et al.*, 2015). Existem ainda bactérias que aumentam em número e são capazes de produzirem aminas que atuam como neurotransmissores tanto no SNE quanto no SNC (YAO; MUIR; GIBSON, 2016).

Visto que a ingestão em excesso de proteínas pode influenciar não somente a microbiota intestinal, mas a integridade da parede e o SNE, compreender as nuances disto durante a RCU é primordial para os indivíduos acometidos por esta doença.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as repercussões do consumo de uma dieta hiperproteica durante a indução experimental de Retocolite Ulcerativa (RCU) para o intestino grosso de camundongos C57BL/6.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer os efeitos da ingestão do dobro de proteínas sobre os sinais clínicos da RCU induzida por DSS em camundongos através da análise do índice de atividade da doença;
- Identificar se a dieta hiperproteica intensifica as alterações funcionais no cólon decorrentes da RCU por meio da análise de fenótipo de fezes e análise de tempo de trânsito;
- Avaliar a densidade populacional e a morfometria do corpo celular da população total e subpopulações de neurônios nitrérgicos e estimados colinérgicos visando investigar os efeitos da dieta hiperproteica no plexo mioentérico do cólon de camundongos com RCU;
- Avaliar a densidade populacional e a morfometria do corpo celular da população total e subpopulações de neurônios colinérgicos e VIPérgicos visando investigar os efeitos da dieta hiperproteica no plexo submucoso do cólon de camundongos com RCU.

4. ARTIGO CIÊNTÍFICO

***EXCESS PROTEIN INTAKE EXACERBATES CLINICAL SIGNS AND NEURONAL
CHANGES IN COLON OF MICE WITH DSS-INDUCED ACUTE ULCERATIVE
COLITIS***

Camila Cristina Alves Machado¹; Vinicius Balan Ramos Coronado¹; Larissa da Silva Bonassa¹; Yasmin Gonçalves de Oliveira Santos¹; Giovanni Bruno Clivati Sodré¹; Andréia Carla Eugênio Pupim¹; Alexandre Oba²; Eduardo José de Almeida Araújo¹

1. Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Histologia, Londrina, Brasil;
2. Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Zootecnia, Londrina, Brasil.

Corresponding author

Prof. Eduardo José de Almeida Araújo

Departamento de Histologia, Universidade Estadual de Londrina

Rodovia Celso Garcia Cid PR 445, Km 380, 86051-990, Londrina, PR, Brasil

Phone: +55 (43) 3371 4327

ejaaraujo@gmail.com

ABSTRACT

Ulcerative colitis (UC) is a chronic, idiopathic inflammatory process that affects individuals of both sexes, starting mainly during the most productive phase of life. Although there is no factor that can directly lead to the development of UC, today, it is understood that diet, especially the high-protein type, may be related to its establishment and modulate inflammation during the active phases of the disease. Thus, the study aimed to evaluate the effects on the colon of C57BL/6 mice of consuming a high-protein diet during the active phase of UC. For this, male C57BL/6 mice were distributed into 4 experimental groups: SD (fed standard diet); HP (fed with high protein diet); SP/DSS (fed standard diet and induced to UC); and HP/DSS (fed a high-protein diet and induced UC). The disease activity index, gastrointestinal transit, analysis of feces phenotype and evaluation of colonic myenteric plexus neurons were evaluated. As a result, it was observed that the HP/DSS group mice showed more intense clinical signs of the disease and more lesions in the myenteric and submucosal plexus of the colon. Therefore, it is concluded that a high-protein diet, i.e., twice the amount of protein compared to that recommended for mice, based on casein and soybean meal, contributed to the intensification of the clinical signals of acute UC, and caused more intense changes in the morphometry and population density of myenteric and submucosal neurons of distal colon.

Keywords: IBD; high-protein diet; enteric nervous system.

INTRODUCTION

Ulcerative Colitis (UC) is an inflammatory bowel disease (IBD) that affect individuals of both sexes and usually begin between the second and fourth decade of life (SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017). This disease lead to a significant decline in people's quality of life because do not have a linear course or cure, interspersing moments of remission and activation of intestinal inflammation (SEYEDIAN; NOKHOSTIN; MALAMIR, 2019).

The incidence of UC has increased in last decade and the trend is that in countries where the prevalence of the disease is high, the number stabilizes over time,

while in others it continues to increase (KAPLAN *et al.*, 2019). There are not factors that directly triggers the UC, but it's known they are expressed as the result of a combination of intrinsic and environmental factors (SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017). Thus, the presence of certain genes and even the composition of the individual's intestinal microbiota act as risk factors. Aspects related to the environment, such as diet and lifestyle, act as triggers for its development (JARMAKIEWICZ-CZAJA *et al.*, 2022).

The pathogenesis of IBD involves an abnormal activation of the intestinal immune system in response to changes in the luminal microenvironment and in mucosal integrity (CHANG, 2020). In this sense, there are gene regions related to the regulation of the body's defense that are altered in patients with IBD (SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017). The diet, in turn, can trigger changes in the intestinal microbiota resulting in alterations in the gene expression of different proteins that are related to the regulation of intestinal permeability and local immune response. Thus, the diet has great potential to promote an enabling environment and to mitigate the development of IBD, especially UC (SUGIHARA; KAMADA, 2021).

Currently, it is recommended that healthy individuals consume an average of 0.8 g/Kg/day of protein (RODRIGUEZ; MILLER, 2015). However, there are studies that demonstrate that Brazilian population residing in large urban centers, such as São Paulo and Rio de Janeiro, consumes up to 1.2 g/Kg or 1.4 g/Kg daily, when comparing women and men respectively (MAFRA; LEAL, 2016). As for individuals with IBD, the ideal amount of protein for patients in remission or activation phase is not well known. According to the British Society of Gastroenterology (BSG) the consumption of protein-rich foods be avoided, especially in the active phase of the disease (LAMB *et al.*, 2019). On the other hand, the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN) recommends an increase in protein intake to 1.2 - 1.5 g/Kg/day during the period of intestinal inflammation (FORBES *et al.*, 2017).

In active phase of IBD the protein turnover is increased and, therefore, an increase in protein intake is necessary for the maintenance of bodily functions during the acute phase, including the synthesis of cytokines and molecules associated with intestinal inflammation (SCALDAFERRI *et al.*, 2017; VIDAL-LLETJÓS *et al.*, 2021). But it should be considered that the amount of protein in the diet is directly related to the intensity of the fermentation process of undigested proteins in the colon. So, high-protein diets can increase the production of different metabolites by the intestinal

microbiota, such as p-cresol, ammonia, short-chain fatty acids, branched-chain fatty acids and hydrogen sulfide, which damage intestinal epithelial cells intensifying the inflammatory condition of IBD (YAO; MUIR; GIBSON, 2016). In healthy individuals, this process can trigger local inflammatory reactions, increasing susceptibility to diseases such as UC (AHN; JEONG; KIM, 2022).

All these chemical and structural changes in the intestinal wall cause modulations in the innervation of the colon, which can lead to the appearance or intensification of signs and symptoms of IBD. The colon has an extrinsic and an intrinsic innervation, known as the enteric nervous system (ENS). The scientific literature is sparse in terms of studies that seek to understand how a diet, especially a high-protein diet, can modulate enteric neurons during an inflammatory condition. Thus, the present study aimed to evaluate the effects on the colon of C57BL/6 mice of consuming a diet with 44% protein during the active phase of UC.

MATERIAL AND METHODS

All procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals the State University of Londrina, Brazil (Reference Number: 046/20).

Animals

Male C57BL/6 mice (*Mus musculus*) aged 2 months were used. During the experiment, the animals were kept in standard polypropylene boxes in the sectorial animal house of the Histology Department of the State University of Londrina with controlled temperature ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and light/dark cycle of 12/12 hour. All animals received food and water ad libitum.

Diets

Both diets used in this experiment, were development at Animal Science Department of the State University of Londrina. They were made based on the nutritional requirements for mice and their compositions are detailed in Table 1. The

standard diet had soybean as a protein source, while the high-protein diet had soybean and casein.

The high-protein diet was produced with twice the protein content when compared to the standard. This protein percentage was established based on the average consumption of the Brazilian population, which can be up to twice the recommended amount (MAFRA; LEAL, 2016). Thus, the standard diet had 22% protein in its composition, while the high-protein contained 44%. Furthermore, to prevent the amount of calories from influencing the evaluated parameters, the diets used were adapted to become isocaloric.

Acute experimental colitis

For induction of experimental acute UC, mice were kept in cages with free access to autoclaved water containing 3% DSS (MP Biomedicals - 40kDa) for seven days (WATANABE *et al.*, 2023).

Experimental groups

The mice were randomly distributed into four experimental groups: (1) SD - animals that received standard diet for 7 days without being submitted to experimental UC; (2) HP - animals that received high-protein diet for 7 days without being submitted to experimental UC; (3) SD/DSS - animals that received standard diet during the experimental UC induction period; and, (4) HP/DSS - animals that received high-protein during the experimental UC induction period.

During the experimental period was performed daily monitoring of the animals' body mass, diet intake rate and water consumption.

Pellet output analysis

Analysis of the stool phenotype consisted of counting the number of pellets expelled by each mice every 24 hours. In addition, the gross mass of pellets output was obtained using an aid of precision scale of 0.005 grams. After drying, overnight at 60°C, the dry mass of the feces was measured to determine the percentage of water present in the feces.

Disease activity index (DAI)

The DAI was calculated daily based on the following parameters: percentage of weight loss, stool consistency and presence of blood in the stool/rectum (LAFFIN *et al.*, 2019). For each parameter, a scale from 0 to 4 was used, as shown in Table 2. The occult blood test was performed only in animals that did not have hematochezia or apparent blood in the feces. The DAI consisted of the sum of the score of each of the analyzed parameters. The maximum total value that could be achieved daily per animal was 12.

Gastrointestinal transit

Gastrointestinal transit was performed the day before euthanasia of all experimental groups. It was evaluated after oral gavage of 0,1 mL of a non-absorbable marker (3% Carmine Red—Corantec; 0.5% Methylcellulose—Campo Drugstore). Animals were then placed into individual cages with free access to food and water. Gastrointestinal transit was expressed as the time of the appearance of the first red fecal pellet after gavage (MACHADO *et al.*, 2021).

Euthanasia and material collection

All animals were euthanized on the 7th day of the experimental period by inhalation of halothane (Tanohalo® - Cristália) followed by cervical dislocation. Out of respect for the lives of the animals, mice that showed a significant reduction in body mass (<18%) were euthanized regardless of the experimental day. A vertical laparotomy was performed to removal of the total colon (proximal and distal). All intestinal segments were weighed, and their length and circumference were also measured to obtain the total area. Considering possible changes in the intestinal area, the weight of segments was adjusted according to this measurement. The spleen also collected and weighed.

Histological analysis of the intestinal wall

For histological analysis one-centimeter samples of the proximal and distal colon were fixed in buffered paraformaldehyde (PFA) pH 7.4 for 3 hours and embedded in paraffin. Five-micrometer sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and used for histological evaluation of the damage to the colon wall. So, inflammation, spread of inflammation, mucosal epithelium integrity, crypt damage and goblet cell depletion were analyzed in three histological sections of samples from each animal. Each parameter a score was attributed according to the histological findings according to Table 3 (DIELEMAN *et al.*, 1998).

Immunofluorescence

Proximal and distal colon samples were fixed in buffered PFA for 3 hours and then stored in 0.1M phosphate-saline buffer + 0.08% sodium azide at 4°C until microdissection using a stereomicroscope to obtaining whole-mount containing the myenteric and submucosal plexus.

The whole-mount containing the myenteric plexus was submitted to immunofluorescence protocol to evidenced total and nitrenergic neurons. PGP9.5 polyclonal antibody (PA5-29012/ Invitrogen; dilution 1:1000) was used to immunolabeling total neurons and, anti-nNOS polyclonal antibody (GTX89962/ Genetex; 1:500) to nitrenergic neurons. Enteric neurons PGP9.5⁺/nNOS⁻ were considered cholinergic neurons. In the whole-mount containing the submucosal plexus to immunolabeling total neurons was used PGP9.5 polyclonal antibody (PA5-29012/ Invitrogen; dilution 1:1000) and anti-calretinin polyclonal antibody (AB16694/ ABCAM; dilution 1:1200) to VIPergic and cholinergic submucosal neurons. As Fantaguzzi *et al.*, (2009) strongly (Car⁺⁺) and weakly (Car⁺) calretinin immunolabeling were distinguished for identification of cholinergic and VIPergic neurons, respectively.

Analysis of colonic enteric neurons

For the analysis of the population density myenteric and submucosal neurons were counted in 32 images obtained in consecutive fields using the 20x objective. Analysis total area were 0.0448cm² of the intermediate regions of the intestinal circumference. The number de ganglia also counted in submucosal whole-mount using the 10x objective. A total of 8 images were captured resulting in total area of

0.0588cm². Since changes can occur in the colon area due to inflammation, all results obtained were projected to the total area of the evaluated segment.

Neurons were counted using Image Pro Plus[®] image analyzer software. In addition, a total of 100 cell bodies each enteric neuronal population evaluated in myenteric and submucosal plexus were measured using the same software.

Statistical analysis

Data distribution was analyzed using the Shapiro-Wilk test. Two-way ANOVA followed by Tukey's post-test was used to compare groups when there were two variables influencing the results. In other cases, data with normal distribution were analyzed using the one-way ANOVA test, followed by Tukey's post-test. Data with free distribution were compared using the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn test. All statistical analyzes were performed using the GraphPad Prisma 8 software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Differences between groups were considered statistically significant for values of $P < 0.05$ and data were expressed as mean \pm standard error of mean.

RESULTS

The high protein diet enhanced DAI in DSS-induced UC promoting body mass loss and greater changes in stool consistency

All DSS-induced colitis mice showed a DAI score that gradually increased during the inflammatory intestinal induction, however, the DAI score of HP/DSS significantly differ of controls before of the SD/DSS ($P < 0.05$; Fig.1A). Additionally, when the groups of mice with colitis were compared also differed among, they from third day indicating that diet ingested could contribute to the course of inflammation ($P < 0.05$; Fig.1A).

Significant body mass reduction when observed in SD/DSS and HP/DSS mice compared to controls after the fifth day of induction ($P < 0.05$; Fig.1B). Hematochezia and/or apparent blood in the stool composed the DAI score of both DSS groups of similar form and differ of SD and HP ($P < 0.05$; Fig.1C). However, stool consistency

was more fluid in the HP/DSS group compared to the SD/DSS, HP and SD groups from the third day of induction ($P < 0.05$; Fig.1D). This last parameter contributed to the significantly higher DAI of animals with colitis and fed a high-protein diet than those fed standard diet (Fig.1D). Histological score of SD/DSS and HP/DSS was higher of control groups, SD, and DP ($P < 0.05$; Fig.1E).

Water and feed consumption is lower in colitis mice fed a high-protein diet

At the seven day, were observed that water consumption of the animals with colitis was smaller in relation to controls ($P < 0.05$; Fig.2A). Furthermore, the amount of DSS ingested of HP/DSS group mice it was reduced than the SD/DSS group ($P = 0.002$; Fig.2A). Feed intake decreased significantly in the beginning of the experimental period between the SD group and the others (HP; SP/DSS) ($P < 0.05$; Fig.2B). Already at the end of experimental induction, significant difference was identified only in DSS groups in relation to SD ($P < 0.05$; Fig.2B).

Intestinal inflammation and high-protein diet together contribute to changes in the number of pellets expelled per animal during the experimental period

After fifth day of experimental induction the number of fecal pellets expelled per daily significantly reduced in DSS groups (SD/DSS and HP/DSS) when compared to their respective controls (SD and HP) ($P < 0.05$; Fig.3A). This alteration was intensified in the HP/DSS mice at seven day where decreased of fecal pellets number was approximately 82%, 72% and 52% compared respectively with HP, SD and SD/DSS (Fig.3A).

Changes in gross mass feces were observed until six day of acute colitis induction (Fig.3B). The HP/DSS group had a significantly higher wet mass than the SD and HP in this period ($P < 0.05$; Fig.3B). A similar result was observed regarding the dry mass per expelled pellet ($P < 0.05$; Fig.3C). But no significant changes were observed in the amount of water in the pellets ($P > 0.05$; Fig.3D) and in the gastrointestinal transit ($P > 0.05$; Fig.3E).

The colon shortening resulting mainly colitis inflammatory process and the high-protein diet did not have a great influence on this process

Reduction was observed in the area and length of the total and distal colon in SD/DSS and HP/DSS animals when compared both controls, SD, and HP ($P < 0.05$; Table 4; Fig. 4E). In the proximal colon the same alterations occur only in SD/DSS group in relation to controls ($P < 0.05$; Table 4; Fig. 4E). No significant differences were found between the assessed groups as for the colon and spleen weight ($P > 0.05$; Fig. 4A, B, C, D e F).

High-protein diet and colitis can be modulate the neuron population density and cell body size in myenteric and submucosal plexus

In proximal colon, although variations were observed between the experimental groups regarding the number of general myenteric (PGP9.5⁺), nitrenergic (nNOS⁺) and estimated cholinergic (PGP 9.5⁺/nNOS⁻) neurons, they were not statistically significant ($P > 0.05$; Fig.5A). However, changes in the cell body were observed in all myenteric populations analyzed (Fig.5B). General neurons (PGP9.5⁺) from the HP/DSS group had a smaller cell body when compared to SD/DSS. While the cell body of nitrenergic neurons of the HP, SD/DSS and HP/DSS groups were significantly larger in relation to SD ($P < 0.05$; Fig.5B and 6).

In distal colon, an increase in population density of general (PGP9.5⁺) and estimated cholinergic (PGP 9.5⁺/nNOS⁻) neurons was observed in the HP/DSS and SD/DSS groups, respectively ($P < 0.05$; Fig.5C). The cell body area of general neurons (PGP9.5⁺) were larger in the SD/DSS and HP/DSS groups when compared to SD and HP ($P < 0.05$; Fig.5D). The opposite happened with the nitrenergic neurons (nNOS⁺) of SD/DSS and HP/DSS groups. They had a significantly smaller cell body in relation to the controls, and the DSS groups also differed from each other ($P < 0.05$; Fig.5D). Estimated cholinergic neurons (PGP9.5⁺/nNOS⁻) from the SD/DSS group had a larger cell body than those from the SD and HD/DSS groups ($P < 0.05$; Fig.5D and 7).

Decrease in weak calretinin submucosal neurons (Car⁺) was observed in the proximal colon of SD/DSS and HP/DSS groups ($P < 0.05$; Fig.8A). Other evaluated neurons populations did not show significant changes, however, in the HP/DSS group, the number of neuron ganglia was greater than SD and HP groups ($P < 0.05$; Fig.8C). Reduction in cellular body area was identified in the SD/DSS and HP/DSS groups of all neuronal populations in the submucosal plexus in relation of control ($P < 0.05$;

Fig.8B). The cell body of the neurons was even smaller in the HP/DSS group ($P<0.05$; Fig.8B) (Fig.9).

In the distal colon, changes in population density were observed mainly in the HP animals ($P<0.05$; Fig.8D). The number of ganglia did not change significantly between the evaluated experimental groups ($P>0.05$; Fig.8F). The cell body area of total neurons (PGP 9.5⁺) and strong calretinin (Car⁺⁺) was significantly greater in the HP when compared to SD group ($P<0.05$; Fig.8E). While a decrease in neuronal area was observed in the SD/DSS group of all neuronal populations evaluated in the submucosal plexus ($P<0.05$; Fig.8E). Interestingly, neurons from the HP/DSS group had a larger cell body than the SD/DSS group, indicating that the diet may be influencing the metabolic activity of these cells ($P<0.05$; Fig.8E) (Fig. 10).

DISCUSSION

Here we report the repercussions of the consumption of a diet composed of 44% of proteins, twice as much as recommended for mice, during the acute phase of UC. Previous research has already shown the consequences of excess intake of this nutrient, and it was observed that the results found may vary depending on the type of amino acid and/or protein used and the percentage supplemented (LLEWELLYN *et al.*, 2018; VIDAL-LLETJÓS *et al.*, 2019).

Thus, we observed that the DAI of the animals in the HP/DSS group was significantly higher than that of the SD/DSS group, indicating that the clinical signs of colitis were more intense in the mice that intake a diet composed of 44% protein. A similar result was identified by Anh, Jeong and Kim (2022) who compared the effects of different levels of protein intake for the development and establishment of colitis. These authors showed that the consumption of a diet with 40% protein from different protein sources increases the DAI of mice with DSS-induced colitis when compared to controls that consumed diets with a protein content of 20%.

Casein and soybean meal were used together as protein sources to produce high-protein feed in our study. Both are part of the diet of many Brazilians, casein in dairy products and soy protein in the daily lives of many vegetarians (OLIVEIRA *et al.*, 2022; ROMÃO *et al.*, 2022). Casein's own characteristics associated with its digestibility seem to clarify the reason why its supplementation causes greater damage

to gut health when compared to other protein sources (ANH; JEONG; KIM, 2022). While the excess presence of soy protein in the small intestine seems to be related to changes in the composition of colon bacteria leading to the production of pro-inflammatory cytokines (LI *et al.*, 2022). However, our results demonstrate that intake of 44% protein by healthy animals did not lead to changes in DAI and histological inflammatory score.

Llewellyn *et al.* (2018) showed that the intensification of colitis as a result of the consumption of casein-based diets is not observed in germ-free mice or mice previously treated with antibiotics. In view of this, the role of the colon's resident microbiota in this process is clear. It is important to highlight that in mice and humans, significant changes in the resident bacterial populations of the colon can occur within a period of 24 hours after changes in diet and remain until its replacement (FAITH *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2013).

Reduction in the length and area of the large intestine are commonly observed in murine models of experimental ulcerative colitis induced by DSS (CHASSAING *et al.* 2014; EICHELE; KHARBANDA, 2019) and this type of alteration was observed in our work. However, the high-protein diet did not intensify the macroscopic alterations normally observed in the colon of mice with experimental colitis induced by DSS, however, microscopically, it caused several alterations in the intestinal wall, including in the ENS.

In myenteric plexus, our results indicate that in the proximal colon, changes were restricted to alterations in the cell body of nitrergic neurons. However, in the distal portion, the morphometry and population density of all myenteric populations evaluated underwent significant changes. ENS abnormalities have already been identified in tissues of individuals with IBD and have included hypertrophy and/or hyperplasia of neurons, ganglia and nerve bundles (LAKHAN; KIRCHGESSNE, 2010; BRIERLEY; LINDEN, 2014; SPEAR; MAWE, 2019). According to Belkind-Gerson *et al.* (2017), colitis induces enteric neurogenesis in adult mice and "new" neurons are formed mainly derived from glial cells and neuroprogenitor cells.

Acetylcholine and nitric oxide are the two main neurotransmitters produced and released by myenteric neurons (FURNESS *et al.*, 2014). So, in this work PGP 9.5⁺/nNOS⁺ neurons were considered nitrergic, while PGP 9.5⁺/nNOS⁻ estimatedly cholinergic. Both nitrergic and cholinergic neurons are responsible for controlling the movements of the colon, therefore, changes in any of these groups of neurons impairs

intestinal homeostasis and interferes with the functioning of the colon (FURNESS, 2006). In our research, the number of fecal pellets expelled per animal gradually decreases during the experimental period. This change was even more evident on the seventh day for the HP/DSS group.

In submucosal plexus, neurons strongly immunostained with calretinin were considered as cholinergic (Calr⁺⁺) while the weak as VIPergic neurons (Calr⁺) (FANTAGUZZI *et al.*, 2009). These chemical mediators are responsible for promoting vasodilation and/or secretion reflexes in the colon (FURNESS, 2006). Our results demonstrate that diet and inflammation can, together or separately, influence the distribution and morphology of total (PGP 9.5⁺), VIPergics (Calr⁺) and cholinergic (Calr⁺⁺) neurons in the submucosal plexus. Although the percentage of water in the stool did not differ significantly between the control (SD and HP) and DSS (SD/DSS and HP/DSS) groups on the last day of the induction protocol, changes in stool consistency significantly contributed to the increase in DAI between mice with UC that intake a high-protein diet.

According to Julio-Pieper *et al.* (2021) changes in the luminal microenvironment can affect individuals in different ways, locally and physiologically. Therefore, since the type of food ingested can cause the luminal microenvironment to undergo changes (KHOSHBIN; CAMILLERI, 2020), understanding how nutrients influence the integrity of the intestinal wall can help in the prevention and/or treatment of different diseases, such as UC.

Thus, it is concluded that a high-protein diet, i.e., twice the amount of protein compared to that recommended for mice, based on casein and soybean meal, contributed to the intensification of the clinical signals of acute UC. In the distal colon, this diet caused more intense changes in the morphometry and population density of myenteric and submucosal neurons. The interaction between nutrients, more specifically dietary proteins, and ENS needs to be more explored to understand how diet can promote the health of individuals with IBD.

REFERENCES

AHN, E.; JEONG; H.; KIM, E. Differential effects of various dietary proteins on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **Nutrition Research and Practice**, v. 16,

n.6, p.700-715, 2022.

BELKIND-GERSON, J. *et al.* Colitis promotes neuronal differentiation of Sox2+ and PLP1+ enteric cells. **Scientific Reports**, v.7, n.2525, p.1-15, 2017.

BRIERLEY, S. M.; LINDEN, D. R. Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. **Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 10, p. 611–627, 2014.

CHASSAING, B. *et al.*, Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Current Protocols in Immunology**, v.104, n.15, p.1-15, 2014.

CHANG, J. T. Pathophysiology of inflammatory bowel diseases. **New England Journal of Medicine**, v.383, n.27, p.2652-2664, 2020.

DIELEMAN, L. A. *et al.* Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 114, n. 3, p. 385–391, 1998.

EICHELE, D. D.; KHARBANDA, K. K. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. **World Journal of Gastroenterol.**, v.23, n.33, p.6016-6029, 2019.

FAITH, J. J. *et al.* The long-term stability of the human gut microbiota. **Science**, v.341, p.1237439-1237439, 2013.

FANTAGUZZI, C M. *et al.* Identification of neuron types in the submucosal ganglia of the mouse ileum. **Cell and Tissue Research**, v.336, p.179-189, 2009.

FORBES, A. *et al.* ESPEN guideline: Clinical nutrition in inflammatory bowel disease. **Clinical nutrition**, v.36, n.2, p.321-347, 2017.

FURNES, J.B. **The Enteric Nervous System**. Nova York, Blackwell publishing. 2006.

FURNESS, J.B. *et al.* The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. In: **Microbial endocrinology: The microbiota-gut-brain axis in health and disease**. Springer New York, 2014. p. 39-71

JARMAKIEWICZ-CZAJA; S. *et al.* Genetic and epigenetic etiology of inflammatory bowel disease: an update. **Genes**, v.13, p.1-23, 2022.

JULIO-PIEPER, M. et al. Gut Susceptibility to Viral Invasion: Contributing Roles of Diet, Microbiota and Enteric Nervous System to Mucosal Barrier Preservation. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n.4734, p.1-13,2021.

KAPLAN, G. G. et al. The impact of inflammatory bowel disease in Canada 2018: epidemiology. **Journal of the Canadian Association of Gastroenterology**, v.2, p.6–16, 2019.

KHOSHBIN, K.; CAMILLERI, M. Effects of dietary components on intestinal permeability in health and disease. **American Journal of Physiology-gastrointestinal and Liver Physiology**, v.319, n.5, p.589-608, 2020.

LAFFIN, M. et al. A high-sugar diet rapidly enhances susceptibility to colitis via depletion of luminal short-chain fatty acids in mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNE, A. Review Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. **Journal of Neuroinflammation**, v.7,n. 37, p.1-12, 2010.

LAMB, C. A. et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. **Gut**, v.68, 2019

LI, Z. et al. Effects of the increased protein level in small intestine on the colonic microbiota inflammation and barrier function in growing pigs. **BMC Microbiology**, v.22, n.172, 2022.

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, 2018.

MACHADO, C. C. A. et al. Toxoplasma gondii infection impairs the colonic motility of rats due to loss of myenteric neurons. **Neurogastroenterology & Motility**, v.33, e13967, 2021.

MAFRA, D.; LEAL, V. O. A practical approach to a low protein diet in Brazil. **BMC Nephrology**, v. 17, n. 1, p. 1–7, 2016.

OLIVEIRA, D. C. R. S. et al. Meeting nutritional adequacy in the Brazilian population increases pesticide intake without exceeding chronic safe levels. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.73, n.4, p.538-551, 2022.

RODRIGUEZ, N. R.; MILLER, S. L. Effective translation of current dietary guidance: Understanding and communicating the concepts of minimal and optimal

levels of dietary protein. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 101, n. 6, p. 1353S-1358S, 2015.

ROMÃO, B. *et al.* Vegan milk and egg alternatives commercialized in Brazil: a study of the nutritional composition and main ingredients. **Frontiers in Public Health**, v.10, n.964734, 2022.

SAIRENJI, T.; COLLINS, K. L.; EVANS, D. V. An update on inflammatory bowel disease. **Primary Care**, v.44, n.4, p.673-692, 2017.

SCALDAFERRI, F. *et al.* Nutrition and IBD: malnutrition and/or sarcopenia? A practical guide. **Gastroenterology Research Practice**, v.17, 2017.

SEYEDIAN, S. S.; NOKHOSTIN, F.; MALAMIR, M. D. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. **Journal of Medicine and Life**, v.12, n.2, p.113–122 2019.

SMITH P. M. *et al.* The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. **Science**, v.341, p.569-573, 2013.

SPEAR, E. T.; MAWE, G. M. Enteric neuroplasticity and dysmotility in inflammatory disease: key players and possible therapeutic targets. **American Journal of Physiology-gastrointestinal and Liver Physiology**, v.317, n.6, p.G853-G861, 2019.

SUGIHARA, K.; KAMADA, N. Diet–microbiota interactions in inflammatory bowel disease. **Nutrients**, v.13, v.1533, p.1-17, 2021.

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. 1–16, 2019.

VIDAL-LLETJÓS, S. *et al.* Tissue-specific effect of colitis on protein synthesis in mice: impact of the dietary protein content. **European Journal of Nutrition**, v.60, p.1669–1677, 2021.

WATANABE, P. S. *et al.* Colonic motility adjustments in acute and chronic DSS-induced colitis. **Life Science**, v.321, n. 121642, 2023.

YAO, C. K.; MUIR, J. G.; GIBSON, P. R. Review article: insights into colonic protein fermentation, its modulation and potential health implications. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v.43, n.2, p.181-196, 2016.

Table 1. Composition of standart and high-protein diets

Ingredients:	Unit	DIETS	
		SD	HP
Wheat meal	%	40.73	11.61
Soybean meal 46%	%	29.35	46.65
Corn	%	18.73	--
Soy hull	%	5.24	11.99
Casein	%	--	20.00
Limestone	%	2.72	2.24
Soy oil	%	2.20	--
Salt	%	0.62	0.64
Premix-app	%	0.30	0.30
DI-metionina	%	0.08	--
L-lisina hcl	%	0.03	--
Caulin	%	--	6.27
Dicalcium phosphate	%	--	0.30
Raw Energy	Mcal/Kg	3,97	3,97

Standart diet (SD); High-protein diet (HP)

Table 2. Disease activity index (DAI)

Score	Weight loss (%)	Stool consistency	Hematochezia
0	None	Normal	Absent
1	1 - 5%	Slightly loose	Positive occult blood
2	6 -10%	Loose	Light (dyed stools)
3	11 – 15%	Watery	Moderate
4	>16%	Diarrhea	Intense

Adapted of Laffin *et al.* (2019)

Table 3. Histological findings of colitis

Microscopic findings	Grade	Description
Inflammation	0	None
	1	Slight
	2	Moderate
	3	Severe
Spread of inflammation	0	None
	1	Mucosa
	2	Mucosa e Submucosa
	3	Transmural
Mucosal epithelium	0	Integrate
	1	<5% loss of epithelial surface
	2	5 -10% loss of epithelial surface
	3	>10% loss of epithelial surface
Damage to the crypt	0	None
	1	<10% loss
	2	<10% - 20% loss
	3	>20% loss
Goblet cell depletion	0	Absent
	1	Present

Modified from Dieleman *et al* (1998)

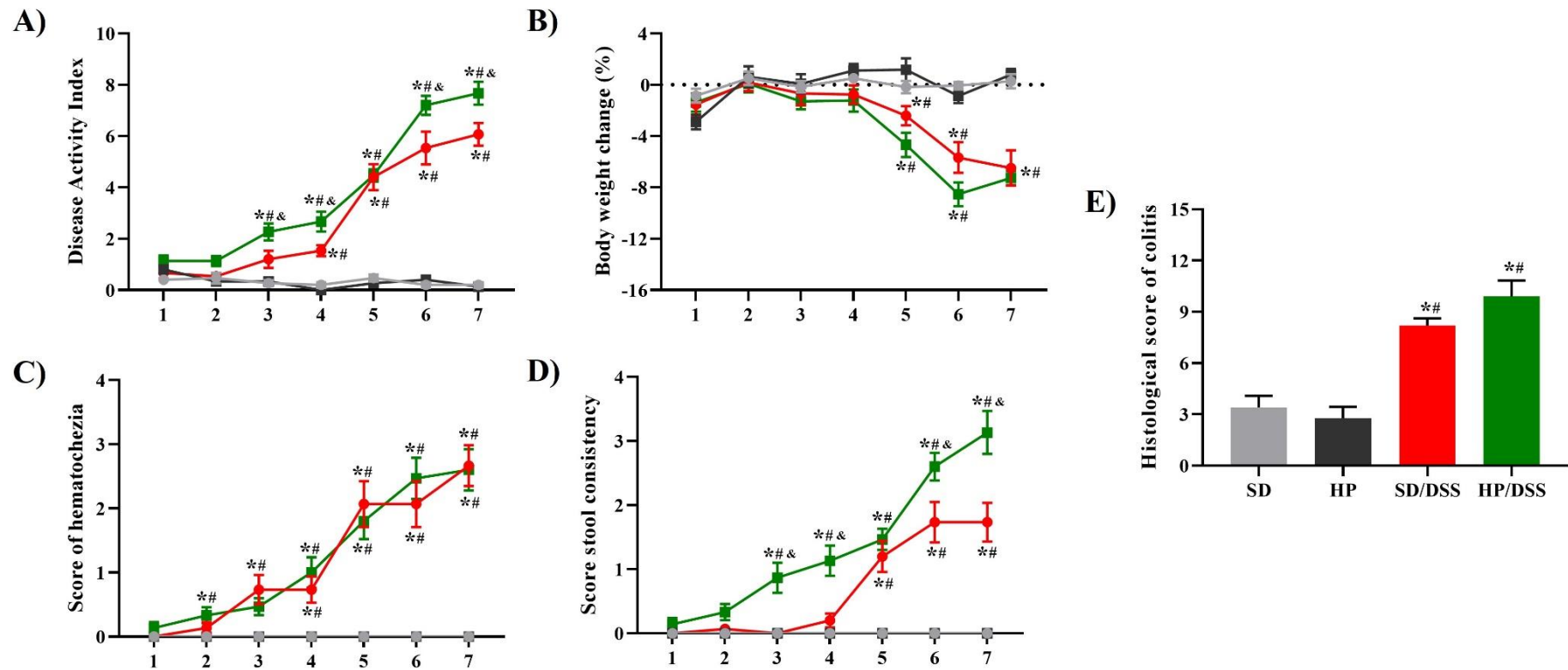


Figure 1. Disease activity index (A), body mass loss (B), fecal hematochezia/blood score (C), fecal consistency score (C) and histological inflammation score of DSS-induced ulcerative colitis mice fed a standard diet or hyperproteic diet. Two Way ANOVA test (A, B, C and D). Anova One Way and Tukey's post test (E). Data expressed as mean \pm standard error of mean. * $P < 0.05$ when compared to SD; # $P < 0.05$ when compared to HP; and, & $P < 0.05$ when compared to SD/DSS. Light gray line (SD); dark gray line (HP); red line (SD/DSS); and green line (HP/DSS) (n=15 mice to A, B, C and D; n=5 mice to E).

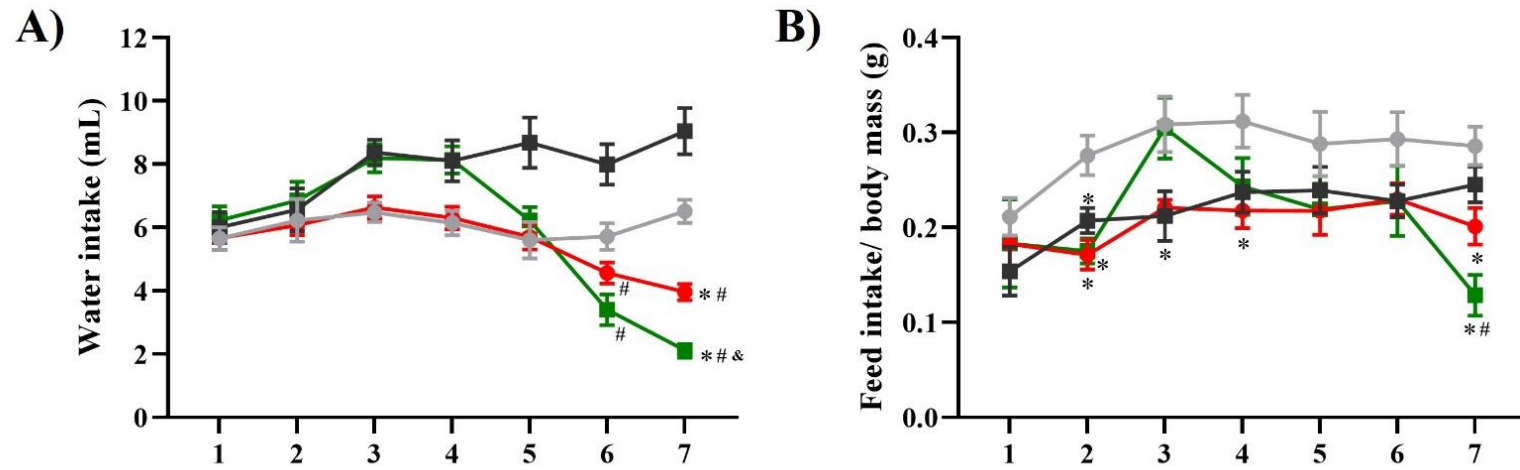


Figure 2. Water/DSS (A) and feed intake (B) of the animals during the experimental period of DSS-induced ulcerative colitis Two Way ANOVA test (A and B). Data expressed as mean \pm standard error of mean. * $P < 0.05$ when compared to SD; # $P < 0.05$ when compared to HP; and, & $P < 0.05$ when compared to SD/DSS. Light gray line (SD); dark gray line (HP); red line (SD/DSS); and green line (HP/DSS) (n=15 mice).

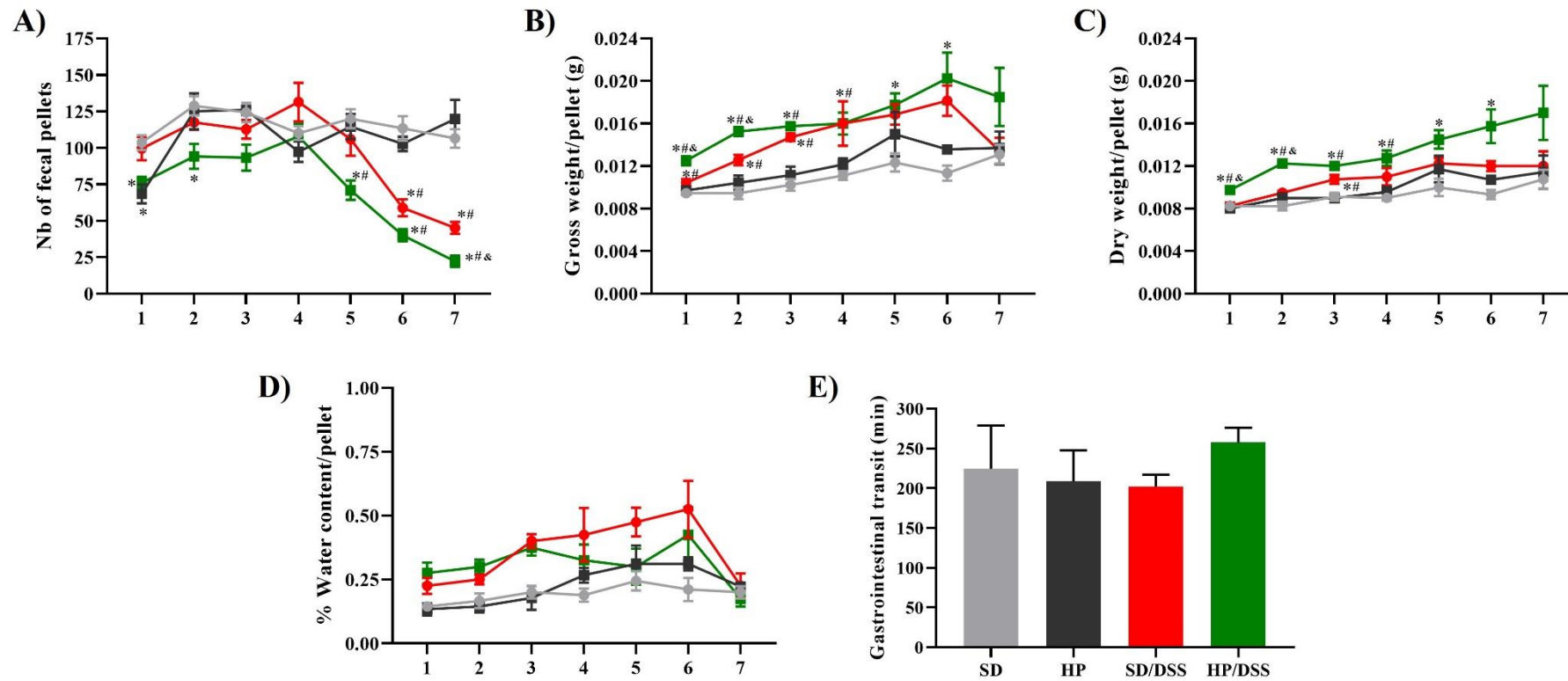


Figure 3. Number (A), mass (B and C) of pellets/day, amount of water in the feces (D) and gastrointestinal transit time (E) of the animals during the experimental period of DSS-induced ulcerative colitis Two Way ANOVA test (A, B, C and D). Anova One Way and Tukey's post test (E). Data expressed as mean \pm standard error of mean * $P < 0.05$ when compared to SD; # $P < 0.05$ when compared to HP; and, & $P < 0.05$ when compared to SD/DSS. Light gray line (SD); dark gray line (HP); red line (SD/DSS); and green line (HP/DSS) (n=15 mice to A, B, C and D; n=8 mice to E).

Table 4. Area, length and width of the total, proximal and distal colon of DSS-induced colitis mice fed a standard diet or hyperproteic diet

PARAMETERS	GRUPOS			
	SD	HP	SD/DSS	HP/DSS
Total area (cm ²)	7,1 ± 0,3	6,9 ± 0,5	4,6 ± 0,3^{ab}	4,9 ± 0,3^{ab}
Total Length (cm)	7,8 ± 0,3	7,5 ± 0,2	5,4 ± 0,2^{ab}	5,7 ± 0,2^{ab}
Total Width (cm)	0,93 ± 0,04	0,93 ± 0,05	0,88 ± 0,04	0,90 ± 0,06
Proximal area (cm ²)	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,2	1,9 ± 0,1^{ab}	2,2 ± 0,2
Proximal length (cm)	2,7 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,0 ± 0,1^{ab}	2,3 ± 0,1
Proximal width (cm)	0,97 ± 0,04	0,91 ± 0,04	0,92 ± 0,05	0,95 ± 0,07
Distal area (cm ²)	4,4 ± 0,3	4,3 ± 0,3	2,7 ± 0,2^{ab}	2,7 ± 0,2^{ab}
Distal length (cm)	5,1 ± 0,3	4,9 ± 0,2	3,4 ± 0,2^{ab}	3,4 ± 0,2^{ab}
Distal width (cm)	0,86 ± 0,04	0,88 ± 0,05	0,80 ± 0,05	0,81 ± 0,05

Anova One Way and Tukey's post test (colon proximal area; colon distal área; and colon distal length); Kruskal-Wallis and post Dunn test (colon total area; colon total length; colon total width; colon proximal length; colon proximal width; and, colon distal width). Data expressed as mean ± standard error of mean. ^aP<0.05 when compared to SD; ^bP<0.05 when compared to HP (n=6 mice).

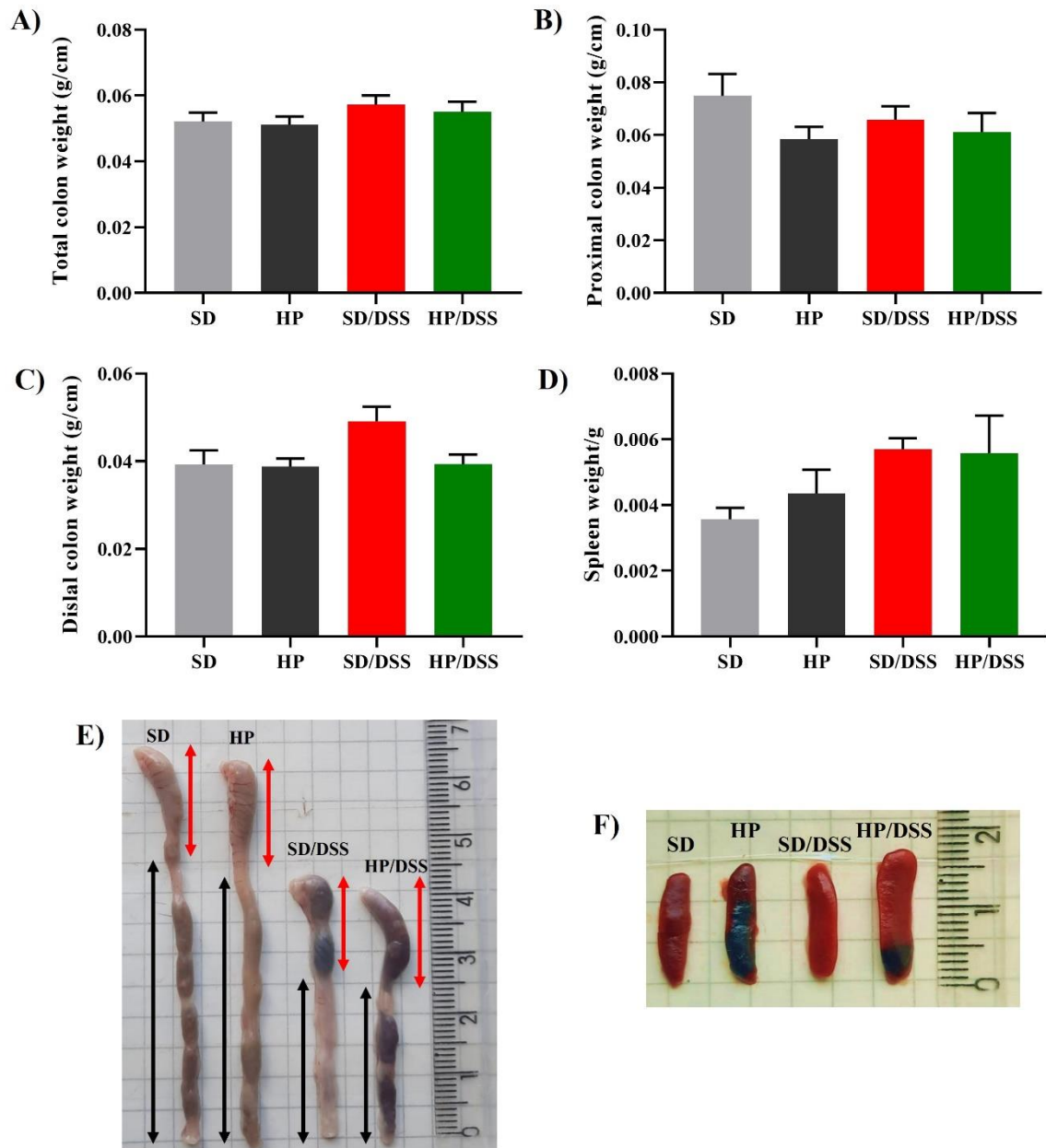


Figure 4. Weight of total colon (A), proximal colon (B), distal colon (C) and spleen (D) of DSS-induced ulcerative colitis mice fed a standard diet or hyperproteic diet. Macroscopic morphology of colon (E) and spleen (F) of all experimental groups. One-way ANOVA and Tukey's post-test (A and B); Kruskal-Wallis and Dunn post-test (C and D). Data expressed as mean \pm standard error of mean (n=15 mice).

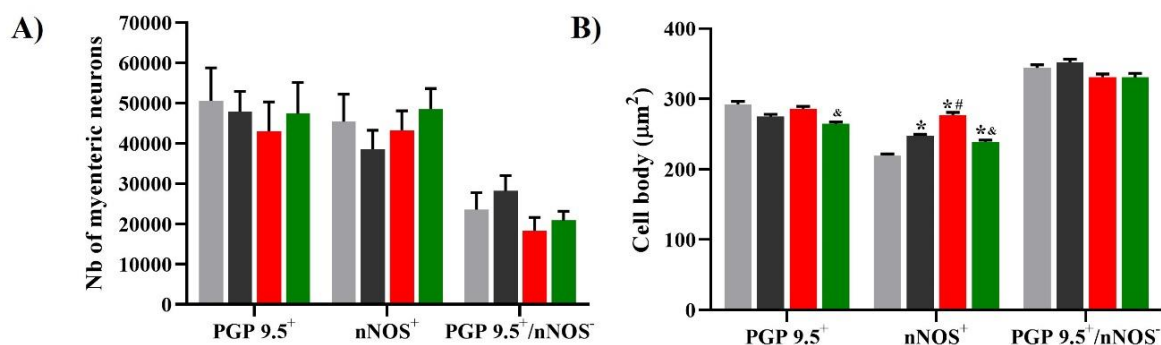
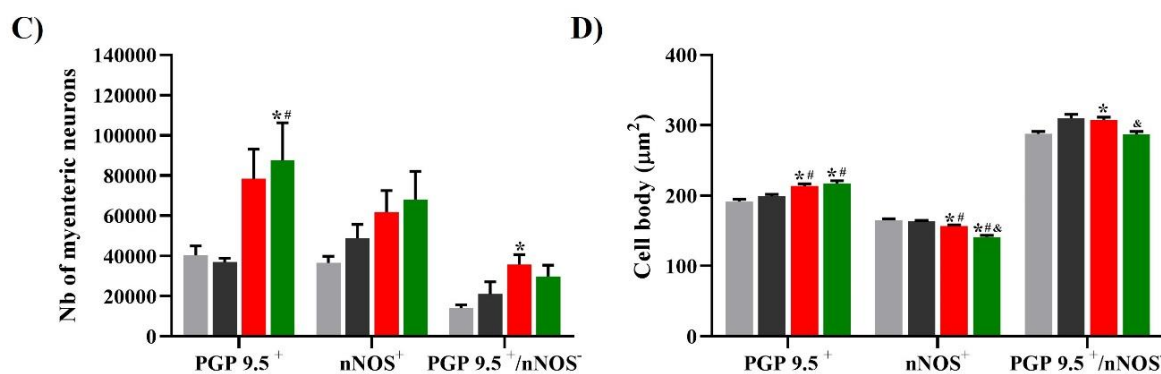
PROXIMAL COLONDISTAL COLON

Figure 5. Population density of neurons in the proximal (A) and distal (C) colon projected to the area of the analyzed segment. Area of the cell body of general (PGP 9.5⁺), nitroergic (nNOS⁺) and estimated cholinergic neurons (PGP 9.5⁺/nNOS⁻) of the proximal (B) and distal (D) colon. One-way ANOVA and Tukey's post-test (number of PGP 9.5⁺ and PGP 9.5⁺/nNOS⁻ neurons in proximal and distal colon); Kruskal-Wallis and post-test Dunn (number of nNOS⁺ neurons in proximal and distal colon; cell body of PGP 9.5⁺, nNOS⁺ and PGP 9.5⁺/nNOS⁻ neurons in proximal and distal colon). Data expressed as mean \pm standard error of mean. *P<0.05 when compared to SD; #P<0.05 when compared to HP; and, &P<0.05 when compared to SD/DSS (n=6 mice).

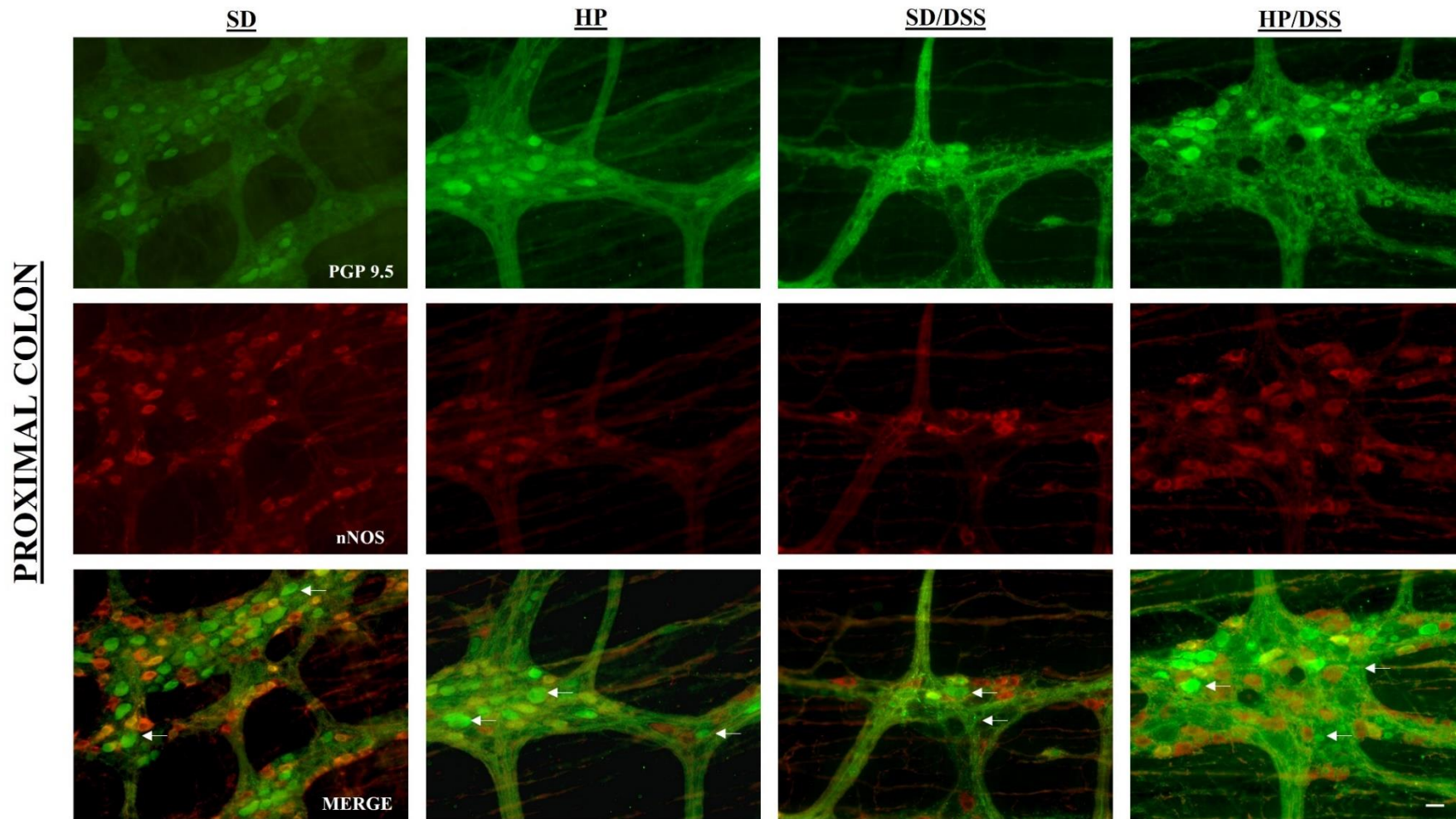


Figure 6. An illustration the labeling of total (PGP 9.5⁺) and nitroergic neurons (nNOS⁺) in myenteric plexus of proximal colon. Arrows indicate some neurons estimated to be cholinergic. Bar:20 μ m

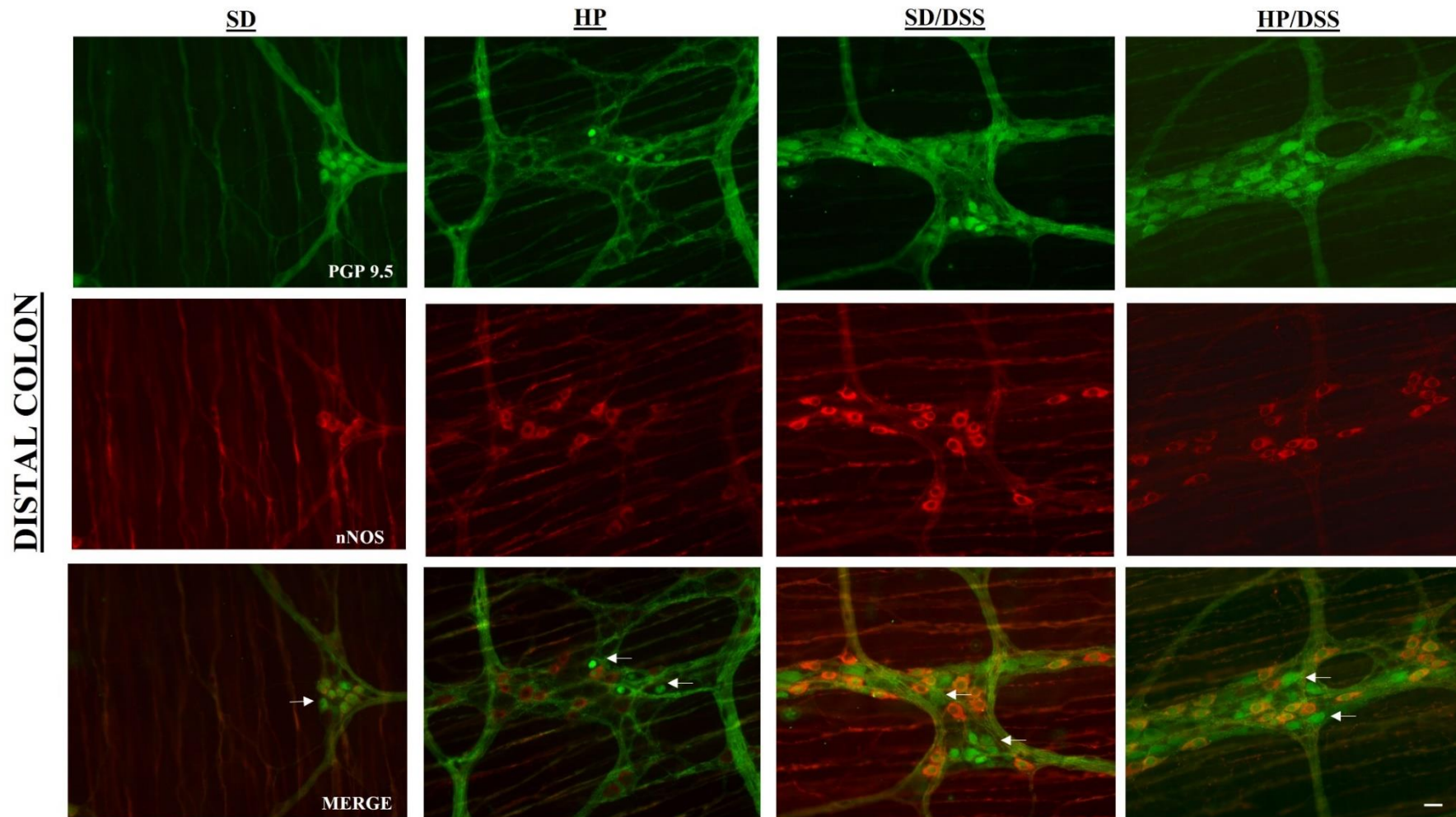


Figure 7. An illustration the labeling of total (PGP 9.5⁺) and nitrgergic neurons (nNOS⁺) in myenteric plexus of distal colon. Arrows indicate some neurons estimated to be cholinergic. Bar:20 μ m.

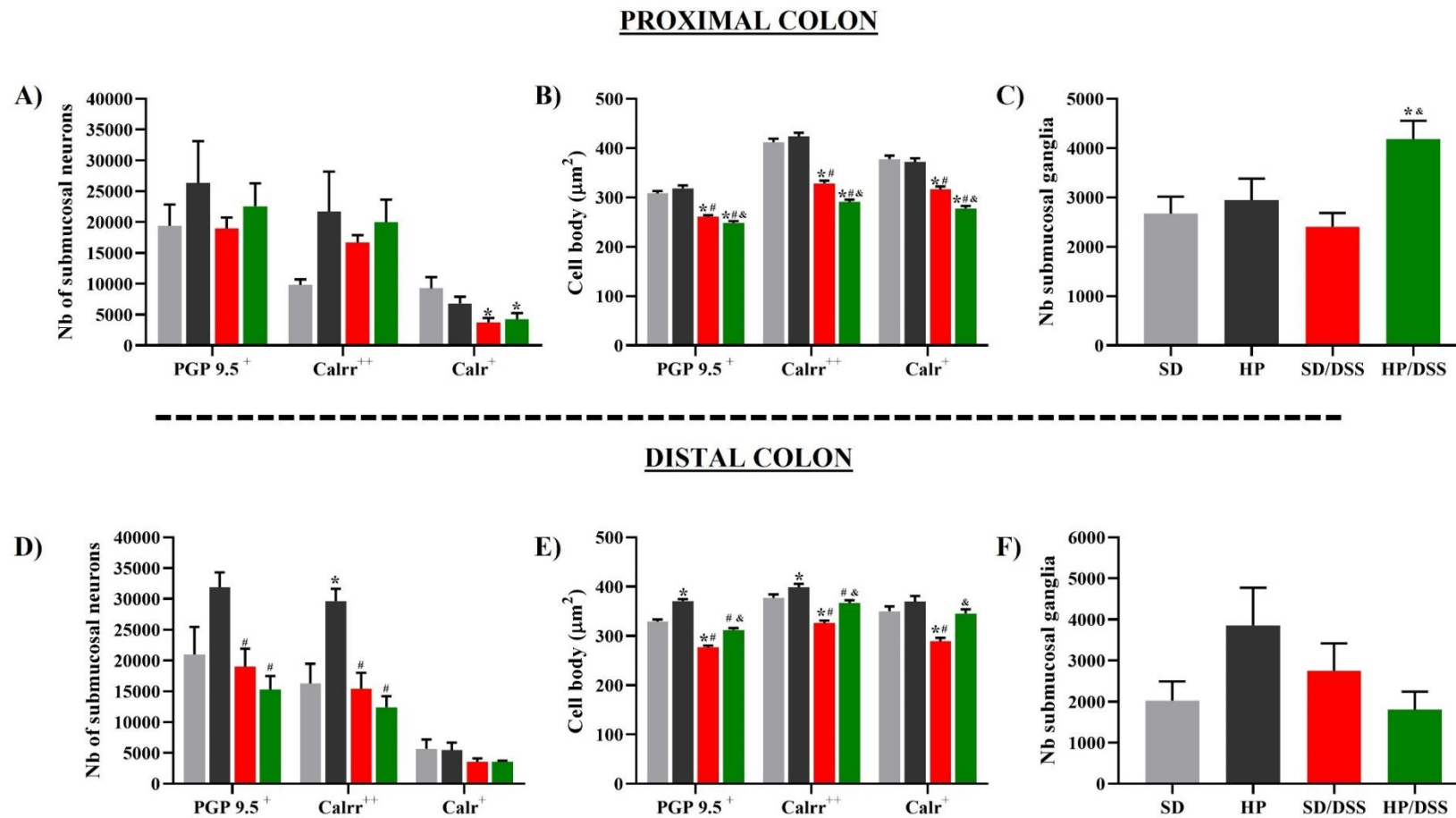


Figure 8. Population density of neurons in the proximal (A) and distal (C) colon projected to the area of the analyzed segment. Area of the cell body of general (PGP 9.5⁺), calretinin strong (Calr⁺⁺) and calretinin weak (Calr⁺) of the proximal (B) and distal (D) colon. One-way ANOVA and Tukey's post-test (number of PGP 9.5⁺, Calr⁺⁺ e Calr⁺ neurons in proximal and distal colon); Kruskal-Wallis and post-test Dunn (cell body of PGP 9.5⁺, Calr⁺⁺ e Calr⁺ neurons in proximal and distal colon). Data expressed as mean \pm standard error of mean. *P<0.05 when compared to SD; #P<0.05 when compared to HP; and, &P<0.05 when compared to SD/DSS (n=6 mice).

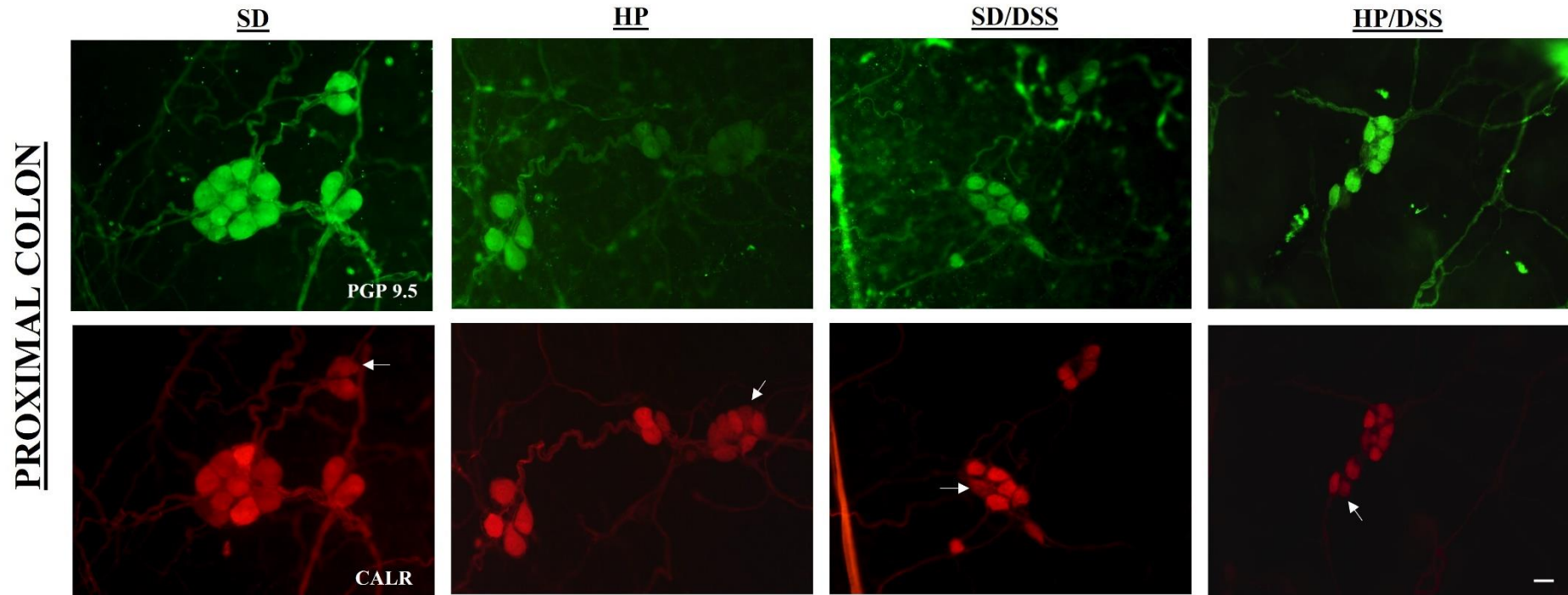


Figure 9. A illustration the labeling of total (PGP 9.5⁺) and calretinin weak (Calr⁺) and strong (Calr⁺⁺) in submucosal plexus of proximal colon. Arrows indicate examples of neurons Calr⁺. Bar:20 μ m

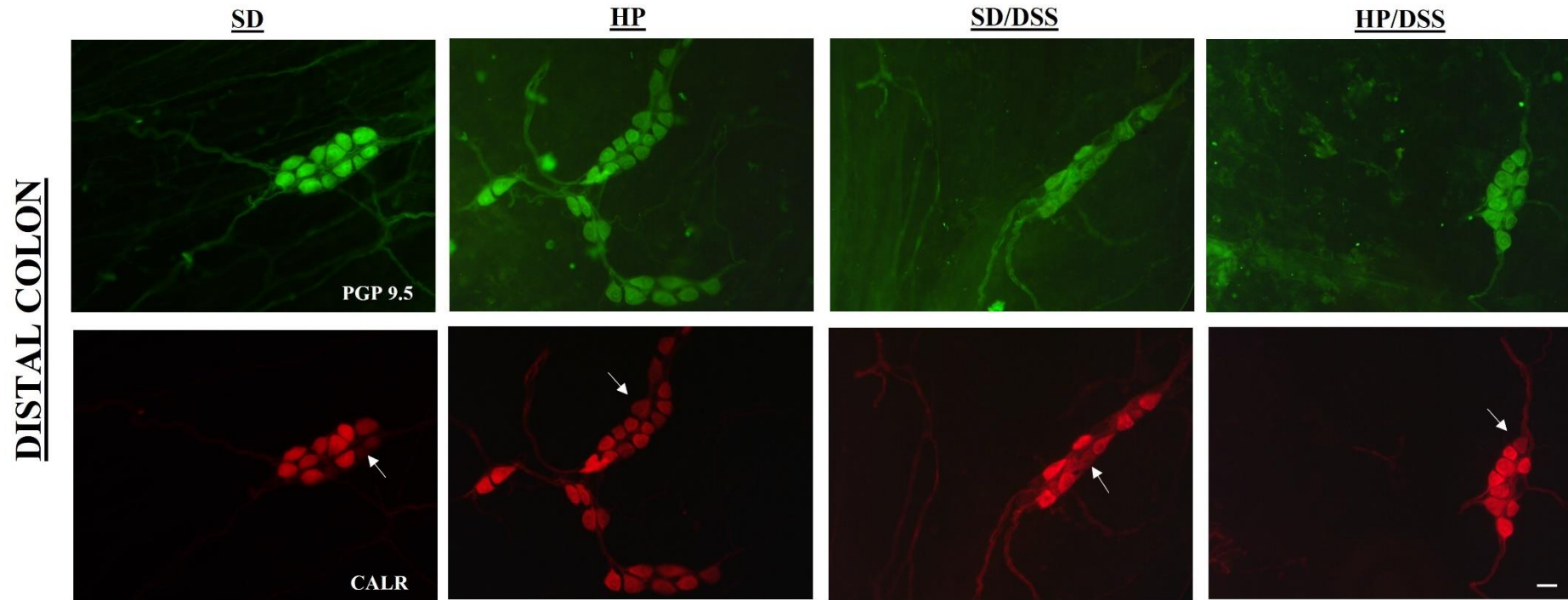


Figure 10. A illustration the labeling of total (PGP 9.5⁺) and calretinin weak (Calr⁺) and strong (Calr⁺⁺) in submucosal plexus of distal colon. Arrows indicate examples of neurons Calr⁺. Bar:20 μ m

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O interesse da área científica a respeito do microambiente intestinal aumentou na última década. A cada dia novas descobertas são publicadas sobre o tema, destacando o papel microbiota na patogênese de inúmeras doenças, ou ainda, na manutenção da saúde. Entretanto, junto a isto, uma rotina estressante associada a hábitos alimentares perigosos tem se tornado comuns entre a população em todo mundo. Como resultado, inúmeros processos patológicos que por muito tempo destacavam-se como problemas de países desenvolvidos, encontram-se aumentando em incidência e prevalência em todo o mundo, como é o caso da DII.

Este trabalho trouxe como ideia principal a discussão sobre o papel das proteínas indigestas presentes cólon, oriunda de dietas com teores proteicos bem acima do recomendado, na modulação da RCU durante a fase ativa da doença. Com base nos resultados obtidos foi demonstrado que o curso inflamatório é mudado quando este nutriente é consumido duas vezes acima do recomendado, com exacerbação dos sinais clínicos da RCU induzida por DSS em camundongos.

Além disto, alterações nos neurônios mioentéricos e submucosos do cólon proximal e distal foram identificadas resultantes não somente da RCU, mas de sua associação com o consumo da dieta hiperproteica. Embora avaliações funcionais e inflamatórias mais aprofundadas devem ser realizadas para corroborar os dados, os achados até aqui, novamente demonstram o “*crosstalk*” que existe no lúmen intestinal entre resposta imune e SNE, e sua importância para manutenção da saúde dos indivíduos com RCU.

6. REFERÊNCIAS UTILIZADA NA TESE

- ALLAIRE, J. M. *et al.* The intestinal epithelium: central coordinator of mucosal immunity. **Trends in Immunology**, v.39, n.9, p.677-696, 2018.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. *et al.* High School Diet and Risk of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 21, n. 10, p. 2311-2319, 2015.
- ANDRIAMIHAJA, M. *et al.* Colon luminal content and epithelial cell morphology are markedly modified in rats fed with a high-protein diet. **Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 299, n. 5, p. 1030-1037, 2010.
- BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving treatments. **The Lancet**, v.369, n.9573, p.1641–57, 2007.
- BINGHAM, A. S. *et al.* Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? **Carcinogenesis**, v.17, p.515-523, 1996.
- BLACHIER, F. *et al.* Changes in the luminal environment of the colonic epithelial cells and physiopathological consequences. **American Journal of Pathology**, v. 87, n.3, p.476-486, 2017.
- BLACHIER, F.; ANDRIAMIHAJA, M.; KONG, X. Fate of undigested proteins in the pig large intestine: What impact on the colon epithelium? **Animal Nutrition**, v.9, p.110-118, 2022.
- BONAZ, B. Is-there a place for vagus nerve stimulation in inflammatory bowel diseases? **Bioelectronic Medicine**, v, n.4, p.1-9, 2018.
- BREIT, S. *et al.* Vagus nerve as modulador of the brain-gut axis in psychiatric and inflammatory disorders. **Frontiers in Psychiatry**, v.9, n.44, p.1-15, 2018.
- BRIERLEY, S. M.; LINDEN, D. R. Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 10, p. 611-627, 2014
- CERVI, A. L.; LUKEWICH, M. K.; LOMAX, A. E. Neural regulation of gastrointestinal inflammation: role of the sympathetic nervous system. **Autonomic Neuroscience**, v.182, p.83-88, 2014.
- CHASSAING, B. *et al.*, Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Current Protocols in Immunology**, v.104, p.1-16, 2015.
- COOPER, C. E.; BROWN, G. C. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. **Journal of Bioenergetics Biomembranes**, v.40, p.533-539, 2008.

- CRYAN, J. F. *et al.* The microbiota-gut-brain axis. **Physiological Reviews**, v.99, n.4, p.1877-2013, 2019.
- CUI, X.; KIM, E. Dual Effects of High Protein Diet on Mouse Skin and Colonic Inflammation. **Clinical Nutrition Research**, v.7, n.1, p.56, 2018.
- DALLAS, D. C. *et al.* Personalizing protein nourishment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.57, n.15, p.3313-3331, 2017.
- DANESE, S.; FIOCCHI, C. Ulcerative colitis. **The New England Journal of Medicine**, v.365, n.18, p.1713-1725, 2011.
- DAVID, L. A. *et al.* Diet Rapidly Alters the Human Gut Microbiota. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559–563, 2014.
- DINALLO, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps sustain inflammatory signals in ulcerative colitis. **Journal of Crohns and Colitis**, V.13, n.6, p.772-784, 2019.
- DU, L.; HA, C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis. **Gastroenterol Medical Clinics of North Americana**, v.49, p.643-654, 2020.
- FANTAGUZZI, C M. *et al.* Identification of neuron types in the submucosal ganglia of the mouse ileum. **Cell and Tissue Research**, v.336, p.179-189, 2009.
- FEUERSTEIN, J. D. *et al.* Ulcerative colitis. **Mayo Clinic Proceedings.**, v.94, n.7, p.1357-1373, 2019.
- FUNG, C.; BERGHE, P. V. Functional circuits and signal processing in the enteric nervous system. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.77, n.22, p.4505-4522, 2020.
- FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v.81, p.87-96, 2000.
- FURNESS, J. B. *et al.*, Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. **Progress in Neurobiology**, v.74, p.143-164, 2004.
- FURNES, J.B. **The Enteric Nervous System**. Nova York, Blackwell publishing. 2006
- FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Gastroenterology e Hepatology**. v.9, p.286-204, 2012.
- FURNES, J. B. *et al.* Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine. **The Anatomical Record**, v.272, n.2, p.475-483, 2003.
- FURNESS, J.B. *et al.* The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. In: **Microbial endocrinology: The microbiota-gut-brain axis in health and disease**. Springer New York, 2014. p. 39-71.

FURNESS, J. B.; STEBBING, M. J. The first brain: Species comparisons and evolutionary implications for the enteric and central nervous systems. **Neurogastroenterology & Motility**, v.30, e13234, 2017.

GASPARINI, R. G.; SASSAKI, L. Y.; SAAD-HOSSNE, R. Inflammatory bowel disease epidemiology in São Paulo State, Brazil. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 11, p. 423–429, 2018.

GERTHOFFER, W. T. Signal-Transduction Pathways that Regulate Visceral Smooth Muscle Function III. Coupling of muscarinic receptors to signaling kinases and effector proteins in gastrointestinal smooth muscles. **American Journal of Physiology-gastrointestinal and Liver Physiology**, v.288, p.849-853, 2005.

GEYPENS, B. *et al.* Influence of dietary protein supplements on the formation of bacterial metabolites in the colon. **Gut**, v.41, n.1, p.70-76, 1997.

GULBRANSEN, Brian D. and SHARKEY, Keith A. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. **Nature Reviews**. v. 9, p. 625-632, 2012.

HAN, J. P. *et al.* Positive Correlation between nnos and stress-activated bowel motility is confirmed by in vivo HiBiT system. **Cells**, v.10, n.1028, p.1-10, 2021.

HEO, J. M. *et al.* Feeding a diet with decreased protein content reduces indices of protein fermentation and the incidence of postweaning diarrhea in weaned pigs challenged with an enterotoxigenic strain of Escherichia coli. **Journal of Animal Science**, v.87, p.2833-2843, 2009.

HOLLAND, A. M. *et al.* The enteric nervous system in gastrointestinal disease etiology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.78, p. 4713-4733, 2021.

IMAM, T. *et al.* Effector T helper cell subsets in inflammatory bowel diseases. **Frontiers in Immunology**, v.9, n.1212, p.1-16, 2018.

JACOBS, J. P. *et al.* A Disease-Associated Microbial and Metabolomics State in Relatives of Pediatric Inflammatory Bowel Disease Patients. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 2, n. 6, p. 750–766, 2016

JACOBSON, A. *et al.* The intestinal neuro-immune axis: crosstalk between neurons, immune cells, and microbes. **Mucosal Immunology**, v.14, p.555-565, 2021.

JOHANSSON, M. E. V. *et al.* The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, p.15064-15069, 2008.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAISER, A.; ZEISSIG, S.; BLUMBERG, R. S. Inflammatory bowel disease. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 573–621, 2010.

KAŁUZNA, A.; OLCZYK, P.; KOMOSIŃSKA-VASSEV, K. The role of innate and adaptive immune cells in the pathogenesis and development of the inflammatory response in ulcerative colitis. **Journal of Clinical Medicine**, v.11, n.400, p.1-15, 2022.

KAPLAN, G. G. *et al.* The impact of inflammatory bowel disease in Canada 2018: epidemiology. **Journal of the Canadian Association of Gastroenterology**, v.2, p.6–16, 2019.

KAPPELMAN, M. D. *et al.* Direct Health Care Costs of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in US Children and Adults. **Gastroenterology**, v.135, n.6, p.1907-1913, 2008.

KIESLER, P.; FUSS, I. J.; STROBER, W. Experimental models of inflammatory bowel diseases. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v.1, n.2, p. 154-170, 2015.

KHOSHBIN, K.; CAMILLERI, M. Effects of dietary components on intestinal permeability in health and disease. **American Journal of Physiology-gastrointestinal and Liver Physiology**, v.319, n.5, p.589-608, 2020.

KNIGHT-SEPULVEDA, K. *et al.* Diet and inflammatory bowel disease. **Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 511–520, 2015.

KOBAYASHI, T. *et al.* Ulcerative colitis. **Primer**, v.5, n.74, 2020.

KUCHARZIK, T. *et al.* Ulcerative colitis - diagnostic and therapeutic algorithms. **Deutsches Ärzteblatt International**, v.117, p.564-574, 2020.

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, p. 624–633, 2016.

LECCI, A., SANTICIOLI, P., MAGGI, C.A. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. **Current opinion in pharmacology**, v. 2, n. 6, p. 630-641, 2002.

LE FEUNTEUN, S. *et al.* Physiologically based modeling of food digestion and intestinal microbiota: State of the art and future challenges. **Annual review of food science and technology**, v.12, p.149-167, 2021.

LEON, G.; HUSSEY, S.; WALSH, P. T. The diverse roles of the IL-36 family in gastrointestinal inflammation and resolution. **Inflammatory Bowel Disease**, v.27, n.3, p.440-450, 2021.

LI, Z. *et al.* Regional complexity in enteric neuron wiring reflects diversity of motility patterns in the mouse large intestine. **eLife**, v.8, e42914, p.1-27, 2019.

- LIMA-MARTINS, A.; VOLPATO, R. A.; ZAGO-GOMES, M. P. The prevalence and phenotype in Brazilian patients with inflammatory bowel disease. **BMC Gastroenterology**, v.18, n.87, 2018.
- 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, 2018.
- LODDO, I.; ROMANO, C. Inflammatory bowel disease: Genetics, epigenetics, and pathogenesis. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 6–11, 2015.
- LOVEDAY, S. M. Protein digestion and absorption: the influence of food processing 2022. **Nutrition Research Reviews**, p.1-16, 2022.
- LIU, Y.; WANG, X.; HU, C. A. A. Therapeutic potential of amino acids in inflammatory bowel disease. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1–18, 2017.
- LYTE, M.; CRYAN, J. F. **Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease**. 4ed. New York 2014. Springer. 2014
- MARGOLIS, K. G.; GERSHON, M. D. Enteric neuronal regulation of intestinal inflammation. **Trends Neuroscience.**, v.39, n.9, p.614-624, 2016.
- MEHDIZADEH, S. *et al.* Diagnostic yield of capsule endoscopy in ulcerative colitis and inflammatory bowel disease of unclassified type (IBDU). **Endoscopy**, v.40, p.30–5, 2008.
- MOYNES, D. M. *et al.* Effects of inflammation on the innervation of the colon. **Toxicologic Pathology**, v. 42, n. 1, p. 111–117, 2014.
- OCHOA-CORTES, Fernando *et al.*, Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. **Inflammatory Bowel Disease**. v.22, n.9, p.433-449, 2016.
- OKAYASU, I. *et al.* A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, v.98, p.694-702, 1990.
- PAONE, P.; CANI, P.D. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: The expected slimy partners? **Gut**, v.69, p.2232–2243, 2020.
- PARADIS, T. *et al.* Tight junctions as a key for pathogens invasion in intestinal epithelial cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n.5, 2021.
- PARENTE, J. M. L. *et al.* Inflammatory bowel disease in an underdeveloped region of Northeastern Brazil. **World Journal of Gastroenterology**, v.21, p.1197–1206, 2015.
- PIEPER, R. *et al.* Fermentable fiber ameliorates fermentable protein-induced changes in microbial ecology, but not the mucosal response, in the colon of piglets. **Journal of Nutrition**, v.142, p.661-667, 2012.

SUZUKI, T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: the role of tight junctions. **Animal Science Journal**, v.91, n.1, e13357, 2020.

QUAN, X. *et al.* Hydrogen sulfide regulates the colonic motility by inhibiting both L-type calcium channels and BK Ca channels in smooth muscle cells of rat colon. **PLoS ONE**, v.10, e0121331, 2015.

QUARESMA, A. B.; KAPLAN, G. G.; KOTZE, P. G. The globalization of inflammatory bowel disease: The incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Brazil. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 35, n. 4, p. 259–264, 2019

RASHVAND, S. *et al.* Dietary protein intakes and risk of ulcerative colitis. **Medical Journal of the Islamic Republic of Iran**, v. 29, n. 1, p. 744–751, 2015.

RICHARDS, J. L. *et al.* Dietary metabolites and the gut microbiota: an alternative approach to control inflammatory and autoimmune diseases. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 5, p. e82, 2016.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v.9, p.313-323, 2009.

SAIRENJI, T.; COLLINS, K. L.; EVANS, D. V. An update on inflammatory bowel disease, **Primary Care: Clinics Office Practice**, v.44, p.673-692, 2017.

SANDERS, K.M. *et al.* Regulation of gastrointestinal motility: insights from smooth muscle biology. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 11, p. 633-645, 2012.

SHEN, Q.; CHEN, Y. A.; TUOHY, K. M. A comparative in vitro investigation into the effects of cooked meats on the human faecal microbiota. **Anaerobe**, v.16, p.572-577, 2010.

SEYEDIAN, S. S.; NOKHOSTIN, F.; MALAMIR, M. D. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. **Journal of Medicine and Life**, v.12, n.2, p.113–122 2019.

SMITH, T. K.; PARK, K. J.; HENNIG, G. W. Colonic migrating motor complexes, high amplitude propagating contractions, neural reflexes and the importance of neuronal and mucosal serotonin. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v.20, n.4, p.423-446, 2014.

SOUZA, A. L. *et al.* Consumption of diet containing free amino acids exacerbates colitis in mice. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

SPENCER, N. J.; HU, H. Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility. **Gastroenterology & hepatology**, v.17, p. 338-351, 2020.

STRANDWITZ, P. *et al.*, Neurotransmitter modulation by gut microbiota. **Brain Research**, v.1693, p.128-133, 2018.

TODEN, S. *et al.* Resistant starch prevents colonic DNA damage induced by high dietary cooked red meat or casein in rats. **Cancer Biology & Therapy**, v.5, p.267-272, 2006.

TOMMASO, N. D.; GASBARRINI, A.; PONZIANI, F. R. Intestinal barrier in human health and disease. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.18, n.12836, p.1-23, 2021

VAN DER VELDEN, V. H. J.; HULSMANN, A. R. Peptidases: structure, function and modulation of peptidemediated effects in the human lung. **Clinical and Experimental Allergy**, v.29, p.445-456, 1999.

VENTURA, A. L. M. *et al.* Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.37, n.2, p.66-72, 2010.

VICTORIA, C. R.; SASSAKI, L. Y.; NUNES, H. R. C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in Midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.46, p.20-25, 2009.

WAN, Y. *et al.* Excessive apoptosis in ulcerative colitis: crosstalk between apoptosis, ROS, ER stress, and intestinal homeostasis. **Inflammatory Bowel Disease**, v.28, n.4, p.639-648, 2022.

WANG, C. *et al.* Regulation profile of the intestinal peptide transporter 1 (PepT1). **Drug Design, Development and Therapy**, v.11, p.3511-3517, 2017.

YAO, C. K.; MUIR, J. G.; GIBSON, P. R. Review article: insights into colonic protein fermentation, its modulation and potential health implications. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.43, n.2, p.181-196, 2016.

YUAN, Z. *et al.* Biology of IL-36 signaling and its role in systemic inflammatory diseases. **Frontiers in immunology**, v.10, n.2532, 2019.

ZHU, Y. *et al.* CXCL8 chemokine in ulcerative colitis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.138, 111427, 2021.

ANEXOS

ANEXO A – Carta da Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 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 nº 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 nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 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/UEL) 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
Nº 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-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL 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/UEL

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