

**Ana Leticia Malheiros Silveira**

**Estudo das alterações metabólicas e inflamatórias que acompanham a  
inflamação intestinal experimental**

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte, Abril de 2017

**Ana Leticia Malheiros Silveira**

**Estudo das alterações metabólicas e inflamatórias que acompanham a  
inflamação intestinal experimental**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

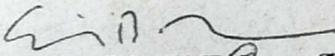
Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

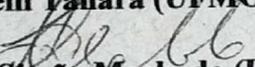
Co-orientadora: Profa. Dr. Adaliene Versiani Matos Ferreira

Belo Horizonte, Abril de 2017

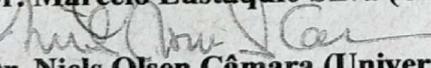


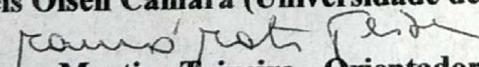
**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE ANA LETÍCIA MALHEIROS SILVEIRA.** Aos onze dias do mês de abril de 2017 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Estudo das alterações metabólicas e inflamatórias que acompanham a inflamação intestinal experimental", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Mauro Martins Teixeira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Erich Birelli Tahara (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Fabiana Simão Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Marcelo Eustáquio Silva (Universidade Federal de Ouro Preto), aprovada; Dr. Niels Olsen Câmara (Universidade de São Paulo), aprovada; Dr. Mauro Martins Teixeira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 11 de abril de 2017.

  
 Dr. Erich Birelli Tahara (UFMG)

  
 Dra. Fabiana Simão Machado (UFMG)

  
 Dr. Marcelo Eustáquio Silva (Universidade Federal de Ouro Preto)

  
 Dr. Niels Olsen Câmara (Universidade de São Paulo)

  
 Dr. Mauro Martins Teixeira - Orientador (UFMG)

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família principalmente à tia Su, minha mãe Dôra, Nego e a Gustavo. Ao meu marido e melhor amigo Frederico, que sempre me apoiou e apoia em todas as minhas aventuras.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao meu orientador, professor Mauro Martins Teixeira, por me aceitar como sua aluna de doutorado e por confiar em minha capacidade de executar os projetos e experimentos planejados nesses últimos anos. Obrigada pelos desafios, pelas ajudas e discussões intelectuais e, principalmente, pelo crescimento profissional e pessoal proporcionado, de maneira direta ou indireta, nesses seis anos da minha trajetória laboratorial;

Agradeço imensamente à professora Adaliene Versiani Matos Ferreira, que sempre esteve presente na minha trajetória acadêmica, desde a graduação, e que me salvou inúmeras vezes com seus conhecimentos e discussões científicas. Agradeço o seu ânimo e empolgação profissional, fundamental para que tenhamos forças para a realização de todos os experimentos propostos, principalmente quando não obtemos os resultados inicialmente esperados, e, dessa forma, sempre nos ensinando a ver o lado “bom” dos dados obtidos;

Agradeço a todos do laboratório de Imunofarmacologia do O4, que de alguma forma me ajudaram nessa trajetória, por meio de conversas e desabafos, pelas discussões científicas, pelos cafés e encontros realizados. E, principalmente, pelas experiências vividas nos congressos que sempre foram ótimas, enfim, por todos os momentos felizes e tristes que se passaram nesse processo. Em especial: Ana Carolina, Aline Miranda, Bráulio Lima, Bruno Valiate, Daiane Boff, Fernando Roque, Flávia Rago, Iara Borges, Izabela Galvão, Juliana Del Sarto, Juliana Priscila, Kátia Maciel, Leandro Bastos, Cristiana Couto, Luciana Tavares, Marina Gomes, Nathália Batista, Rebeca Froés, Rodrigo Uribe, Rafael Elias, Rosália, Soraia Macari, Thiago Henrique, Vivian Louise; à professora Angélica, que me ensinou os primeiros passos experimentais e acadêmicos e

em especial à Lívia Barroso, que desde o início (lá no mestrado) sempre compartilhou comigo todos seus pertences laboratoriais com muito carinho e desprendimento. Agradeço também aos demais membros do grupo Imunofarmacologia, alunos e professores, inúmeros integrantes que compõem esse grupo rico e diverso! Não entrarei em detalhes individuais, porque são muitas pessoas, mas cada um teve uma contribuição muito importante em minha formação;

A todos os integrantes do grupo Imunometabolismo, em especial às amigas da graduação e as que fiz nesses últimos anos, que contribuíram em meus experimentos, ou nas experiências compartilhadas, são elas: Ana Maria, pela amizade e orientações desde a graduação e a alegria de sempre; Débora Rodrigues, a pessoa que mais me entende nas piadas e palhaçadas, uma pessoa maravilhosa e divertida, obrigada pelas risadas garantidas; Débora Romualdo, pela parceria profissional intensa, pelos domingos realizando experimentos, pelas discussões científicas sempre à altura e pela amizade que construímos; Jaqueline Lana, pelas décadas de amizades (já coloquei no plural para facilitar) que já se foram e pelas que ainda virão, pelos finais de semana de estudo (passados e futuros)! Kátia Anunciação, pela doçura e amizade que conquistei no doutorado, fiquei feliz demais em te conhecer e em ter trabalhado com você esses últimos anos. Laís, a qual tive mais contato no mestrado, mas que sempre esteve presente com sua energia contagiante e que será minha próxima dupla de trabalho, espero que seja uma parceria de sucesso. Marina Zicker pela similaridade que compartilhamos e que descobrimos mais no final da nossa jornada, mas que valeu a pena, todas as discussões profissionais, políticas, da vida, capilares, estéticas, burocráticas que realizamos. Pessoa dedicada e inteligente! Admiro-te pelo profissionalismo e dedicação e continuarei tirando minhas dúvidas e discutindo política contigo. E às alunas de iniciação científica maravilhosas que pude ter contato: Lídia Rocha pela ajuda inicial, que foi

importantíssima! Amanda e Josiana por sempre estarem disponíveis e pela proatividade! E em especial, minha filha acadêmica, Daniela Moutinho, que me aguentou por dois anos bastante intensos e desafiadores, obrigada pelas ajudas aos sábados, domingos, enfim, em vários momentos. Em especial agradeço a Marina Oliveira, Ninoca, que é uma colaboradora irmã, amiga e inspiradora! Sua determinação e dedicação serão reconhecidas muito em breve e eu serei a primeira pessoa a comemorar o seu sucesso com você! Muito obrigada por todos os dias que você me ajudou, mais da metade do que sei hoje em relação as atividades laboratoriais foi você quem me ensinou e sou eternamente grata a isso, obrigada pela sua memória também! Você nos estimula sempre a atingir nossa capacidade máxima com toda sua empolgação científica. Vivemos muitos momentos felizes e outros estressantes, no laboratório, mas todos com saldo positivo e que contribuíram e contribuem muito para meu desenvolvimento e amadurecimento profissional. E que mais anos de parcerias venham por aí! Agradeço também aos demais membros do grupo Imunometabolismo.

Ao professor Caio Fagundes, com sua paciência constante e suporte nesses últimos anos de doutorado, muito obrigada pela ajuda e por todas as dúvidas que você me auxiliou a sanar;

Ao professor Flávio Amaral, que sempre está presente para nos auxiliar, orientar e ensinar;

À professora Milene Rachid, que auxiliou nas análises histopatológicas e sempre está disposta a discutir os resultados obtidos, uma colaboração imprescindível;

À Zélia Menezes e Érica Leandro que me ajudaram muito nas discussões experimentais, análises de dados e nos ensinamentos sempre enriquecedores;

À Ilma e Frank, que estão no laboratório sempre para nos ajudar, fornecendo todo o suporte técnico necessário;

Aos amigos que o ICB me proporcionou Andrea Ferreira, Bárbara Oliveira, Bruna Emerich, Cynthia Honorato, Daniela Reis, Julia Gomes, todas sempre com alegria contagiante, muito obrigada por tornar os dias mais leves e descontraídos;

Aos meus amigos de colégio, faculdade e da vida: Adna Luciana, Ana Alice, Felipe Vinícius, Fillipe Marçal, Ísis Eloah, Juliana Oliveira, Luíza Helena, Luana Oliveira, Marcella Amorim, Nathália Beltrão, Nathália Luíza, Sarah Fiorini, Stephanie Bispo, Thaís Costa, Ana Paula, Daniela Cristina, Mariana Borges, Marina Nogueira, Laura Xiol, Larissa Sousa pelo companheirismo, amizade e por entenderem os vários momentos de ausência. Cada um de vocês é especial para mim;

À minha família, principalmente meu marido Frederico, que teve que aguentar todas as minhas ausências, meu estresse, durante esses últimos anos; à minha tia Suely, à minha mãe “Dôra”, ao meu padrasto “Nêgo”, ao meu irmão Gustavo, às (aos) tias (os), primas (os) pela paciência e torcida que tiveram para eu vencer mais essa batalha;

Finalmente, agradeço ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG pela oportunidade de realizar esta Tese de Doutorado e a todo o corpo docente pelos conhecimentos fundamentais que foram transmitidos.

## RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas cuja incidência tem aumentado mundialmente. O uso de prebióticos e probióticos demonstra ser estratégia terapêutica promissora para o tratamento das DII, devido à capacidade em modular a microbiota intestinal, provável agente desencadeador dessas doenças em indivíduos susceptíveis. Resultados anteriores demonstraram que animais pré-tratados, mas não tratados com dieta rica em fibra alimentar (pectina), que apresenta potencial efeito prebiótico, apresentaram redução na resposta inflamatória colônica crônica induzida por sulfato de sódio dextrana (*dextran sulfate sodium* - DSS), em camundongos BALB/c fêmeas. Um dos objetivos do atual trabalho foi avaliar se o uso concomitante de dieta rica em pectina e do probiótico, *Bifidobacterium longum* 51A, no mesmo modelo de colite crônica, teria efeito terapêutico. O uso da dieta rica em fibra, do probiótico ou da associação de ambas as terapias não reduziu os escores clínicos e histopatológicos da colite experimental induzida por DSS, um tipo de modelo de DII. A intervenção preventiva foi, de fato, mais eficiente em relação ao tratamento terapêutico. Associada à resposta inflamatória intestinal observam-se alterações metabólicas nas DII. Outro objetivo do trabalho foi estudar a progressão das alterações metabólicas sistêmicas, no tecido adiposo e fígado de animais com colite aguda e crônica induzida por DSS. Camundongos BALB/c fêmeas submetidas à colite experimental demonstraram adaptações metabólicas na fase aguda da doença como: redução na concentração sérica de glicose e aumento nas concentrações de colesterol total e de triglicerídeos, acompanhado por redução na expressão das enzimas hepáticas glicose-6-fosfatase e piruvato quinase, além de redução do conteúdo de gordura hepática e aumento de estresse oxidativo nesse órgão. Observou-se também inflamação do tecido adiposo e alterações na produção de adipocinas, como redução nas concentrações de adiponectina e resistina e aumento nas concentrações de leptina sérica. Essas adaptações iniciais levaram a um quadro de intolerância à glicose e resistência insulínica na colite crônica, com características similares às observadas na síndrome metabólica: aumento de glicemia, colesterol total, triglicérides, dentre outras alterações. Visto que a leptina se mostrou alterada na fase aguda e crônica da inflamação intestinal experimental e por apresentar característica pró-inflamatória, outro objetivo do atual trabalho foi avaliar o papel dessa molécula na resposta inflamatória intestinal. Observou-se que a ausência da sinalização da leptina, em camundongos *db/db*, induziu proteção à inflamação intestinal, por meio da

redução de neutrófilos e eosinófilos no cólon desses animais e, conseqüentemente redução da lesão tecidual induzido por DSS. Esses resultados demonstram o papel da leptina como fator contribuinte da resposta inflamatória intestinal experimental e demonstram a associação clara entre metabolismo e resposta inflamatória. A alteração de suas concentrações tanto na fase aguda quanto crônica da doença compõe um cenário complexo de adaptações/alterações metabólicas, como descrito acima, que poderiam contribuir para o aumento no risco de doenças crônicas secundárias observadas nas DII.

**Palavras chaves:** colite, fibra alimentar, alteração metabólica, fígado, tecido adiposo, leptina.

## ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic diseases whose incidence is increasing worldwide. Prebiotics and probiotics are promising therapeutic strategies in the treatment of IBD due to the ability to modulate the intestinal microbiota, which is one potential factor that triggers these diseases in susceptible individuals. Previous results showed that pre-treated mice, but not that treated with high fiber diet (pectin), which presents a potential prebiotic effect, showed a reduction in colonic inflammatory response induced by five *dextran sulfate sodium* (DSS)-cycles in female BALB/c mice. The first aim of this work was to evaluate the therapeutic use of high fiber diet associated with the probiotic, *Bifidobacterium longum* 51A, in the same colitis chronic model described above. Even the high fiber diet, probiotic or association of both therapies were not able to reduce the clinical and histopathological scores of the experimental colitis, a type of IBD model, in animals that received DSS. Showing that, in the experimental design used, the preventive intervention was more efficient rather than therapeutic treatment. Metabolic changes are associated with the inflammatory response and, therefore, another objective of the present study was to study the progression of systemic metabolic alterations, in the adipose tissue and the liver of mice with acute and chronic DSS-induced colitis. Female BALB/c mice subjected to experimental acute colitis showed metabolic adaptations such as: a reduction in glycaemia and an increase in total cholesterol and triglycerides concentrations; followed by a reduction in glucose-6-phosphatase and pyruvate kinase expressions in the liver of DSS mice; hepatic fat content reduction and increase in oxidative stress in this organ. Acute colitis induced adipose tissue inflammation associated with reduction in adiponectin and resistin, and increase in leptin concentration. Taken together, these initial adaptations led to glucose intolerance and insulin resistance in chronic colitis, similar to metabolic syndrome, such as: increased glucose, total cholesterol, triglycerides levels, among others. Since leptin levels was altered in the acute and chronic phase of experimental intestinal inflammation and because of its proinflammatory characteristics, another objective of the present study was to evaluate the role of leptin in inflammatory bowel response. Lack of leptin signaling, in *db/db* mice, induced protection against intestinal inflammation due to reduction in neutrophils and eosinophils cells in the large intestine and, consequently, reduction in tissue damage induced by the DSS. These results demonstrate the role of leptin as a contributing factor for the experimental intestinal inflammatory response as well as the

clear association between metabolism and inflammatory response. The alteration of its concentrations, in both acute and chronic phases of disease, composes a complex scenario of metabolic adaptations/alterations, aforementioned, which could increase the risk of secondary chronic diseases observed in IBD. **Key word:** colitis, fiber diet, metabolic alteration, liver, adipose tissue, leptin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento experimental I.....	38
Figura 2. Progressão da resposta inflamatória colônica, das adaptações metabólicas séricas e da expressão de moléculas relacionados ao metabolismo no cólon de animais submetidos à colite aguda por DSS. ....	53
Figura 3. Avaliação das concentrações de adipocinas séricas e de parâmetros inflamatórios e metabólicos no tecido adiposo.....	55
Figura 4. Análises hepáticas de animais submetidos à indução de colite aguda por DSS .....	57
Figura 5. Avaliação da progressão da doença e análises séricas após cinco ciclos de administração de DSS.....	59
Figura 6. Adipocinas séricas e parâmetros inflamatórios no tecido adiposo e no fígado de camundongos submetidos à colite experimental crônica .....	61
Figura 7. Avaliações da resposta glicêmica no modelo de colite aguda e na fase de remissão em camundongos submetidos a um ciclo de administração de DSS.....	64
Figura 8. Resumo das principais adaptações e alterações metabólicas demonstradas durante inflamação colônica aguda e crônica induzida pela administração de DSS.....	65
Figura 9. Delineamento experimental II.....	78
Figura 10. Delineamento experimental III .....	80
Figura 11. Avaliação da resposta inflamatória induzida pela administração aguda de DSS em animais selvagens e deficientes para o receptor de leptina.....	88
Figura 12. Curva de sobrevivência, ingestão alimentar e alterações metabólicas em animais selvagens e deficientes para receptor de leptina .....	90
Figura 13. Análises de órgão chaves para o metabolismo durante colite aguda induzida por DSS .....	92
Figura 14. Avaliação da resposta inflamatória no intestino delgado de animais WT e deficientes para o receptor de leptina em modelo experimental de mucosite induzida por 5-FU.....	96
Figura 15. Avaliação da resposta sistêmica, metabólica e sobrevida de animais WT e deficientes para o receptor de leptina com mucosite experimental induzida por 5-FU .	97

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição da dieta experimental - uso em animais com idade superior a seis semanas.....	40
<b>Tabela 2.</b> Sequências dos oligonucleotídeos para as reações de PCR em Tempo Real.	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

2D: administração de DSS por 2 dias

4D: administração de DSS por 4 dias

5-FU: *5-Fluorouracil*

6D: administração de DSS por 6 dias

AGCC: ácidos graxos de cadeia curta

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato aminotransferase

CD: *Crohn's disease* - doença de Crohn

cDNA: DNA complementar

CEBIO: Centro de Bioterismo

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CPT1: *carnitine palmitoyl transferase 1* - carnitina palmitoiltransferase 1

*db*: diabetes - diabetes

DII: doenças inflamatórias intestinais

DNBS: *dinitrobenzene sulfonic acid* - ácido dinitrobenzenossulfônico

DSS: *dextran sulfate sodium* - sulfato de sódio dextrana

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay* - ensaio imunoenzimático

EPM: erro padrão da média

EPO: peroxidase eosinofílica

FAO: *Food and Agricultural Organisation*

GLUT: *glucose transporter* - transportador de glicose

GSH: glutationa reduzida

H&E: hematoxilina e eosina

H<sub>2</sub>O: água

HDL: *high-density lipoprotein* - lipoproteína de alta densidade

HSL: *hormone sensitive lipase* - lipase hormônio sensível

HTAB: *hexadecyl trimethyl ammonium bromide*

i.p: intraperitoneal

ICB: instituto de ciências biológicas

IL: *interleukin* - interleucina

LEPR: leptina receptor - receptor da leptina

LPL: *lipoprotein lipase* - lipase lipoproteica

MDA: *malonyldialdehyde* - malonaldialdeído

MPO: mieloperoxidase

NaCl: cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

NEFA: *non-esterified fatty acids* - ácidos graxos não-esterificados

*ob*: *obese* - obeso

OD: densidade óptica

OPD: o-fenilenodiamina

PBS: *phosphate-buffered saline*

PKM: *pyruvate kinase* - piruvato quinase

qPCR: *quantitative polymerase chain reaction* - PCR quantitativa

RT-PCR: *Real-time polymerase chain reaction* - PCR em Tempo Real

SCD: *stearoyl-CoA desaturase* - estearoil-CoA dessaturase

SGLT1: *sodium-glucose linked transporter 1* - co-transportador de glicose dependente de sódio 1

TBARS: *thiobarbituric acid-reactive substance* - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNBS: trinitrobenzenesulfonic-acid - ácido trinitrobenzenossulfônico

TNF: *tumor necrosis factor* - fator de necrose tumoral

TTOG: teste de tolerância oral à glicose

UC: *ulcerative colitis* – colite ulcerativa

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

VLDL: *very-low-density lipoprotein* - lipoproteína de muito baixa densidade

WHO: *World Health Organisation*

WT: *wild-type* - selvagens

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
1.1 Doenças inflamatórias intestinais .....	1
1.2 Prebiótico e probiótico nas DII .....	2
1.3 Modelos experimentais de doença inflamatória intestinal.....	4
1.4 Consequências sistêmicas das DII .....	5
1.5 Fígado e tecido adiposo nas doenças inflamatórias intestinais.....	7
1.6 Leptina.....	9
1.7 Mucosite .....	10
2. Justificativa .....	13
3. Objetivo Geral .....	15
3.1 Objetivos Específicos .....	15
4. Resultados .....	16
4.1 Capítulo 1 - Avaliação do efeito terapêutico da dieta rica em fibra e do probiótico <i>Bifidobacterium longum 51A</i> em modelo experimental de colite crônica .....	16
4.2 Capítulo 2 - Progressão das alterações metabólicas na colite induzida por DSS.....	35
Introdução.....	35
Materiais e métodos .....	37
Animais utilizados .....	37
Modelo de colite experimental aguda e crônica .....	37
Avaliação do escore clínico e progressão da colite experimental .....	39
Diets utilizadas durante os delineamentos experimentais .....	39
Análises histopatológicas do cólon .....	40
Avaliação de parâmetros inflamatórios .....	41
Parâmetros metabólicos avaliados .....	44
Análises hepáticas .....	45
Real-time polymerase chain reaction - PCR em Tempo Real (RT-PCR) .....	47

<i>Análises estatísticas</i> .....	50
Resultados .....	51
Discussão .....	66
Conclusão .....	72
4.3 <i>Capítulo 3 - Papel da leptina na inflamação intestinal experimental</i> .....	74
Introdução .....	75
Materiais e métodos .....	77
<i>Animais utilizados</i> .....	77
<i>Modelo de colite aguda experimental</i> .....	77
<i>Avaliação do escore clínico e progressão da colite experimental</i> .....	78
<i>Modelo de indução de mucosite experimental, avaliação do escore clínico e progressão da doença</i> .....	79
<i>Dieta utilizada durante os delineamentos experimentais</i> .....	80
<i>Análises histopatológicas do cólon e intestino delgado</i> .....	81
<i>Avaliação de parâmetros inflamatórios</i> .....	82
<i>Parâmetros metabólicos séricos avaliados</i> .....	86
<i>Análises estatísticas</i> .....	86
Resultados .....	87
Discussão .....	97
Conclusão .....	101
5. Considerações gerais .....	102
6. Referências bibliográficas .....	104

## 1. Introdução

### 1.1 Doenças inflamatórias intestinais

As doenças inflamatórias intestinais (DII), incluindo colite ulcerativa (*ulcerative colitis* - UC) e doença de Crohn (*Crohn's disease* - CD), são doenças crônicas (Cosnes *et al.*, 2011), resultantes de intensa resposta inflamatória no trato gastrointestinal e com consequências graves ao paciente como: perda de peso, diarreia, febre, dor abdominal e encurtamento colônico (Hendrickson *et al.*, 2002). A UC acomete principalmente a região do cólon e é caracterizada por inflamação da mucosa, com presença de úlceras, perda de criptas e intenso infiltrado inflamatório (Bischoff *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1997; Strober *et al.*, 2002; Lampinen *et al.*, 2008). Já a CD pode acometer qualquer porção do trato gastrointestinal (TGI), apresenta inflamação transmural e de forma segmentar. O envolvimento colônico é comum em 70% dos pacientes e as complicações perianais (fístula e abscessos) são relatadas em um terço dos casos documentados (Xavier e Podolsky, 2007; Louis, 2012). Associados a esses sinais e sintomas, os pacientes apresentam desnutrição, hipoalbuminemia, anemia, deficiências de vitaminas e minerais secundárias à anorexia e má-absorção de nutrientes (Mijac *et al.*, 2010; Testa *et al.*, 2015). Devido à presença de inflamação crônica e à necessidade de uso de medicamentos imunossupressores por longos períodos, as DII são importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer de cólon (Axelrad *et al.*, 2016). A incidência desse câncer em pacientes com a doença ativa por mais de 30 anos é em torno de 18-20% em pacientes com UC e 8% na CD (Grivennikov, 2012).

As DII possuem impacto mundial e sua incidência tem crescido em todos os países ao longo dos anos, dentre eles o Brasil (Loftus, 2004; Brasil, 2010; Molodecky *et al.*, 2012). As DII são complexas e acredita-se que vários são os fatores que contribuem para

o seu desenvolvimento, incluindo fatores genéticos (Duerr *et al.*, 2006), destruição da barreira epitelial (Heller *et al.*, 2005), microbiota intestinal alterada (Martinez-Medina *et al.*, 2006) e fatores ambientais como hábitos alimentares, amamentação, fumo, uso de anticoncepcional (Sakamoto *et al.*, 2005; Gearry *et al.*, 2010). O uso crônico de imunossupressores, principal tratamento para as DII, pode desencadear nos pacientes diversos efeitos colaterais dentre eles hipertensão, distúrbios gastrointestinais, hipercolesterolemia, aumento da incidência de infecções, entre outros. Outra opção de tratamento é o uso de fármacos biológicos, o uso de anti-TNF, primeiro agente biológico a ser aprovado para o tratamento de CD, tem se correlacionado a maiores taxas de infecções oportunistas e complicações perioperativas (Martinez-Montiel *et al.*, 2015). Apesar do constante desenvolvimento de fármacos para o tratamento das DII, e inclusão de fármacos biológicos, ainda é necessário o desenvolvimento de medicamentos e/ou tratamentos mais efetivos, visando principalmente à redução de efeitos colaterais, alguns acima citados (Kurtovic e Segal, 2004; Ardizzone e Bianchi Porro, 2005; De Cassan *et al.*, 2012).

## ***1.2 Prebiótico e probiótico nas DII***

Nos últimos anos, trabalhos têm sugerido que o uso de prebióticos, dentre eles alguns tipos de fibras alimentares, e probióticos pode ser alternativa importante para o tratamento das DII (Komiyama *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013). Ambas as estratégias reduzem a inflamação por meio da modulação da microbiota e produção de moléculas protetoras ao trato gastrointestinal (Miyachi *et al.*, 2013), dentre elas os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que apresentam ação anti-inflamatória (Macfarlane e Macfarlane, 2003; Maslowski *et al.*, 2009; Flint *et al.*, 2012). As fibras alimentares são macromoléculas de carboidratos resistentes à hidrólise, por meio da ação das enzimas do

trato gastrointestinal, sendo posteriormente fermentadas pela microbiota intestinal e induzindo alteração em seu perfil (Roberfroid, 1993). As fibras são classificadas classicamente de acordo com sua solubilidade em água, como solúveis (exemplo: goma guar, pectina,  $\beta$ -glucana, inulina, fructooligosacarídeos [FOS] e galactooligosacarídeos [GOS]) e insolúveis (exemplo: lignina e celulose) (Meyer e Stasse-Wolthuis, 2009). FOS e GOS foram as primeiras fibras alimentares classificadas como prebióticos, apesar de outras fibras apresentarem potencial efeito. Em relação aos prebióticos a definição mais ampla para essa terminologia seria: “ingrediente, que ao ser fermentado no cólon, promove alteração específica na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo saúde ao hospedeiro” (Roberfroid *et al.*, 2010; Vyas e Ranganathan, 2012). O principal objetivo para o uso de prebióticos na prática clínica seria a indução do aumento na população de lactobacilos e bifidobactérias na microbiota intestinal (Roberfroid, 2007).

Estudos demonstram que o uso de alimentos fontes de fibra alimentar em humanos com UC melhorou os sinais clínicos da doença nos pacientes, sem efeito colateral e com modulação da microbiota intestinal (Kanauchi *et al.*, 2002); além de prolongar o período de remissão em pacientes com essa doença (Fernandez-Banares *et al.*, 1999; Hanai *et al.*, 2004). Efeito benéfico também foi observado em modelo de colite experimental, cujo uso da fibra alimentar parece reduzir a inflamação, diminuir a lesão colônica (Rodriguez-Cabezas *et al.*, 2002; Galvez *et al.*, 2005; Fava e Danese, 2011) e influenciar na cicatrização do tecido colônico lesionado, durante o processo inflamatório (Moreau *et al.*, 2003). A fibra também parece reduzir o desenvolvimento de tumor na colite experimental crônica induzida por DSS (Komiyama *et al.*, 2011).

Os probióticos, outra estratégia de modulação da microbiota intestinal, segundo definição adotada pelo *Food and Agricultural Organisation* (FAO) of the *United Nations*

and the World Health Organisation (WHO), são: “Microorganismos vivos que, quando administrados em adequada quantidade, conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro” (Martins *et al.*, 2009; Vyas e Ranganathan, 2012). Apesar de ser ainda limitado o número de estudos com probiótico nas DII, observam-se resultados encorajadores da terapia por probiótico na colite experimental, na qual a administração de algumas cepas de bactérias reduziu a resposta inflamatória nos animais com a doença (Shibolet *et al.*, 2002; Peran *et al.*, 2005; Gionchetti *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2013). Dentre os microrganismos mais utilizados como probiótico atualmente podemos citar os lactobacilos e as bifidobactérias, no entanto, *Escherichia coli* não patogênica e levedura *Saccharomyces boulardii* também têm apresentado efeitos benéficos (Shanahan, 2004). Em relação às bifidobactérias, a *Bifidobacterium longum* tem efeito probiótico em diversos tratamentos, a citar na infecção por patógenos, onde se acredita que tal efeito seja devido a maior produção de acetato, um tipo de AGCC com conhecido efeito anti-inflamatório (Maslowski *et al.*, 2009; Fukuda *et al.*, 2011).

### ***1.3 Modelos experimentais de doença inflamatória intestinal***

Estudos iniciais para o desenvolvimento e aplicação de novas estratégias terapêuticas se dão pelo uso de modelos experimentais, que apesar de não apresentarem todas as características das DII, devido a sua complexidade, são considerados ferramentas importantes e auxiliam também na compreensão de elementos associados à fisiopatologia. Os modelos experimentais comuns para a UC são: modelo de colite espontâneo, colite induzida, animais geneticamente modificados, e modelo de transferência adotiva de células T para animais com imunodeficiência combinada grave (Okayasu *et al.*, 1990; Elson *et al.*, 1995; Asseman *et al.*, 1999; Perse e Cerar, 2012). Dentre esses, um dos mais utilizados é o de colite induzida por administração de

substâncias químicas, como, por exemplo, pelo uso de sulfato de sódio dextrana, DSS. Esse agente químico gera resposta inflamatória intensa no cólon dos animais, com recrutamento de células inflamatórias, mimetizando algumas das características observadas na doença humana (Perse e Cerar, 2012). As manifestações clínicas nos animais submetidos ao tratamento com DSS são perda de peso, diarreia, presença de sangue oculto nas fezes, piloereção, anemia e, eventualmente, morte. Na fase crônica da doença pode ser identificada displasia no cólon dos animais, semelhante ao observado em humanos (Perse e Cerar, 2012).

A vantagem do uso do DSS seria a possibilidade de execução de modelo agudo e crônico, por meio da alteração na concentração do agente químico utilizado. Além disso, no modelo crônico existe a possibilidade do agente químico ser administrado em forma de ciclos, com períodos de resposta inflamatória intercalada por períodos de remissão da doença (Okayasu *et al.*, 1990), característica similar ao observado nas DII em humanos. Além do mais, o uso de DSS induz alteração no perfil da microbiota intestinal, um dos possíveis fatores desencadeantes das DII em humanos (Nagalingam *et al.*, 2011).

#### ***1.4 Consequências sistêmicas das DII***

Em associação à resposta inflamatória crônica, pacientes com DII apresentam aumento no risco de insuficiência cardíaca (Kristensen *et al.*, 2014); aumento da espessura das camadas íntima-média da carótida (um indicador para o risco de doenças cardiovasculares - DCV), e consequentemente maior risco de desenvolvimento de aterosclerose e outras DCV (Van Leuven *et al.*, 2007; Rungoe *et al.*, 2013; Theocharidou *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2015). O risco aumentado de doenças cardiovasculares pode ser devido a alterações metabólicas diversas, também observadas em pacientes com DII. Bregenzer e colaboradores (2006) observaram resistência insulínica em pacientes com

CD. Da mesma forma, Valentini e colaboradores em 2009 demonstraram aumento nas taxas de hiperinsulinemia, acompanhado por glicemia normal, nos pacientes com DII (Valentini *et al.*, 2009). Adicionalmente, Ripollés Piquer e colaboradores (2006) mostraram alteração no perfil lipídico sérico em pacientes com DII, como reduções do colesterol total e da lipoproteína de alta densidade (*high-density lipoprotein* HDL), acompanhadas por aumento na concentração de triglicérides. Dado esse confirmado parcialmente por Sappati Biyyan e colaboradores em (2010) que também demonstraram redução das concentrações de colesterol total e HDL, no entanto, apenas indivíduos do sexo masculino mostraram aumento nas concentrações de triglicérides sérico.

Além disso, as adipocinas, moléculas produzidas principalmente pelo tecido adiposo, apresentam concentrações alteradas em pacientes com DII em relação às pessoas saudáveis. Como demonstrado por Barbier e colaboradores (2003) pacientes com CD e UC apresentaram aumento na expressão de leptina em amostra de tecido adiposo mesentérico. Resultado esse que corrobora com os achados de Paul e colaboradores (2006) que mostraram aumento na secreção de leptina e adiponectina em fragmentos de tecido adiposo retirado próximo à região intestinal inflamada (cultura de 24h) de pacientes com CD (Barbier *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2006). Em relação às concentrações sistêmicas das adipocinas, Valentini e colaboradores (2009) demonstraram concentrações similares de leptina entre indivíduos com DII e saudáveis, no entanto, os autores identificaram aumento na concentração de resistina e redução na de adiponectina. Já Waluga e colaboradores (2014) demonstraram concentrações séricas de leptina reduzidas em pacientes com CD ou UC, enquanto a concentração de resistina mostrou-se elevada em ambas as doenças. Conforme pode ser observado, existe importante variabilidade entre os resultados demonstrados, indicando que as alterações metabólicas em pacientes com DII não apresentam um perfil único, assim como demonstrado por Karrasch e

Schaeffler (2016) em sua revisão literária. As diferenças variam de acordo com os trabalhos publicados e podem ser devido à fase da doença ou qual doença foi avaliada.

Em modelo de colite experimental induzida por DSS, Melgar e colaboradores (2007) demonstraram alterações metabólicas nos camundongos avaliados, como: redução na taxa metabólica de repouso e alteração nas concentrações de marcadores metabólicos séricos. Dentre as alterações, observaram-se redução nas concentrações de triglicérides, glicose, leptina e aumento nas concentrações de colesterol na fase aguda da doença; já na fase crônica, induzida por administração de apenas um ciclo de DSS, os autores identificaram redução de glicose e leptina séricos (Melgar *et al.*, 2007).

### ***1.5 Fígado e tecido adiposo nas doenças inflamatórias intestinais***

O fígado é órgão central na homeostase metabólica e o principal sítio de síntese, armazenamento e distribuição de carboidratos, lipídeos e proteínas (Bechmann *et al.*, 2012). Alterações nesse órgão, induzida pela resposta inflamatória intestinal, poderiam justificar, em parte, as alterações metabólicas anteriormente descritas. De fato, observaram-se distúrbios extra-intestinais em pacientes com DII, dentre eles, alterações nos testes de função hepática, como aumento nas concentrações de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, gama-glutamil transpeptidase ou bilirrubina total (Gisbert *et al.*, 2007; Levine e Burakoff, 2011; Cappello *et al.*, 2014).

Karlsson e colaboradores (2008) demonstraram em modelo experimental que *hamsters* submetidos a tratamento com DSS, por seis dias, apresentaram aumento nas concentrações de triglicérides séricos associado à alteração na expressão de moléculas relacionadas ao metabolismo lipídico no fígado desses animais, por meio da redução na expressão da acilcoA oxidase, enzima inicial da  $\beta$ -oxidação, e aumento na expressão de

lipase lipoproteica, sem presença de resposta inflamatória hepática (Karlsson *et al.*, 2008). Chi Chen e colaboradores (2008) também demonstraram, por meio de análise do metaboloma, que a administração de DSS em camundongos por sete dias inibiu a expressão das enzimas esteroil-CoA dessaturase 1 (*stearoyl-CoA desaturase 1* - SCD1), acetil-coA carboxilase e ácido graxo sintase, no fígado dos animais. Os autores atribuem à presença de endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias provenientes da resposta inflamatória colônica como mediadores dessas alterações. A inibição dessas enzimas compromete a função hepática quanto à síntese de lipídios de forma geral. No caso da inibição da SCD1, por exemplo, os autores observaram aumento nas lisofosfatidilcolinas saturadas, em detrimento das insaturadas, fator esse que os autores correlacionam à exacerbação da resposta inflamatória nos animais submetidos à colite experimental (Chen *et al.*, 2008). Miyazaki e colaboradores (2000) já haviam descrito anteriormente que camundongos deficientes para SCD apresentam redução na síntese de ésteres de colesterol e triglicérides hepáticos, apesar de apresentarem normais as atividades das enzimas diretamente relacionadas à produção dessas moléculas: acil-coA:colesterol aciltransferase e glicerol fosfato aciltransferase. Farombi e colaboradores (2016) demonstraram, recentemente, que a colite induzida por administração de DSS por cinco dias induziu não apenas inflamação intestinal, mas também resposta inflamatória hepática nos animais com colite experimental, por meio do aumento na atividade da mieloperoxidase e nas concentrações das citocinas fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor* - TNF)- $\alpha$  e interleucina (*interleukin* - IL)-6. Associada a essa resposta inflamatória, os autores identificaram alteração da função hepática por aumento nas enzimas ALT e AST, além da presença de estresse oxidativo nesse órgão.

Outro órgão endócrino importante para a homeostase metabólica é o tecido adiposo. Esse tecido é responsável pela produção e secreção de inúmeras moléculas

relacionadas tanto com a resposta inflamatória quanto metabólica (Mohamed-Ali *et al.*, 1998). Em pacientes com CD, tem sido demonstrada hipertrofia do tecido adiposo mesentérico ao redor do intestino inflamado (Sheehan *et al.*, 1992; Kredel e Siegmund, 2014) cuja função ainda necessita ser melhor investigada. Conforme relatado anteriormente, alterações na secreção de adipocinas, no tecido adiposo adjacente à região inflamada do trato gastrointestinal acometida pelas DII têm sido observadas (Barbier *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2006), bem como em suas concentrações circulantes (Karmiris *et al.*, 2006). Alterações similares são observadas em modelo experimental de DII. Gambero e colaboradores (2007), mostraram que região do tecido adiposo mesentérico próxima ao linfonodo apresentou aumento na produção de citocinas e adipocinas, como: leptina, adiponectina e TNF- $\alpha$ . Produção aumentada provavelmente pela maior presença de células imunológicas infiltradas no tecido adiposo mesentérico, identificado em camundongos submetidos à administração de DSS (Mustain *et al.*, 2013; Olivier *et al.*, 2014). Nesse contexto, Batra e colaboradores (2012) sugerem que o tecido adiposo mesentérico possui potencial fator protetor relativo ao controle da translocação bacteriana, observada em modelo de colite experimental crônica induzida por DSS, por meio da retenção de microrganismos nesse tecido e redução da entrada de patógenos para a circulação.

### **1.6 Leptina**

A leptina foi inicialmente descrita como hormônio produzido e secretado principalmente pelo tecido adiposo, produto do gene *ob* (*obese gene*), que apresenta como função principal a inibição do apetite, via sinalização no sistema nervoso central (Zhang *et al.*, 1994). Estudos subsequentes também demonstraram que a ausência de leptina induziu não apenas obesidade, mas também, função reprodutiva anormal (Perez-Perez *et al.*, 2015); imunidade das células T comprometida (Lord *et al.*, 1998) e alteração na

hematopoiese (Bennett *et al.*, 1996). No contexto das DII, a leptina foi associada e descrita como mediador essencial na inflamação intestinal em camundongos submetidos à colite crônica induzida por DSS e por ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid - TNBS), uma vez que, camundongos deficientes para a produção de leptina (*ob/ob mice*) apresentaram atenuação da inflamação intestinal (Siegmond *et al.*, 2002). Corroborando com esses dados, Singh e colaboradores (2013) demonstraram efeito protetor do uso de antagonista de leptina em animais deficientes para IL-10, que desenvolve espontaneamente colite crônica.

O receptor da leptina (LEPR) em camundongos é codificado pelo gene do diabetes (*db*). A leptina exerce o seu efeito por meio de ligação ao receptor de isoforma longa, que apresenta domínio intracelular e, portanto, efetiva a sinalização para o interior da célula. LEPR, receptor homólogo à classe I de receptores de citocina, confere à leptina a classificação de citocina com características pró-inflamatórias. Similar aos animais *ob/ob*, camundongos LEPR deficientes (*db/db*) apresentam alterações nas respostas imunológica e inflamatória (Tartaglia, 1997); hiperfagia e desenvolvem, precocemente, obesidade associada à esteatose hepática (Bates *et al.*, 2003). Gove e colaboradores (2009) mostraram em estudo que animais *db/db*, assim como os animais *ob/ob*, apresentaram redução da resposta inflamatória colônica em modelo de colite induzida por DSS, por meio da atenuação de lesão intestinal, redução do escore clínico da doença e menor produção de citocinas e quimiocinas pelo órgão acometido pela doença.

### **1.7 Mucosite**

Outra inflamação que acomete o trato gastrointestinal com consequências clínicas importantes aos indivíduos que a apresenta é a mucosite. Essa doença é uma das complicações mais graves presente em pacientes submetidos ao tratamento do câncer,

cuja incidência encontra-se em torno de 40 a 80% nos indivíduos submetidos à radioterapia e/ou quimioterapia (Lalla *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2014). Esse efeito colateral pode acometer a cavidade oral, mucosite oral, mas também outras regiões do trato gastrointestinal como, por exemplo, o intestino, quadro conhecido como mucosite intestinal. A mucosite apresenta como sinais e sintomas a diarreia, náuseas, vômitos, dor abdominal e má absorção (Lalla *et al.*, 2008; Van Vliet *et al.*, 2010). Os agentes quimioterápicos mais estudados na literatura e que induzem mucosite intestinal são fluorouracila, metotrexato e irinotecano (Logan *et al.*, 2008; Sezer *et al.*, 2009; Beutheu Youmba *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2012; Arifa *et al.*, 2014).

A mucosite é caracterizada por presença de lesões eritematosas na mucosa do trato gastrointestinal, nos casos brandos, e/ou ulcerativas cujas lesões penetram na camada submucosa com exacerbada resposta inflamatória, causando dor intensa, em casos mais graves (Sonis, 2004). A sua incidência aumenta devido a alguns fatores, dentre eles: associação das intervenções terapêuticas (quimioterapia e radioterapia); quimioterapia agressiva em indivíduos que serão submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas; pacientes cujo tumor primário tenha se originado na cavidade oral, na orofaringe, nasofaringe e glândulas salivares (Sonis, 2004; Lalla *et al.*, 2008). Pacientes que apresentam mucosite estão clinicamente associados à pior prognóstico, visto que as doses e o tratamento contra o câncer são reduzidos ou adiados, contribuindo para aumento da letalidade nesse grupo de indivíduos (Van Vliet *et al.*, 2010). Apesar de sua relevância clínica não existe até o momento protocolo de tratamento para a mucosite (Lalla *et al.*, 2014), e por esse motivo, estudos que tentem descrever e caracterizar os mecanismos envolvidos no seu desenvolvimento ainda são necessários. Nesse contexto, Sukhotnik e colaboradores (2009) demonstraram que o uso de leptina, *in vitro*, em células Caco2 pré-tratadas com metotrexato, agente quimioterápico, estimulou a proliferação celular e inibiu

a apoptose das células. No mesmo trabalho, em modelo *in vivo*, o uso da leptina melhorou a recuperação intestinal e aumentou a renovação do enterócito.

## 2. Justificativa

Tem sido hipotetizado que o aumento na incidência das doenças inflamatórias intestinais se deva à mudança no padrão alimentar mundial, acompanhado por redução na ingestão de produtos *in natura* e ricos em fibras alimentares e aumento no consumo de alimentos industrializados e ricos em carboidratos refinados. Essa hipótese se baseia na modificação da microbiota intestinal induzida pela alimentação, visto que a alteração da microbiota é um dos agentes etiológicos que contribuem para o desencadeamento das DII. Por esse motivo, estratégias que modulam a microbiota, em pacientes com DII, poderiam ser favoráveis e utilizados como novas estratégias no tratamento dessas doenças. Nesse contexto, alguns estudos demonstraram a eficácia do uso de prebiótico e probióticos nas DIIs, no entanto a compreensão do tipo a ser utilizado, o momento do início e forma do tratamento ainda está em debate. Estudo prévio de nosso grupo demonstrou o efeito benéfico do pré-tratamento, mas não do tratamento, com dieta rica em pectina, tipo de fibra solúvel com alta capacidade fermentativa e potencial efeito prebiótico, na redução da resposta inflamatória colônica em modelo de colite aguda e crônica induzida por DSS (Silveira, 2013). Dessa forma, no **Capítulo 1**, hipotetizamos que a modificação da microbiota intestinal, induzida pela resposta inflamatória e presença de DSS no intestino dos animais impossibilita a correta fermentação da dieta rica em fibra, e, por conseguinte inibe o efeito protetor observado por meio do pré-tratamento. Portanto, o fornecimento de uma bactéria, considerada probiótico (*Bifidobacterium longum* 51A) seria capaz de modular a microbiota intestinal e conseqüentemente induzir a adequada fermentação da fibra alimentar fornecida aos animais, recuperando o efeito benéfico da mesma (Silveira *et al.*, 2015).

A presença de resposta inflamatória crônica em indivíduos com DII contribui para quadro de alterações metabólicas e maior risco para o desenvolvimento de outras doenças crônicas secundárias. A relevância e a causa dessas alterações são pouco compreendidas, bem como a progressão e papel na manutenção e/ou exacerbação da resposta inflamatória da DII. Nossa hipótese no **Capítulo 2** foi que a resposta inflamatória intestinal induz adaptações metabólicas iniciais devido ao aumento do gasto energético decorrente da doença. Entretanto, durante estímulo inflamatório persistente o organismo se reprograma a fim de manter todas as funções vitais ativas, o que desencadeiam alterações metabólicas sistêmicas persistentes.

Uma das consequências observadas em pacientes e em modelos experimentais, para DII, são alterações em relação à expressão e secreção de adipocinas, citocinas secretadas em grande quantidade pelo tecido adiposo. Em modelo de colite experimental a leptina, uma das adipocinas alteradas, parece contribuir para o aumento da resposta inflamatória colônica, mas sua relação com as alterações metabólicas observadas nesse modelo ainda não foi descrita na literatura. Em outro modelo de inflamação intestinal, na mucosite, os resultados na literatura ainda são preliminares e contrários em relação à leptina na colite experimental induzida por agente químico, visto que o uso de leptina como tratamento melhorou inflamação intestinal induzida por metotrexato, agente quimioterápico que induz a inflamação intestinal. Assim, os dados atuais da literatura são dúbios em relação ao papel da leptina na resposta inflamatória intestinal experimental. No **Capítulo 3**, trabalhamos com a hipótese de que a leptina, devido às suas características pró-inflamatórias, participaria tanto da resposta inflamatória no modelo de colite como da mucosite experimental.

### **3. Objetivo Geral**

Avaliar o uso de tratamentos alternativos no modelo de colite crônica e identificar alterações sistêmicas e moleculares relacionadas ao metabolismo intermediário em modelo de inflamação intestinal em camundongos.

#### ***3.1 Objetivos Específicos***

3.1.1 Avaliar o efeito terapêutico da dieta rica em fibra e/ou do probiótico *Bifidobacterium longum* 51A em modelo experimental de colite crônica. Resultados serão apresentados no **Capítulo 1** da tese.

3.1.2 Estudar as alterações metabólicas sistêmicas, no tecido adiposo e fígado de animais com colite aguda e crônica induzida por DSS. Resultados serão apresentados no **Capítulo 2** da tese.

3.1.3 Estudar a contribuição da leptina nas alterações inflamatórias e metabólicas sistêmicas, no tecido adiposo e fígado de animais submetidos à colite aguda induzida por DSS. Resultados serão apresentados no **Capítulo 3** da tese.

3.1.4 Estudar a contribuição da leptina na resposta inflamatória intestinal da mucosite aguda induzida pelo quimioterápico *5-fluorouracil*. Resultados serão apresentados no **Capítulo 3** da tese.

## 4. Resultados

### 4.1 *Capítulo 1 - Avaliação do efeito terapêutico da dieta rica em fibra e do probiótico Bifidobacterium longum 51A em modelo experimental de colite crônica*

Trabalho científico:

Silveira, ALM; Ferreira, AVM; Oliveira, MC; Rachid, MA; Sousa, LFC; Martins, FS; Gomes-Santos, AC; Vieira, AT; Teixeira, MM. Preventive rather than therapeutic treatment with high fiber diet attenuates clinical and inflammatory markers of acute and chronic DSS-induced colitis in mice. **Eur J Nutr**, Oct 12 2015. DOI 10.1007/s00394-015-1068-x.

Nesse trabalho, avaliamos o efeito da dieta rica em fibra, pectina, como pré-tratamento e tratamento em modelo de colite aguda e crônica induzido por DSS em camundongos. Avaliamos também, como comparação à ação da dieta rica em fibra, o pré-tratamento e tratamento com acetato, um ácido graxo de cadeia curta, produzido durante fermentação da fibra alimentar pela microbiota intestinal e com conhecido efeito anti-inflamatório.

Os pré-tratamentos com dieta rica em fibra e com acetato foram eficazes em amenizar a resposta inflamatória colônica no modelo de colite aguda, induzida por seis dias de administração de DSS na água de beber. Posteriormente, realizou-se a padronização do modelo de colite crônica induzida por cinco ciclos de DSS (3%), modelo utilizado nos experimentos subsequentes. Por meio do modelo de colite crônica foi possível avaliar o efeito do pré-tratamento e dos tratamentos com dieta rica em fibra com início no terceiro, quarto ou quinto ciclo de DSS e do tratamento com acetato com início

no terceiro ciclo de administração do agente químico. Animais submetidos ao pré-tratamento com dieta rica em pectina demonstraram atenuação da resposta inflamatória colônica na colite crônica. Quando os tratamentos foram iniciados nos camundongos com resposta inflamatória colônica já existente, tanto por meio do uso da dieta rica em fibra como por meio do acetato, não foi observado atenuação ou melhora dos sinais da doença.

Posteriormente, partimos da hipótese de que o fornecimento da dieta rica em fibra, como tratamento, apresentou resultados insatisfatórios devido à alteração da microbiota intestinal induzida pelo DSS. Dessa forma, avaliamos se a associação entre os tratamentos: dieta rica em fibra e o probiótico, *Bifidobacterium longum* 51A, poderiam ser eficazes em atenuar os sinais da doença. No entanto, os resultados obtidos durante o desenvolvimento dessa estratégia experimental foram desfavoráveis. Dessa forma, apesar de apresentarem resultados satisfatórios como intervenções preventivas, em modelo experimental de colite, o uso de fibra alimentar, acetato e probiótico como intervenção terapêutica ainda precisa ser melhor investigada em relação à doses, composição e início de tratamento. Veja abaixo, o artigo em sua íntegra (Silveira *et al.*, 2015).

# Preventive rather than therapeutic treatment with high fiber diet attenuates clinical and inflammatory markers of acute and chronic DSS-induced colitis in mice

Ana Letícia Malheiros Silveira<sup>1</sup> · Adaliene Versiani Matos Ferreira<sup>1,2</sup> · Marina Chaves de Oliveira<sup>1,2</sup> · Milene Alvarenga Rachid<sup>1,3</sup> · Larissa Fonseca da Cunha Sousa<sup>1</sup> · Flaviano dos Santos Martins<sup>4</sup> · Ana Cristina Gomes-Santos<sup>5</sup> · Angelica Thomaz Vieira<sup>1</sup> · Mauro Martins Teixeira<sup>1</sup>

Received: 24 April 2015 / Accepted: 30 September 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

## Abstract

**Purpose** Inflammatory bowel diseases (IBDs) are chronic inflammatory disorders with important impact on global health. Prebiotic and probiotic strategies are thought to be useful in the context of experimental IBD. Here, we compared the effects of preventive versus therapeutic treatment with a high fiber diet (prebiotic) in combination or not with *Bifidobacterium longum* (probiotic) in a murine model of chronic colitis.

**Methods** Colitis was induced by adding dextran sulfate sodium (DSS) to drinking water for 6 days (acute colitis) or for 5 cycles of DSS (chronic colitis).

**Results** Administration of the high fiber diet protected from acute colitis. Protection was optimal when diet was started 20 days prior to DSS. A 5-day pretreatment with acetate, a short-chain fatty acid, provided partial protection against acute colitis. In chronic colitis, pretreatment with the high fiber diet attenuated clinical and inflammatory parameters of disease. However, when the treatment with the high fiber diet started after disease had been established, overall protection was minimal. Similarly, delayed treatment with acetate or *B. longum* did not provide any protection even when the probiotic was associated with the high fiber diet.

**Conclusion** Preventive use of a high fiber diet or acetate clearly protects mice against acute and chronic damage induced by DSS in mice. However, protection is lost when therapies are initiated after disease has been established. These results suggest that any therapy aimed at modifying the gut environment (e.g., prebiotic or probiotic strategies) should be given early in the course of disease.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00394-015-1068-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Mauro Martins Teixeira  
mmtex.ufmg@gmail.com

<sup>1</sup> Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 31270-901, Brazil

<sup>2</sup> Department of Nutrition, Nursing School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>3</sup> Department of General Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>4</sup> Biotherapeutic Agents, Department of Microbiology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>5</sup> Immunobiology, Department of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

**Keywords** Inflammatory bowel disease · DSS · Colitis · High fiber diet

## Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBDs), including Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), are chronic inflammatory disorders with important impact on global health and whose incidence has increased considerably around the world [26, 35]. There are many factors that contribute to the development of these diseases, including genetic factors [13], epithelial barrier disruption [20], abnormal microbiota composition [29], broken tolerance against intestinal microbiota [12] and other environmental

factors [40]. Although there have been improvements in drug treatment with the introduction of biological drugs, there is still significant room for novel treatments for IBD [2, 9, 25].

Prebiotic and probiotic strategies are thought to be useful in the context of experimental IBD [23, 49]. Both strategies reduce inflammatory parameters in the gut, effects that are suggested to be secondary to the capacity of the strategies to modify microbiota composition, induce secretion of immunomodulatory molecules and protect the colonic barrier [34]. Dietary fibers are complex carbohydrates that humans are unable to metabolize. However, the microbiota present in the gut use these substances as energy source and ferment them to produce intermediate metabolites, including short-chain fatty acids (SCFAs), such as acetate [27]. SCFAs contribute to the homeostasis of the organism [3, 10, 42] and have been shown to possess systemic anti-inflammatory properties [31].

The aim of the present work was twofold. First, we wished to investigate whether delayed administration of fiber (i.e., in a therapeutic rather than preventive schedule) would be able to decrease clinical, inflammatory and pathological parameters in a murine model of chronic colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS). Second, we also evaluated whether treatment with acetate, a SCFA, or combined treatment with fiber and probiotics would provide any therapeutic benefit. To this end, we used a high fiber diet containing pectin, a soluble fiber and the probiotic *Bifidobacterium longum* (BL). Our results clearly show that these strategies work well when the treatment is started before DSS administration but they have much lower efficacy when started after disease has been established, even when given in combination.

## Materials and methods

### Animals

BALB/c female mice were obtained from the Bioscience unit of Universidade Federal de Minas Gerais and housed under standard conditions exposed to 12:12 h light:dark cycles, food and water ad libitum. Only females weighing 20–24 g were used in the experiments. All procedures were approved by the local animal ethics committee (protocol 57/2011).

### Diets, acute and chronic colitis induction and tissue collection

The purified diet for laboratory rodents AIN93M [39] was used as a chow diet. The high fiber diet was formulated by including 10 % of pectin soluble fiber (citrus pectin, Vetec Química Fina, Distrito Industrial Duque de Caxias, RJ,

**Table 1** Composition of the experimental diets

Ingredient	Chow diet (g/kg diet) <sup>a</sup>	High fiber diet (g/kg diet)
Cornstarch	465.692	465.692
Casein	140.000	140.000
Pectin	–	100.000
Dextrinized cornstarch	155.000	55.000
Sucrose	100.000	100.000
Soybean oil	40.000	40.000
Cellulose	50.000	50.000
Mineral mix (AIN-93M)	35.000	35.000
Vitamin mix (AIN-93)	10.000	10.000
L-Cystine	1.8000	1.8000
Choline bitartrate	2.500	2.500
Butylated hydroxytoluene	0.008	0.008

<sup>a</sup> AIN-93M diet formulated for maintenance of adult rodents (19)

Brazil) in the chow diet (Table 1). Animals were fed with the high fiber diet for 10, 20 or 40 days prior, the pretreatment and during acute colitis induced by DSS (10HF DSS, 20HF DSS and 40HF DSS groups). Mice received 4 % DSS (W/V) (36,000–50,000 kDa; MP Biomedicals, Solon, OH, USA) in drinking water ad libitum 6 days continuously for induction of acute colitis; then, animals were euthanized and colonic tissue were collected. Control mice received filter water throughout the experiment (H<sub>2</sub>O group). For the survival experiment, animals were monitored for a period of 21 days following DSS administration.

In the protocol of chronic colitis (Online Resource 1), mice were fed with high fiber diet for 20 days prior to the DSS administration (pre-HF DSS group) or fed with high fiber diet at the beginning of the third, fourth (data not shown) or fifth cycles of DSS administration (HF DSS groups). Chronic colitis was induced by five cycles of DSS administration that consisted in 6 days of the inclusion of 3 % DSS (W/V) in drinking water ad libitum followed by 14 days of filter water consumption after DSS removal (regeneration phase) (Online Resource 2 and 3). Control mice received normal filtered water throughout the experiment (H<sub>2</sub>O group).

When animals were culled, the colon length was measured (from rectum to cecum) and thereafter the colon samples were used for histopathological analysis and determination of cytokines and chemokines levels by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), myeloperoxidase (MPO) and eosinophil peroxidase (EPO) activity.

### Acetate treatments

In acute colitis, mice were pretreated with 150 mM acetate sodium (Sigma, St. Louis, MO, USA) in the drinking water

5 days prior and during acute colitis induction (associated with DSS). This pretreatment was performed in mice fed chow diet (acetate DSS) or in mice pretreated with high fiber diet for 40 days (Ac. + 40HF DSS). In the protocol of chronic colitis, acetate was used as treatment by the inclusion of this SCFA in drinking water at the third cycle of DSS.

### Probiotic treatments

*Bifidobacterium longum* 51A were grown on de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Difco, Sparks, MD, USA) during 48 h in an anaerobic chamber (Forma Scientific Company, Marietta, OH, USA) containing an atmosphere of 85 % N<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub> and 5 % CO<sub>2</sub>, at 37 °C. A single dose of 0.1 mL containing 10<sup>8</sup> CFU was administered intragastrically to each mouse every day starting at the beginning of the third cycle of DSS in the chronic colitis (BL DSS and BL + HF DSS groups) until the animals were culled. The other groups were given phosphate buffer saline (PBS) instead of the bacteria, and the same protocol was used.

### Weight and clinical score assessment

For the acute colitis protocol, mice were weighed every other day and clinical scores evaluated accordingly. Weight data are shown as percentage of the initial weight. For clinical score assessment, feces of the mice were collected and used to detect occult fecal blood using Hexagon OScreen (Human Diagnostic, Wiesbaden, Germany) test. Animals were scored as described previously [47]. Briefly, 0 = normal feces and no blood, 1 = normal feces and trace of blood in the fecal blood test, 2 = feces with smooth consistency and positive fecal blood test, 3 = feces with pasty consistency and positive fecal blood test, 4 = liquid feces and positive fecal blood test, 5 = liquid feces and moderate rectal bleeding, 6 = liquid feces and severe rectal bleeding, 7 = diarrhea and hemorrhage, and 8 = diarrhea, hemorrhage, and general signs of morbidity, including hunched posture and failure to groom. For the chronic colitis protocol, the weight and clinical score were obtained three times during the DSS period and twice in the DSS-free period.

### Behavioral experiment

#### *Elevated plus maze (EPM) test*

The maze consisted of a central quadrangle, two opposing open arms and two opposing closed arms of the same size but equipped with high walls at their sides and the

far end, and elevated 70 cm above the floor. Mice were placed on the center of the maze facing an open arm. The movements of the animals were tracked by a video camera above the center of the maze and recorded by a video tracking system ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) for 5 min. This software was used to evaluate the animal tracks and to determine the number of their entries into the open arms, the time spent on the open arms and the number of entries into the closed arms. A reduction in the open arm time or open arm entries was interpreted as an increase in anxiety-like behavior, and the number of closed arm entries was taken as a locomotor measure.

### MPO and EPO activity

Neutrophil accumulation in the colon tissue was measured by assaying MPO activity, as described previously [43]. Briefly, colon sample of mice was homogenized and assayed for MPO activity by measuring the change in OD at 450 nm using tetramethylbenzidine. Results were expressed as the relative unit, which denotes activity of MPO related to casein-elicited murine peritoneal neutrophils processed in the same way. Eosinophil infiltration was assessed by the evaluation of EPO activity as described previously [46]. Briefly, the colon tissue was homogenized and the enzymatic assay was performed by the addition of an equal amount substrate (1.5 mmol/L *o*-phenylenediamine and 6.6 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.075 mmol/L Tris-HCl—pH 8). The reaction was stopped with 50 µL of 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the absorbance was read at 492 nm.

### Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

Concentration of tumor necrosis factor alpha (TNF-α), transforming growth factor beta (TGF-β) and interleukin-10 (IL-10) cytokines, and chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) and chemokine (C-C motif) ligand 11 (CCL11) were evaluated in the colon sample of mice using commercially available kits and according to the procedures supplied by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

### Histology

#### *Hematoxylin and eosin (H&E)*

Colonic tissues were stained with H&E and evaluated by an investigator (MAR) blinded to the experimental situation and using a previously validated scoring system [24, 47]. Three independent parameters were measured to obtain the histopathological score: severity of inflammation (0–3: none, slight, moderate, severe), depth of injury (0–3:

none, mucosal, mucosal and submucosal, transmural) and crypt damage (0–4: none, basal one-third damaged, basal two-thirds damaged, only surface epithelium intact, entire crypt and epithelium loss of goblet cells). The score of each parameter was multiplied by a factor reflecting the percentage of tissue involvement (1—0 to 25 %; 2—26 to 50 %; 3—51 to 75 %; and 4—76 to 100 %) and all parameters added up. The maximum possible score was 40.

### Flow cytometry

Cecal lymph nodes were removed and washed with DMEM supplemented with 10 % FCS, the cells obtained were then counted, labeled with conjugated antibodies for CD4, CD8, CD19, CD44, CD69 (BD Pharmingen), and their respective isotype controls. Cells were analyzed with a FACSCalibur, and data were analyzed by FlowJo (TreeStar).

### Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM analyzed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). The comparison between two groups was made using Student's *t* test and multiple comparisons performed using one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls post hoc analysis. Results with  $P < 0.05$  were considered significant. For survival curves, differences between groups were compared using the log-rank test.

## Results

### High fiber diet attenuates the acute DSS-induced colitis

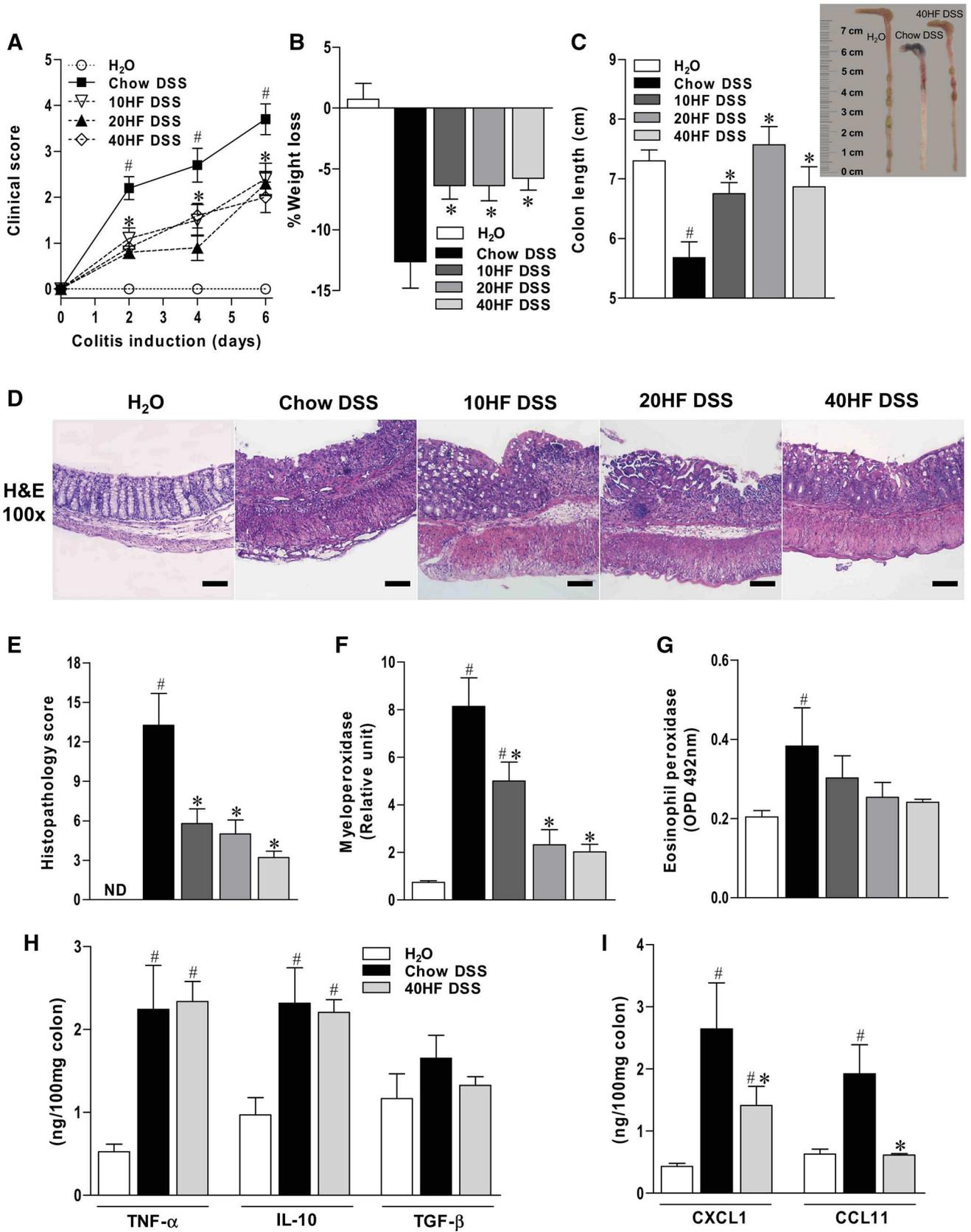
Initial experiments evaluated the effects of the pretreatment with the high fiber diet starting 10, 20 or 40 days prior to administration of DSS. Addition of fiber to the diet did not alter food consumption of animals (data not shown). Addition of DSS to water caused significant disease, as assessed by an increase in clinical score (Fig. 1a), weight loss (Fig. 1b) and shortening of colon length (Fig. 1c) of DSS-treated mice when compared to the control group (H<sub>2</sub>O group). Disease was more severe in animals fed the chow diet than those given the high fiber diet, and there did not appear to be a difference in protection in clinical parameters when the high fiber diet was started 10, 20 or 40 days before the DSS (Fig. 1a–c). Histological analysis of colonic tissues sections showed that animals receiving DSS had marked colitis characterized by extensive destruction of mucosa, loss of crypts and intense infiltration of inflammatory cells. In animals given the high fiber diet, there was a significant protection against tissue damage, as seen by decreased severity of inflammation, decreased number of

**Fig. 1** Effects of different pretreatment periods with a high fiber diet in a model of acute DSS-induced colitis in mice. **a** Clinical score during DSS administration assessed every other day. **b** Percentage of weight loss after DSS administration. **c** Colon length from rectum to cecum. **d** Paraffin sections of colonic tissues stained with H&E ( $\times 100$ ) and (E) histopathology score (sum of severity of inflammation, depth of injury, crypt damage and percentage of involvement). *Bars* indicate 50  $\mu$ m. **f** Myeloperoxidase (MPO) activity; **g** eosinophil peroxidase (EPO) activity; **h–i** Colon concentration of the cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-10 and TGF- $\beta$ ) and (I) chemokines. The data represent mean  $\pm$  SEM.  $n = 5$ –10 mice in each group.  $P < 0.05$ ; *hash symbol* versus H<sub>2</sub>O; *asterisks* versus chow DSS

immune cells and preservation of crypts. The latter findings are consistent with the lower histopathological score in high fiber diet-treated mice.

Protection was similar in all high fiber diet groups whatever the period of the pretreatment, but there was more homogenous protection in mice given the high fiber diet for 40 days before the DSS administration (Fig. 1d, e). The amount of neutrophils infiltrating the tissues was assessed by measuring tissue MPO content. As shown in Fig. 1f, DSS induced significant neutrophil influx, an effect that was prevented by administration of high fiber diet. All pretreatment times reduced neutrophil influx, but this was more dramatic when the treatment was started at 20 or 40 days before DSS. EPO activity was increased in the chow DSS group and was prevented in HF groups (Fig. 1g). Levels of TNF- $\alpha$  and IL-10 increased after DSS administration, and addition of high fiber for 40 days did not alter the concentration of these cytokines (Fig. 1h). Levels of the chemokines CXCL1 and CCL11 also increased in animals treated with DSS. Administration of the high fiber diet reduced significantly the levels of these chemokines (Fig. 1i).

Mammals are unable to metabolize dietary fiber directly. Fibers are fermented by the gut microbiota and metabolized into short-chain fatty acids (SCFAs), of which acetate is produced in greater amounts. Moreover, we have previously shown that oral administration of acetate could reduce inflammation in the gut and in other organs, including the lung and joints [28, 31, 48]. Next, we compared the effects of the pretreatment with acetate and high fiber diet or the combination of both on acute colitis. About 40 % of the animals with acute DSS-induced colitis fed chow diet survived. Acetate provided no protection from lethality, whereas the high fiber diet alone or in association with acetate provided full protection to mice given DSS (Fig. 2a). Interestingly, the pretreatment with acetate did improve the clinical score (Fig. 2b), reduced weight loss (Fig. 2c) and the histopathological score (Fig. 2d, e) when compared with mice given the chow diet. Overall, the effects of the high fiber diet were similar (clinical and histopathological score) to or slightly better (weight loss and survival) than the administration of acetate. There

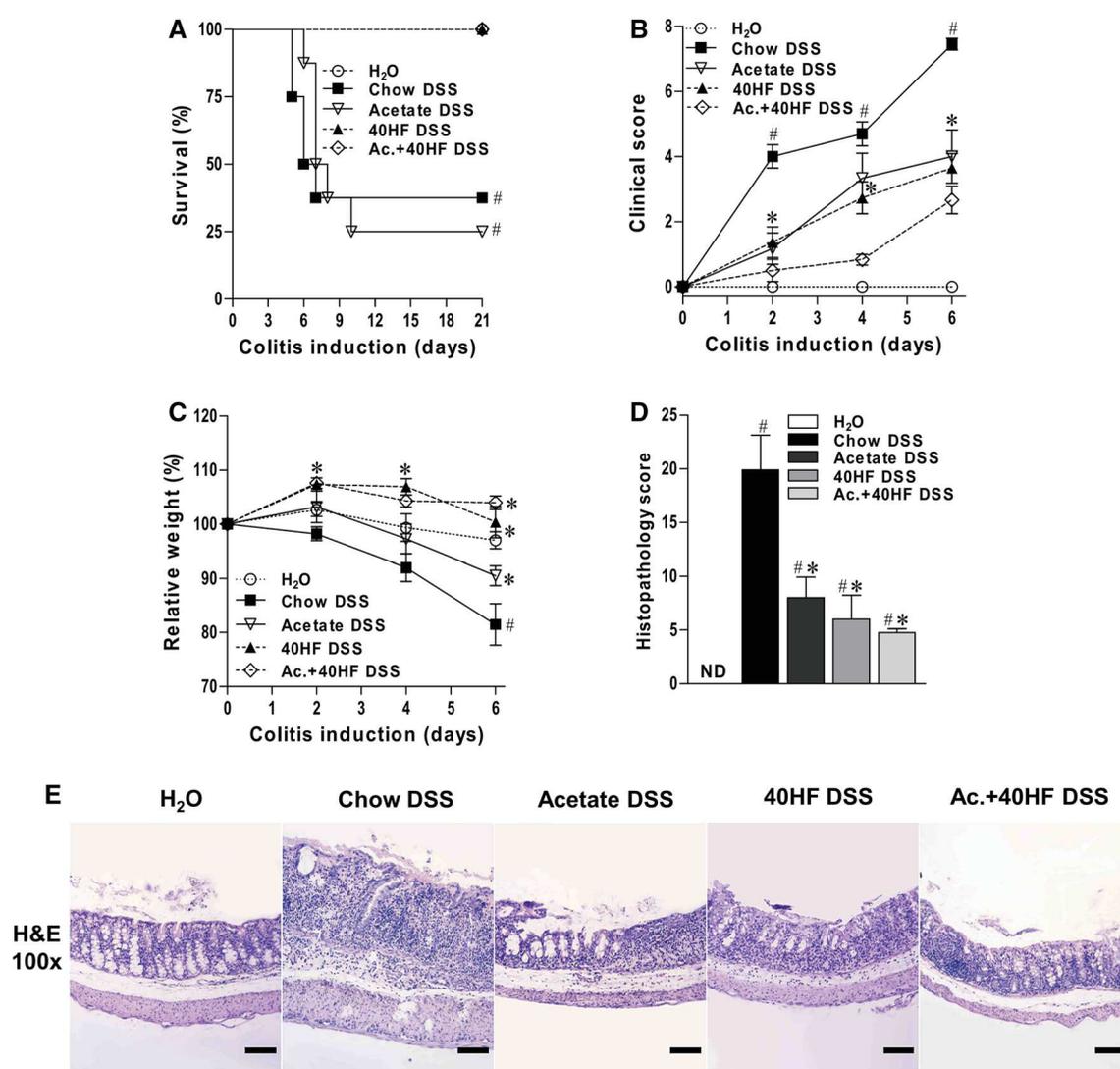


was no significant advantage of adding acetate to the high fiber diet in terms of protection from DSS-induced colitis (Fig. 2).

### Effects of preventive or therapeutic treatment with high fiber diet in mice with chronic colitis

The previous results clearly showed that the high fiber diet did provide substantial protection from acute DSS-induced colitis, especially when started 20 or 40 days prior to disease induction. In an attempt to investigate any therapeutic effects of the treatment with high fiber diet, we first characterized a model of chronic colitis induced by DSS.

The model of chronic colitis used was based in the administration of five cycles of DSS to mimic chronic relapsing disease, as would be more representative of human colitis. Akin to acute DSS-induced colitis, periodical addition of DSS to water increased the clinical score (Fig. 3a) and induced shortening of colon length (Fig. 3b and Online Resource 1a) of DSS-treated mice fed chow diet when compared with the control group (H<sub>2</sub>O group). Chronic DSS treatment increased MPO activity at the third and fifth cycle (Online Resource 1b) while EPO activity increased only at the fifth cycle (Online Resource 1c) as compared with the H<sub>2</sub>O group. We also observed greater number of activated lymphocytes in cecal lymph nodes (Online



**Fig. 2** Effects of the pretreatment with acetate, high fiber diet and association of both in a model of acute DSS-induced colitis in mice. **a** Percentage of survival after DSS-induced acute colitis. **b** Clinical score during DSS administration assessed every other day. **c** Relative weight during DSS administration. **d** Histopathology score of colonic

tissue section (sum of severity of inflammation, depth of injury, crypt damage and percentage of involvement). **e** Representative paraffin sections of colonic tissues stained with H&E. Bars indicate 50  $\mu$ m. The data represent mean  $\pm$  SEM.  $n = 5-10$  mice in each group.  $P < 0.05$ ; hash symbol versus H<sub>2</sub>O; asterisks versus chow DSS

Resource 1d-f), indicating the progression and chronicity of the disease.

Mice pretreated with the high fiber diet showed improvement in clinical score and protection against colonic shortening that was similar to the protective effects seen in acute DSS-induced colitis (Fig. 3a). This protection contributed to less colonic tissue damage, as seen by the lower histopathological score (Fig. 3c, d). Next, we examined the effects of fiber when given in a therapeutic schedule (see Online Resource 2 to check the experimental design). When the high fiber diet was started after disease had been established (before cycles 3 and 5), there was no improvement of clinical activity (Fig. 3a, b). Indeed, clinical parameters (clinical score and colon length) of mice treated with high fiber diet still remained similar to those observed in mice subjected to DSS colitis. Overall, there was no improvement of histopathological changes or MPO levels in mice given high fiber diet before the third or fifth cycles of disease (Fig. 3c–e). There was only decreased infiltration of eosinophils in the colonic tissue, as assessed by EPO levels (Fig. 3f), in mice given high fiber diet before the third cycle of DSS. These slight effects were lost when the treatment was started before the fourth (data not shown) and fifth cycles of DSS administration (Fig. 3).

Overall, treatment with acetate starting before the third cycle had no protective effect in mice subjected to colitis, akin to what was observed in mice treated with high fiber diet (Fig. 3).

### **Pretreatment with high fiber diet improves anxiety-like behavior**

It has been shown that patients with IBD [18] and animals subjected to DSS colitis may present behavioral changes associated with the severity of disease. Moreover, it has been suggested that behavioral changes are associated with microbial composition and could be ameliorated by probiotic strategies [41]. In mice subjected to the chronic DSS-induced colitis model, there was a significant increase in anxiety-like behavior after the fifth cycle of DSS administration, as evaluated in the elevated plus maze test (Fig. 4a). Mice subjected to colitis (chow DSS group) spent less time in the open arms as compared with the control group (given chow diet and H<sub>2</sub>O). The pretreatment with high fiber diet prevented this behavior, whereas the therapeutic treatment started before the third cycle did not (Fig. 4a). The percentages of entries into the open or closed arms were similar among the groups (Figs. 4b and c). The latter data indicated that the disease or treatments did not change the locomotor capacity of mice (Fig. 4c).

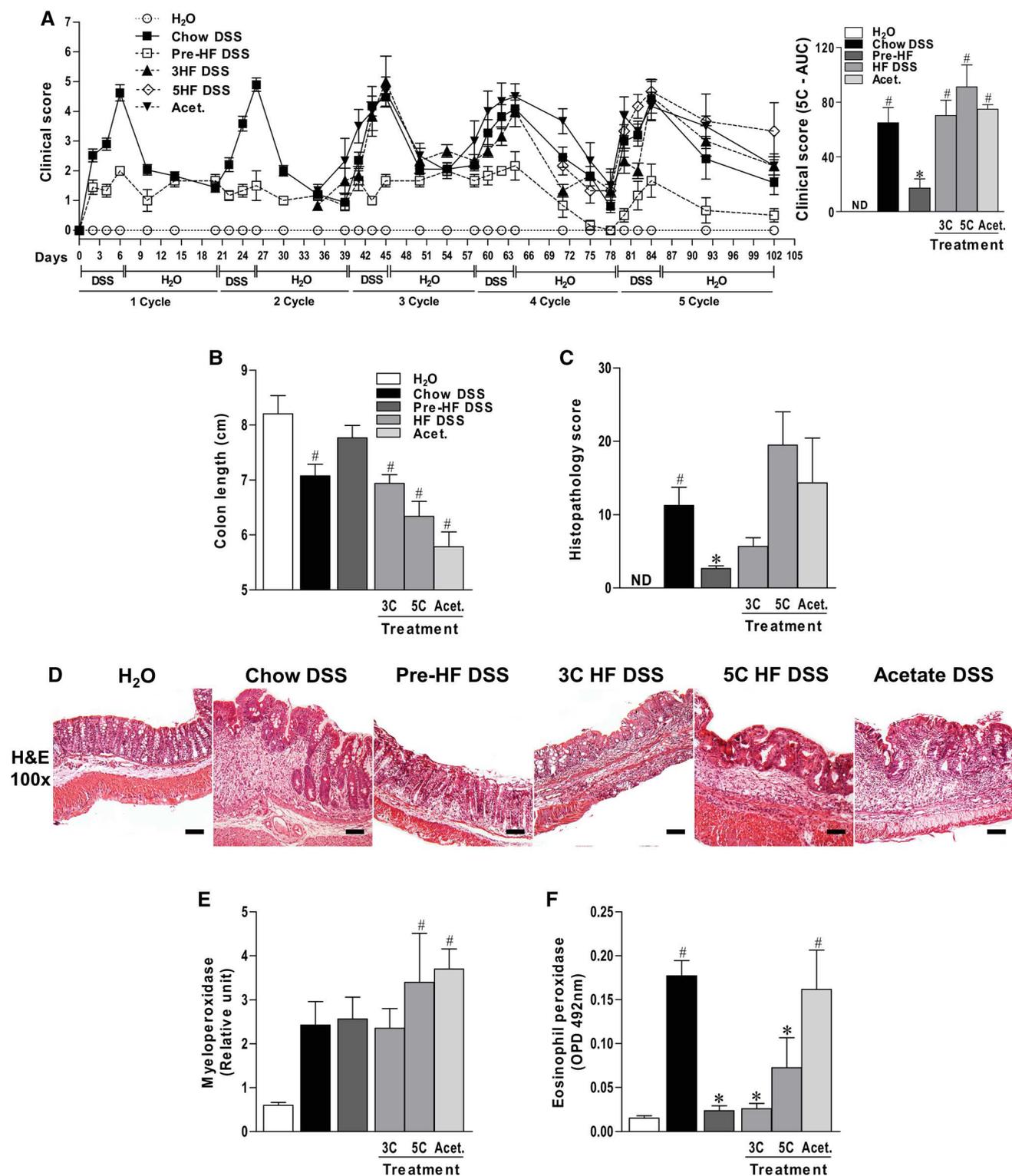
### **High fiber diet and *Bifidobacterium longum* treatment do not improve chronic colitis signs in established disease**

Since the high fiber diet had no effect when given as a therapeutic schedule in the chronic DSS colitis, we investigated whether the addition of a probiotic (*B. longum*; BL), thereby increasing the capacity of metabolizing the fiber, would promote protection in mice given high fiber diet. In this particular series of experiments, all strategies were initiated just before the third cycle of DSS administration. As shown in Fig. 5, the probiotic had no beneficial effect in any of the parameters evaluated. Similarly and in agreement with results as shown in Fig. 3, treatment with high fiber diet starting just before the third cycle had no major protective effects. Moreover, co-treatment with the probiotic and the high fiber diet failed to improve significantly signs of disease (Fig. 5).

### **Discussion**

There is much need to understand the efficacy of dietary approaches in modifying the clinical course of IBD and, specially, to evaluate whether diet is still effective when given to patients (or animals) with active disease. Here, we evaluated the effects of a high fiber diet in models of acute and chronic DSS-induced colitis. Our major findings are as follows: (1) the consumption of a high fiber diet containing pectin started before the induction of colitis markedly decreased inflammatory changes in models of acute and chronic DSS-induced colitis; (2) in contrast, when the high fiber diet was started after disease was induced and colitis had been established, there was very little protective effect; (3) administration of a short-chain fatty acid, acetate, was also only protective when given before but not after disease induction and it was overall less effective than administration of the high diet; (4) combined treatment of diet and a probiotic, *B. longum*, failed to alter the clinical course of ongoing chronic DSS-induced colitis.

Our results clearly showed that the pretreatment with a high fiber diet was greatly beneficial to reduce the signs of acute and chronic colitis induced by administration of DSS. It has been suggested that the beneficial effects of dietary fiber come from its ability to be fermented by the gut microbiota and generate substances that act locally and systemically [3, 10, 16, 42]. Among the soluble dietary fiber, pectin has the faster rate of fermentation [22] and appears to be completely degraded in the large intestine [8]. The anaerobic fermentation of the fiber results in the production



of SCFAs (e.g., acetate, propionate and butyrate), which provide energy for intestinal epithelial cells, stimulating the production of mucus, regulating the intestinal pH, the immune system and modulating the gut microbiota [11, 22]. The dietary fiber also exerts trophic effect on intestinal

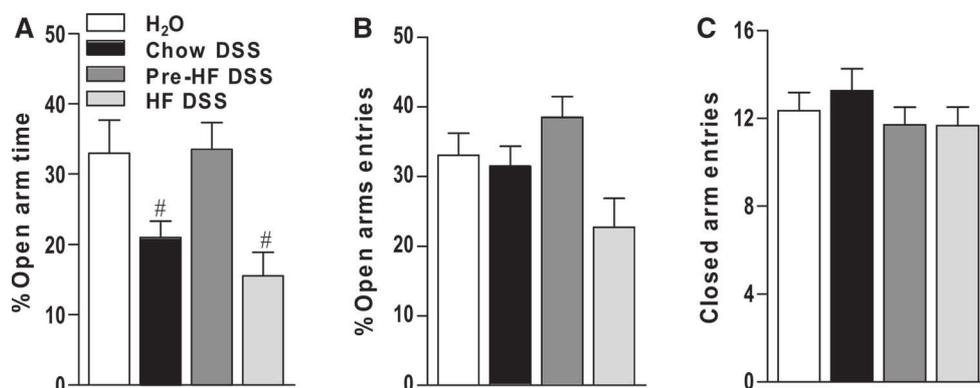
epithelial cells and stimulates secretion of intestinal hormones [1]. Overall, these effects may contribute to attenuate the inflammation in experimental colitis and may also underlie the beneficial effects of a high fiber containing diet in patients with IBD at the remission phase [21, 23, 38].

**Fig. 3** Comparative effects of the pretreatment or therapeutic administration of a high fiber diet in a model of chronic DSS-induced colitis in mice. Chronic colitis was induced administration of DSS in 5 cycles (6 days of DSS administration followed by 14 DSS-free days). Mice were fed with high fiber diet for 20 days prior to the DSS administration (pre-HF DSS group) or fed with high fiber diet at the beginning of the third or fifth cycles of DSS administration (HF DSS groups). Acetate was given in drinking water and started on the third cycle (Acet. group). **a** Clinical score during the five cycles of DSS administration (3 %). The Y-axis shows the clinical score and the X-axis represents the experimental days after DSS administration. The *insert* on the *right* indicates the area under the curve (AUC) of the fifth cycle of DSS administration. **b** Colon lengths from rectum to cecum. **c** Histopathological score of colonic tissue section (sum of severity of inflammation, depth of injury, crypt damage and percentage of involvement). **d** Representative paraffin sections of colonic tissues stained with H&E. Bars indicate 50  $\mu$ m. Evaluation of **(e)** myeloperoxidase and **(f)** eosinophil peroxidase activity. The data represent mean  $\pm$  SEM.  $n = 4$ –10 mice in each group.  $P < 0.05$ ; *hash symbol* versus H<sub>2</sub>O; *asterisks* versus chow DSS

It has been suggested that the reduction in the recruitment of immune cells to colonic tissues appears to be an important factor determining protection in experimental colitis [6, 47]. Our work showed that mice pretreated with high fiber diet exhibited low levels of the chemokines CXCL1 and CCL11, molecules known to be important for neutrophil and eosinophil recruitment, respectively, and for induction of colitis. Indeed, mice lacking the CXCR2 (a receptor involved with recruitment of polymorphonuclear leukocytes) present reduced signs of mucosal damage and clinical symptoms in a chronic DSS-induced model [6]. Vieira et al. [47] have also shown that eosinophils are involved in the progression of DSS-induced colitis. Therefore, the capacity of the high fiber diet to reduce inflammatory cell infiltration in mice with DSS-induced colitis may be secondary to the capacity of the fiber to modulate the local production

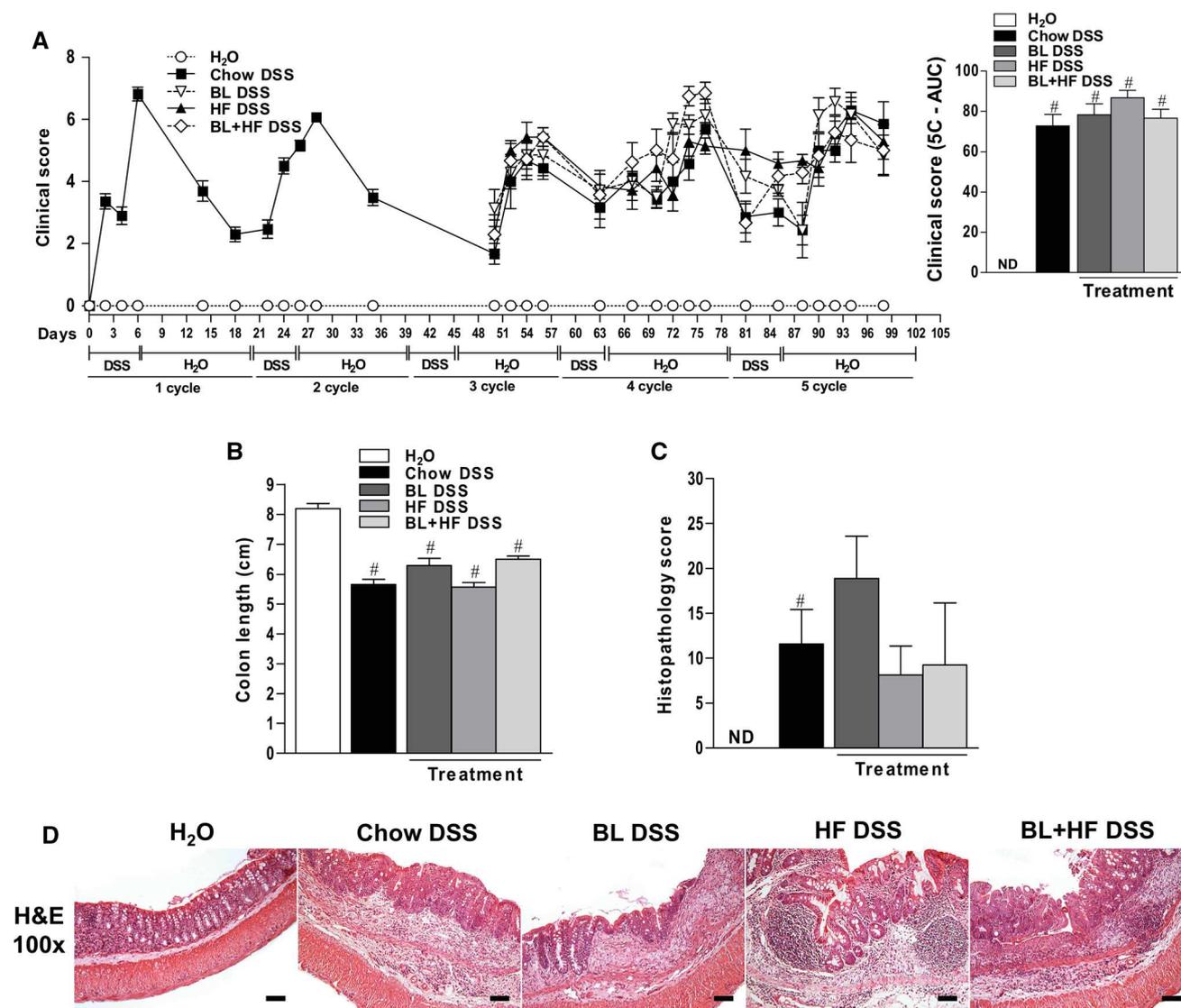
of inflammatory mediators, including the chemokines CXCL1 and CCL1.

One of the putative molecular mechanisms by which fiber and probiotics reduce production of mediators of inflammation and protect from DSS-induced colitis is via production of SCFA and their action on GPR43 or GPR109a, receptors present on immune and epithelial cells [31, 32]. Acetate is the major SCFA produced by fermentation and is readily absorbed, reaching concentrations in plasma that may be sufficient to activate their receptors in immune cells and on epithelial cells. It is clear that acetate given *per se* can influence immune function in organs away from the intestine, including the lung and joint [31, 48]. Maslowski et al. [31] showed that acetate, via GPR43, enhances the production of reactive oxygen species (ROS) and phagocytosis. Furthermore, acetate also induces apoptosis and modulates neutrophil recruitment. More recently, Macia et al. [28] showed that acetate could enhance assembly of the inflammasome on epithelial cells, an effect that appeared to be important for protection against disease. Administration of acetate in drinking water is known to protect mice when given before colitis induction [32]. In our experiments, pretreatment with acetate had protective effects, which were slightly less pronounced than administration of high fiber diet. Administration of the SCFA reduced clinical signs, histopathological score and weight loss, but had no effect on lethality rates. Therefore, our data are consistent with the idea that production of SCFAs in response to administration of high fiber diet may contribute to its overall protective effects against DSS-induced colitis. Administration of acetate is unlikely to provide a direct local effect on colonic epithelial cells when given orally, as this SCFA will be readily absorbed in the small intestine. However, we have shown that oral administration of acetate causes systemic anti-inflammatory and pro-resolving



**Fig. 4** Effects of the pretreatment with a high fiber diet on anxiety-like behavior in a model of chronic DSS-induced colitis in mice. Using the elevated plus maze test, the following parameters were measured: **a** percentage of time spent on the open arms; **b** percentage

of open arms entries and **c** frequency of closed arm entries. The data represent mean  $\pm$  SEM.  $n = 8$ –10 mice in each group.  $P < 0.05$ ; *hash symbol* versus H<sub>2</sub>O



**Fig. 5** Effects of the treatment with the probiotic *Bifidobacterium longum* (BL) alone or associated with a high fiber diet in a model of chronic DSS-induced colitis in mice. A single dose of the probiotic containing  $10^8$  CFU in 0.1 mL was administered intragastrically to each mouse every day. All treatments were started at the third cycle of DSS in mice fed chow diet (BL DSS) or fed high fiber diet (BL + HF DS) and kept until animals were culled. **a** Clinical score during the five cycles of DSS administration (3 %). The Y-axis shows the clinical score and the X-axis represents the experimental days

after DSS administration. The *insert* on the *right* indicates the area under the curve (AUC) of the fifth cycle. **b** Colon lengths from rectum to cecum. **c** Representative paraffin sections of colonic tissues stained with H&E. *Bars* indicate 50  $\mu$ m. **d** Histopathological score of colonic tissue section (sum of severity of inflammation, depth of injury, crypt damage and percentage of involvement). The data represent mean  $\pm$  SEM.  $n = 5$ –10 mice in each group.  $P < 0.05$ ; *hash symbol* versus H<sub>2</sub>O

effects in the gut, lungs and joints [28, 31, 48], suggesting that these effects are the major mechanism by which this SCFA reduces disease in our model.

Inflammatory bowel diseases cause anxiety and depression in patients. Our results also showed that mice subjected to chronic DSS-induced colitis displayed an anxiety-like behavior, a finding that is consistent with those

of Bercik et al. [5]. Overall, these findings corroborate the idea that there is a gut–brain axis that contributes to disease pathogenesis and clinical presentation [7, 14]. Our data showed that pretreatment with the high fiber diet significantly decreased anxiety-like behavior in mice. Mechanisms explaining change in behavior have not been discovered, but it has been suggested that changes in microbiota

composition may influence behavior in mice [4]. Whether the high fiber diet restores normal behavior because it prevents changes in microbial composition or release of molecules that have neurotrophic functions is not known and deserves further investigation. It must be noticed that SCFAs, such as acetate, reach the systemic circulation and could also affect the CNS directly.

In order to investigate the therapeutic effects of the administration of a high fiber diet, we used a model of chronic relapsing/remitting colitis induced by DSS in mice. As shown in Fig. 3, there was a transient increase in clinical score during each cycle of DSS administration, which was followed by partial recovery after removal of DSS. Recovery was never total, especially after the third cycle of DSS administration. These findings are consistent with those reported by Melgar et al. [33] who showed that BALB/c mice only completely recovered at 4 weeks after DSS removal. In this model of chronic colitis, although the administration of high fiber diet or acetate prevented colitis when given preventively (e.g., started before the first cycle of DSS), protective effects were not observed when the strategies were initiated after disease had been established. Indeed, administration of high fiber diet initiated just before the third cycle of DSS had little effect on clinical score and histopathological changes. The lack of effects of the high fiber diet when given before the third cycle suggests that a direct interaction between the fiber and DSS is an unlikely explanation for our observations. Similar lack of efficacy was seen when diet was started at the fourth or fifth cycles of DSS and when acetate was started just before the third cycle of DSS. Therefore, it is clear that fiber-induced protection is in general lost when strategies are given in a therapeutic rather than preventive manner.

Moreau et al. [36] have shown that resistant starch may restore the integrity of the caecocolonic mucosa when treatment is started concomitantly with DSS in rats. In contrast, fructooligosaccharides, a type of dietary fiber, did not improve colitis induced by DSS administration [17, 36] and actually worsened some inflammatory parameters, including clinical score and MPO activity in the colon of animals [17]. These results suggest that the type of fiber present in diet matters in mediating protection of colitic animals exposed to high fiber diets.

Nagalingam et al. [37] have shown that administration of DSS can induce changes in gut microbial diversity in mice, which is analogous to what is observed in human IBD [15], and that the altered microbiota profile appears to contribute to the development of murine DSS colitis [37]. One of the significant changes observed in mice subjected to colitis is the loss of anaerobic bacteria capable of fermenting fibers present in the high fiber diet [15, 30, 37]. In this regard,

loss of these bacteria could explain, at least in part, the failure of the high fiber diet to be metabolized and hence fail to protect against chronic colitis when given after disease had been induced by DSS. To recompose fiber-metabolizing bacteria, we associated the administration of the high fiber diet with a probiotic therapy. To this end, we use the strain *B. longum* 51A, of human origin, which has been previously shown to protect mice against Salmonella infection [45] and to have the best potential for probiotic use among another strain evaluated in vitro tests [44]. However, the dual administration of the high fiber diet and *B. longum* was still not protective when given from the third cycle of DSS administration. Hayes et al. [19] have shown that the efficacy of probiotic use (*Bifidobacterium breve* NCC295) may depend on the intestinal inflammatory milieu at the time microorganisms are given; these authors showed that pretreatment with the probiotic attenuated colitis, whereas the therapeutic treatment did not. Therefore, combined administration of a high fiber diet with a bacterium capable of metabolizing the diet was still not efficacious when given therapeutically.

An alternative possibility to explain the lack of protective effects of the high fiber diet, alone or combined with a probiotic bacterium derives from our studies with acetate. As observed in Fig. 3, administration of acetate failed to alter colitis when administration was started at the third cycle of DSS. As we and others have shown previously, SCFA appears to act directly on epithelial and potentially other cell types, such as leukocytes, to prevent the progression of DSS-induced colitis [31, 32]. Indeed, our data suggest that in an injured tissue, followed cycles of DSS administration, the effect of SCFA is decreased. Therefore, it appears that diets, microorganisms and their products (such as SCFA) appear to function much more effectively preventively when the epithelium is still not damaged.

In conclusion, our work clearly showed that the preventive use of a high fiber diet or acetate clearly protects mice against acute and chronic damage induced by DSS in mice. However, protection is lost when therapies are initiated after disease has been established. These results suggest that any therapy aimed at modifying the gut environment (e.g., prebiotic or probiotic strategies) should be given early or after partial control of inflammatory disease by disease-modifying drugs, a tenet that clearly deserves further investigation.

**Acknowledgments** This work received financial support from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo e Pesquisas do Estado Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil), National Institute of Science of Technology in Dengue (INCT in Dengue, CNPq, Brazil). We thank Frankinéia Assis and Ilma Marçal for technical support.

## Compliance with ethical standards

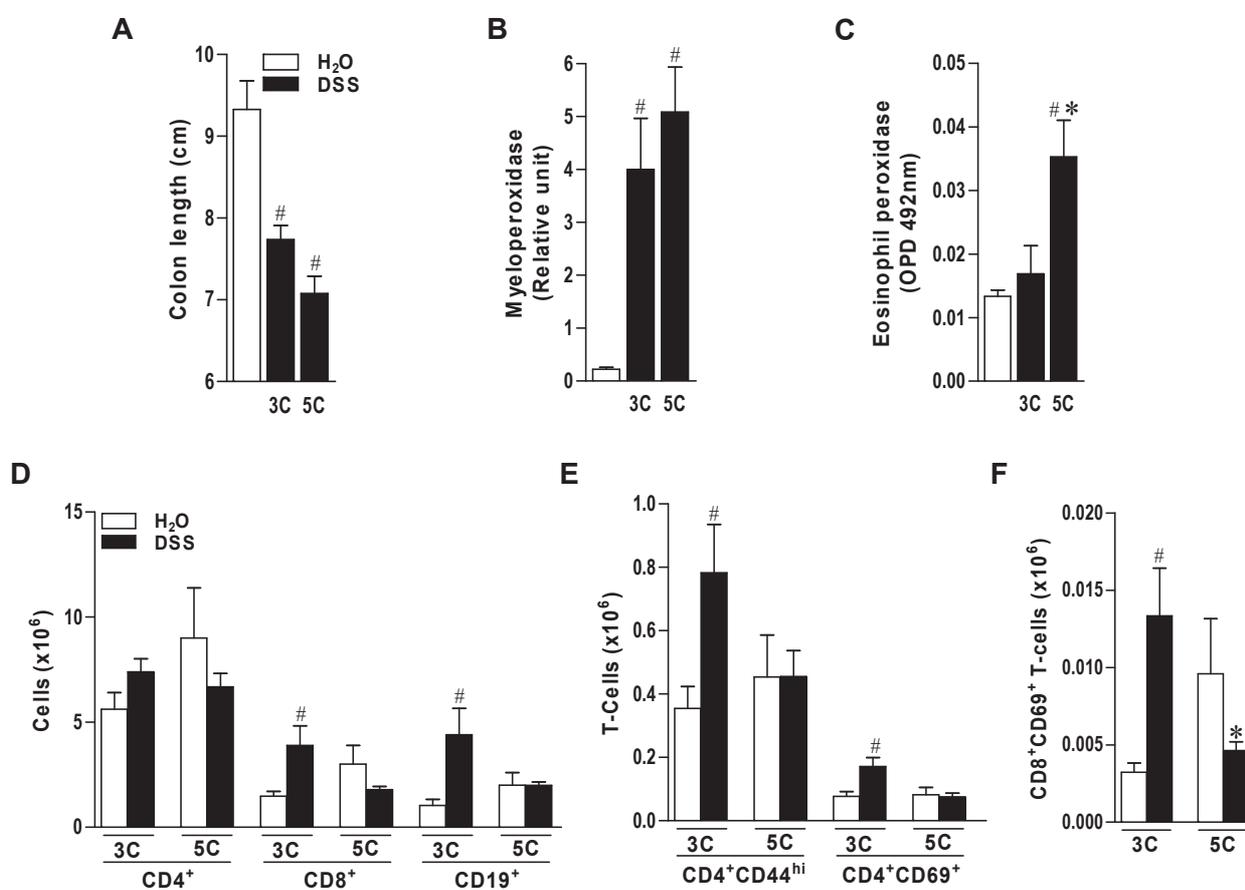
**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Andoh A, Bamba T, Sasaki M (1999) Physiological and anti-inflammatory roles of dietary fiber and butyrate in intestinal functions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 23:S70–S73
- Ardizzone S, Bianchi Porro G (2005) Biologic therapy for inflammatory bowel disease. *Drugs* 65:2253–2286
- Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffey PJ, Rudenski AY (2013) Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504:451–455. doi:10.1038/nature12726
- Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, Deng Y, Blennerhassett P, Macri J, McCoy KD, Verdu EF, Collins SM (2011) The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* 141:599–609. doi:10.1053/j.gastro.2011.04.052
- Bercik P, Park AJ, Sinclair D, Khoshdel A, Lu J, Huang X, Deng Y, Blennerhassett PA, Fahnestock M, Moine D, Berger B, Huizinga JD, Kunze W, McLean PG, Bergonzelli GE, Collins SM, Verdu EF (2011) The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterol Motil* 23:1132–1139. doi:10.1111/j.1365-2982.2011.01796.x
- Buanne P, Di Carlo E, Caputi L, Brandolini L, Mosca M, Cattani F, Pellegrini L, Biordi L, Coletti G, Sorrentino C, Fedele G, Colotta F, Melillo G, Bertini R (2007) Crucial pathophysiological role of CXCR2 in experimental ulcerative colitis in mice. *J Leukoc Biol* 82:1239–1246. doi:10.1189/jlb.0207118
- Cryan JF, O'Mahony SM (2011) The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil* 23:187–192. doi:10.1111/j.1365-2982.2010.01664.x
- Cummings JH, Southgate DA, Branch WJ, Wiggins HS, Houston H, Jenkins DJ, Jivraj T, Hill MJ (1979) The digestion of pectin in the human gut and its effect on calcium absorption and large bowel function. *Br J Nutr* 41:477–485
- De Cassan C, Fiorino G, Danese S (2012) Second-generation corticosteroids for the treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis: More effective and less side effects? *Dig Dis* 30:368–375. doi:10.1159/000338128
- De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchamp A, Backhed F, Mithieux G (2014) Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* 156:84–96. doi:10.1016/j.cell.2013.12.016
- Dongowski G, Lorenz A, Anger H (2000) Degradation of pectins with different degrees of esterification by *Bacteroides thetaiotaomicron* isolated from human gut flora. *Appl Environ Microbiol* 66:1321–1327
- Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH (1995) Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 102:448–455
- Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dasgupta T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barnada MM, Rotter JJ, Nicolae DL, Cho JH (2006) A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314:1461–1463. doi:10.1126/science.1135245
- Foster JA, McVey Neufeld KA (2013) Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci* 36:305–312. doi:10.1016/j.tins.2013.01.005
- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13780–13785. doi:10.1073/pnas.0706625104
- Galvez J, Rodriguez-Cabezas ME, Zarzuelo A (2005) Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res* 49:601–608. doi:10.1002/mnfr.200500013
- Geier MS, Butler RN, Giffard PM, Howarth GS (2007) Prebiotic and synbiotic fructooligosaccharide administration fails to reduce the severity of experimental colitis in rats. *Dis Colon Rectum* 50:1061–1069. doi:10.1007/s10350-007-0213-x
- Hauser W, Janke KH, Klump B, Hinz A (2011) Anxiety and depression in patients with inflammatory bowel disease: comparisons with chronic liver disease patients and the general population. *Inflamm Bowel Dis* 17:621–632. doi:10.1002/ibd.21346
- Hayes CL, Natividad JM, Jury J, Martin R, Langella P, Verdu EF (2014) Efficacy of *Bifidobacterium breve* NCC2950 against DSS-induced colitis is dependent on bacterial preparation and timing of administration. *Benef Microbes* 5:79–88. doi:10.3920/BM2013.0039
- Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Burgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD (2005) Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129:550–564. doi:10.1016/j.gastro.2005.05.002
- Kanauchi O, Suga T, Tochihiro M, Hibi T, Naganuma M, Homma T, Asakura H, Nakano H, Takahama K, Fujiyama Y, Andoh A, Shimoyama T, Hida N, Haruma K, Koga H, Mitsuyama K, Sata M, Fukuda M, Kojima A, Bamba T (2002) Treatment of ulcerative colitis by feeding with germinated barley foodstuff: first report of a multicenter open control trial. *J Gastroenterol* 37(Suppl 14):67–72
- Kirat D, Kondo K, Shimada R, Kato S (2009) Dietary pectin up-regulates monocarboxylate transporter 1 in the rat gastrointestinal tract. *Exp Physiol* 94:422–433. doi:10.1113/expphysiol.2009.046797
- Komiyama Y, Mitsuyama K, Masuda J, Yamasaki H, Take-datsu H, Andoh A, Tsuruta O, Fukuda M, Kanauchi O (2011) Prebiotic treatment in experimental colitis reduces the risk of colitic cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 26:1298–1308. doi:10.1111/j.1440-1746.2011.06690.x
- Krieglstein CF, Anthoni C, Cerwinka WH, Stokes KY, Russell J, Grisham MB, Granger DN (2007) Role of blood- and tissue-associated inducible nitric-oxide synthase in colonic inflammation. *Am J Pathol* 170:490–496. doi:10.2353/ajpath.2007.060594
- Kurtovic J, Segal I (2004) Recent advances in biological therapy for inflammatory bowel disease. *Trop Gastroenterol* 25:9–14
- Loftus EV Jr (2004) Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126:1504–1517
- Macfarlane S, Macfarlane GT (2003) Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 62:67–72. doi:10.1079/PNS2002207
- Macia L, Tan J, Vieira AT, Leach K, Stanley D, Luong S, Maruya M, Ian McKenzie C, Hijikata A, Wong C, Binge L, Thorburn AN, Chevalier N, Ang C, Marino E, Robert R, Offermanns S, Teixeira MM, Moore RJ, Flavell RA, Fagarasan S, Mackay CR (2015) Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A

- facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat Commun* 6:6734. doi:10.1038/ncomms7734
29. Martinez-Medina M, Aldeguer X, Gonzalez-Huix F, Acero D, Garcia-Gil LJ (2006) Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflamm Bowel Dis* 12:1136–1145. doi:10.1097/01.mib.0000235828.09305.0c
  30. Maslowski KM, Mackay CR (2011) Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol* 12:5–9. doi:10.1038/ni0111-5
  31. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, Schilter HC, Rolph MS, Mackay F, Artis D, Xavier RJ, Teixeira MM, Mackay CR (2009) Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461:1282–1286. doi:10.1038/nature08530
  32. Masui R, Sasaki M, Funaki Y, Ogasawara N, Mizuno M, Iida A, Izawa S, Kondo Y, Ito Y, Tamura Y, Yanamoto K, Noda H, Tanabe A, Okaniwa N, Yamaguchi Y, Iwamoto T, Kasugai K (2013) G protein-coupled receptor 43 moderates gut inflammation through cytokine regulation from mononuclear cells. *Inflamm Bowel Dis* 19:2848–2856. doi:10.1097/01.MIB.0000435444.14860.ea
  33. Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E (2005) Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G1328–G1338. doi:10.1152/ajpgi.00467.2004
  34. Miyauchi E, Ogita T, Miyamoto J, Kawamoto S, Morita H, Ohno H, Suzuki T, Tanabe S (2013) *Bifidobacterium longum* alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing IL-17A response: involvement of intestinal epithelial costimulatory molecules. *PLoS ONE* 8:e79735. doi:10.1371/journal.pone.0079735
  35. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG (2012) Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 142:46–54 e42; quiz e30. doi:10.1053/j.gastro.2011.10.001
  36. Moreau NM, Martin LJ, Toquet CS, Laboisse CL, Nguyen PG, Siliart BS, Dumon HJ, Champ MM (2003) Restoration of the integrity of rat caeco-colonic mucosa by resistant starch, but not by fructo-oligosaccharides, in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Br J Nutr* 90:75–85
  37. Nagalingam NA, Kao JY, Young VB (2011) Microbial ecology of the murine gut associated with the development of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 17:917–926. doi:10.1002/ibd.21462
  38. Ohkami H, Tazawa K, Yamashita I, Shimizu T, Murai K, Kobashi K, Fujimaki M (1995) Effects of apple pectin on fecal bacterial enzymes in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 86:523–529
  39. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123:1939–1951
  40. Sakamoto N, Kono S, Wakai K, Fukuda Y, Satomi M, Shimoyama T, Inaba Y, Miyake Y, Sasaki S, Okamoto K, Kobashi G, Washio M, Yokoyama T, Date C, Tanaka H (2005) Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis* 11:154–163
  41. Slyepchenko A, Carvalho AF, Cha DS, Kasper S, McIntyre RS (2014) Gut emotions—mechanisms of action of probiotics as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 13:1770–1786
  42. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, Glickman JN, Garrett WS (2013) The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 341:569–573. doi:10.1126/science.1241165
  43. Souza DG, Soares AC, Pinho V, Torloni H, Reis LF, Teixeira MM, Dias AA (2002) Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. *Am J Pathol* 160:1755–1765
  44. Souza TC, Silva AM, Drews JR, Gomes DA, Vinderola CG, Nicoli JR (2013) In vitro evaluation of *Bifidobacterium* strains of human origin for potential use in probiotic functional foods. *Benef Microbes* 4:179–186. doi:10.3920/BM2012.0052
  45. Souza TC, Zacarias MF, Silva AM, Binetti A, Reinheimer J, Nicoli JR, Vinderola G (2012) Cell viability and immunostimulating and protective capacities of *Bifidobacterium longum* 51A are differentially affected by technological variables in fermented milks. *J Appl Microbiol* 112:1184–1192. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05280.x
  46. Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ (1985) Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Methods* 83:209–215
  47. Vieira AT, Fagundes CT, Alessandri AL, Castor MG, Guabiraba R, Borges VO, Silveira KD, Vieira EL, Goncalves JL, Silva TA, Deruaz M, Proudfoot AE, Sousa LP, Teixeira MM (2009) Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. *Am J Pathol* 175:2382–2391
  48. Vieira AT, Macia L, Galvao I, Martins FS, Canesso MC, Amaral FA, Garcia CC, Maslowski KM, De Leon E, Shim D, Nicoli JR, Harper JL, Teixeira MM, Mackay CR (2015) A role for gut microbiota and the metabolite-sensing receptor GPR43 in a murine model of gout. *Arthritis Rheumatol* 67:1646–1656. doi:10.1002/art.39107
  49. Zhao HM, Huang XY, Zuo ZQ, Pan QH, Ao MY, Zhou F, Liu HN, Liu ZY, Liu DY (2013) Probiotics increase T regulatory cells and reduce severity of experimental colitis in mice. *World J Gastroenterol* 19:742–749. doi:10.3748/wjg.v19.i5.742

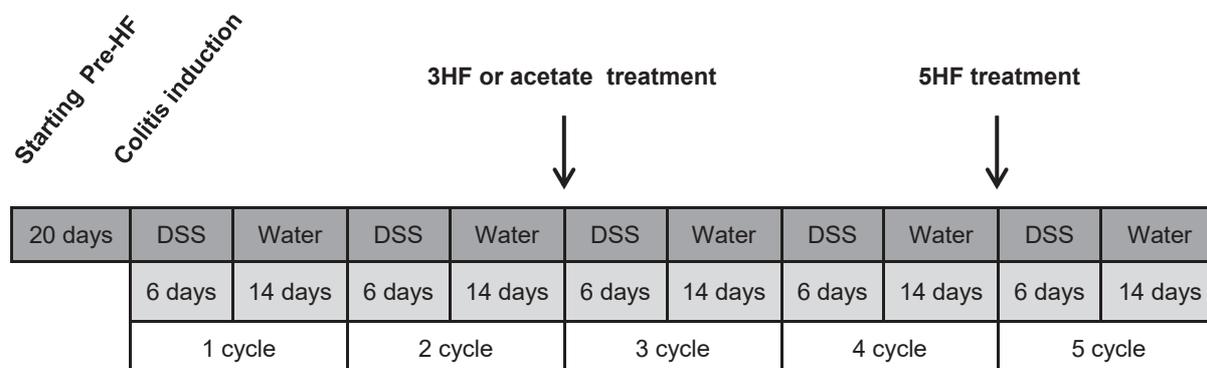
## Online resource 1



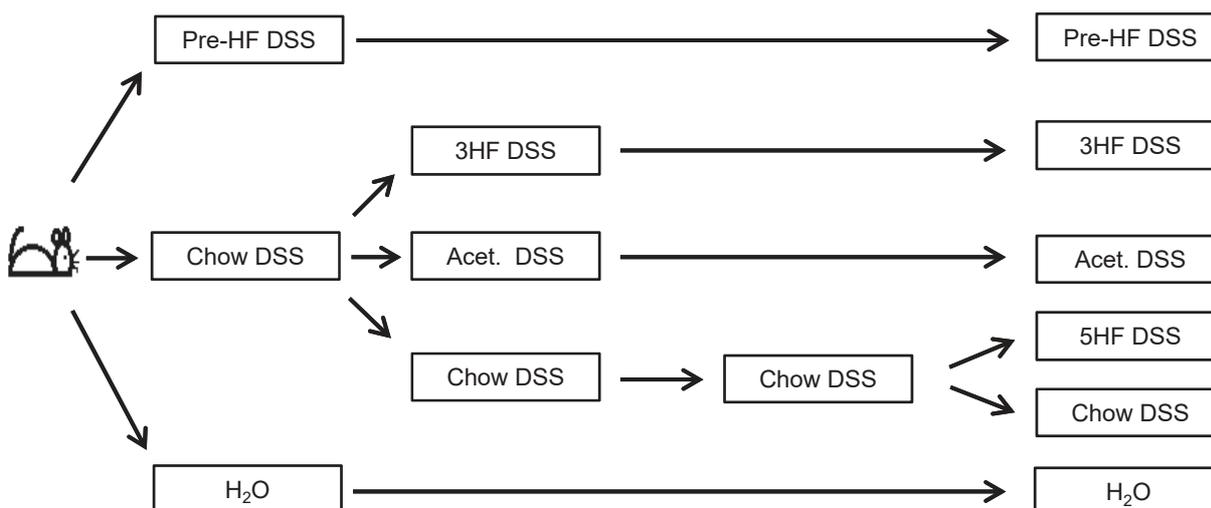
**Online resource 1** Model of chronic colitis induced by DSS cycles. The chronic colitis was induced by 5 periodical cycles of DSS administration (6 days of DSS administration following by 14 days of water only). Flow cytometry of cecal lymph node at third and fifth cycle of chronic colitis induction. (A) Colon lengths from rectum to cecum. (B) Myeloperoxidase (MPO); (C) eosinophil peroxidase (EPO) activity. (D) Number of T (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) and B (CD19<sup>+</sup>) lymphocytes at third and fifth cycle of DSS. (E) Activated T cells - CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> and CD4<sup>+</sup>CD69<sup>hi</sup>. (F) Activated T cells - CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>. The data represent mean  $\pm$  SEM. n=5-10 mice in each group.  $P < 0.05$ ; # versus H<sub>2</sub>O; \* versus DSS 3C

## Online resource 2

### A – Protocol of chronic colitis induction



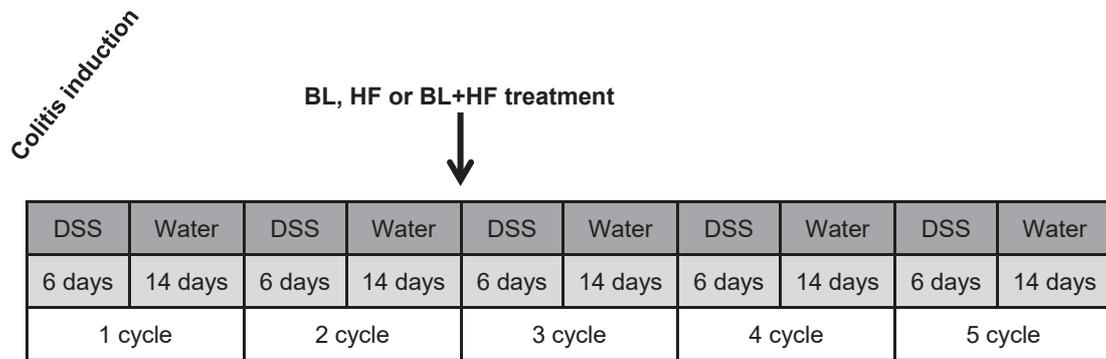
### B – Groups division



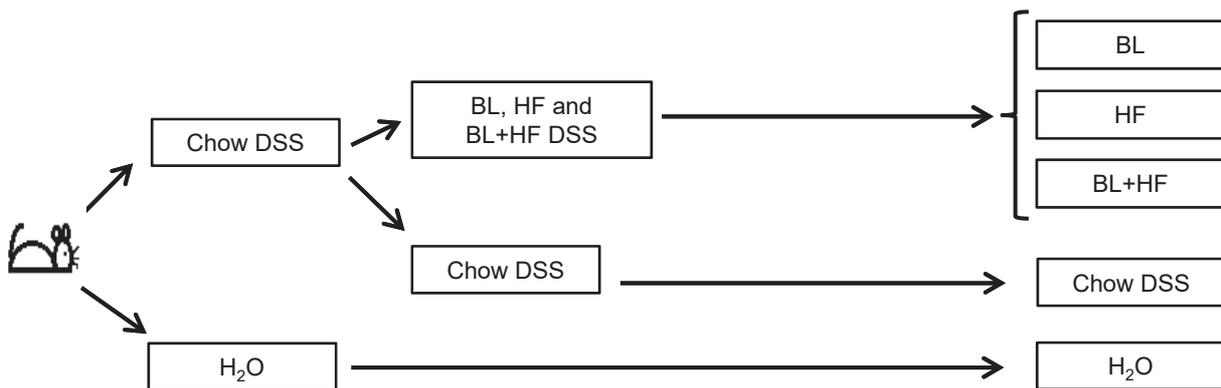
**Online resource 2** Experimental protocol of chronic colitis I. (A) Protocol of chronic colitis induction. Mice were fed with high the fiber diet for 20 days prior to the DSS administration (3%) or fed with high fiber diet at the beginning of the third, fourth (data not shown) or fifth cycles of DSS administration. The acetate was started at the beginning of the third cycle as a treatment. (B) Groups division - Pre-HF DSS: mice fed with the high fiber diet prior to the DSS administration; Chow diet: mice fed with the control/chow diet; 3HF DSS: mice were treated/fed with the high fiber diet at the third cycle of DSS until the sacrifice; 5HF DSS: mice were treated/fed with the high fiber diet at the fifth cycle of DSS until the sacrifice; Acet. DSS: mice were treated in drinking water with acetate at the third cycle of DSS until the sacrifice; H<sub>2</sub>O: the control mice received normal filter water throughout the experiment (H<sub>2</sub>O group)

### Online resource 3

#### A – Protocol of chronic colitis induction



#### B – Groups division



**Online resource 3** Experimental protocol of chronic colitis II. (A) Protocol of chronic colitis induction. Mice were fed with the high fiber diet for 20 days prior to the DSS administration (3%) and/or fed with high fiber diet at the beginning of the third cycles of DSS administration and the probiotic until the sacrifice. (B) Groups division Pre-HF DSS: mice fed with the high fiber diet prior to the DSS administration; Chow diet: mice fed with the control/chow diet; BL DSS: mice were treated with the *Bifidobacterium longum* (BL) at the third cycle of DSS until the sacrifice; HF DSS: mice were treated/fed with the high fiber diet at the third cycle of DSS until the sacrifice; BL+HF DSS mice were treated/fed with the *Bifidobacterium longum* (BL) and high fiber diet at the third cycle of DSS until the sacrifice; H<sub>2</sub>O: the control mice received normal filter water throughout the experiment (H<sub>2</sub>O group)

Preventive rather than therapeutic treatment with high fiber diet attenuates clinical and inflammatory markers of acute and chronic DSS-induced colitis in mice

European Journal of Nutrition

Ana Letícia Malheiros Silveira<sup>1</sup>, Adaliene Versiani Matos Ferreira<sup>1,2</sup>, Marina Chaves de Oliveira<sup>1,2</sup>, Milene Alvarenga Rachid<sup>1,3</sup>, Larissa Fonseca da Cunha Sousa<sup>1</sup>, Flaviano dos Santos Martins<sup>4</sup>, Ana Cristina Gomes-Santos<sup>5</sup>, Angelica Thomaz Vieira<sup>1</sup>, Mauro Martins Teixeira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Nutrition, Nursing School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil;

<sup>3</sup>Department of General Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil;

<sup>4</sup>Biotherapeutic Agents, Department of Microbiology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil;

<sup>5</sup>Immunobiology, Department of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

\*Corresponding author e-mail: [mmtex.ufmg@gmail.com](mailto:mmtex.ufmg@gmail.com)

## 4.2 Capítulo 2 - Progressão das alterações metabólicas na colite induzida por DSS

### Introdução

A doença de *Crohn* (CD) e a colite ulcerativa (UC) são as principais representantes das doenças inflamatórias intestinais (DII) em humanos. Ambas são doenças crônicas cuja incidência tem aumentado mundialmente (Cosnes *et al.*, 2011). As DIIs resultam de intensa resposta inflamatória com consequências graves aos indivíduos que as possuem, como perda de peso, diarreia sanguinolenta, febre, dor abdominal e encurtamento colônico (Hendrickson *et al.*, 2002). Associado a esses sinais e sintomas, os pacientes apresentam desnutrição, hipoalbuminemia, anemia e deficiências de vitaminas e minerais secundárias à anorexia e má absorção de nutrientes (Mijac *et al.*, 2010; Testa *et al.*, 2015).

Pacientes com DII apresentam alterações em metabólitos séricos (glicose e lipoproteínas), adipocinas (moléculas produzidas principalmente pelo tecido adiposo) e taxa metabólica basal (Karmiris *et al.*, 2006; Tigas e Tsatsoulis, 2012; Williams *et al.*, 2012; Zhang, Y. *et al.*, 2013; Dawiskiba *et al.*, 2014). Essas alterações estão associadas ao aumento no risco de desenvolvimento de outras doenças crônicas como aterosclerose e doenças cardiovasculares (Gandhi *et al.*, 2012; Dos Santos *et al.*, 2015). Além disso, é provável que a inflamação colônica acometa dois órgãos importantes relacionados ao controle metabólico: tecido adiposo e fígado. Pacientes com DII apresentam hipertrofia do tecido adiposo mesentérico próximo à inflamação transmural no intestino (Sheehan *et al.*, 1992) e alteração temporária na função hepática (Cappello *et al.*, 2014). De forma similar, animais submetidos à colite experimental mostraram distúrbios no metabolismo, como redução na taxa metabólica basal e alteração em metabólitos séricos (Melgar *et al.*, 2007; Olivier *et al.*, 2014). Camundongos tratados com DSS apresentaram aumento de células imunológicas infiltradas e da expressão de moléculas pró-inflamatórias no tecido

adiposo mesentérico (Mustain *et al.*, 2013; Olivier *et al.*, 2014), possível barreira protetora contra bactérias após translocação do intestino inflamado (Batra *et al.*, 2012).

Apesar de se reconhecer as alterações metabólicas associadas à colite, os resultados existentes na literatura não apresentam perfil claro e são contraditórios em alguns casos. Assim, nesse trabalho objetivamos: (i) avaliar a progressão da inflamação colônica, no estímulo agudo e persistente induzido por DSS, e seu impacto no desenvolvimento de alterações metabólicas séricas; (ii) identificar os distúrbios induzidos pela inflamação intestinal em dois sítios importantes no controle do metabolismo intermediário, tecido adiposo e fígado. Em suma, nossos resultados mostram que ocorrem adaptações metabólicas no pico da resposta inflamatória. Durante a colite aguda, observamos que os animais que receberam DSS apresentam redução da glicemia, aumento nas concentrações de colesterol total e triglicérides, redução nas concentrações de adiponectina e resistina, aumento de leptina sérica, entre outras. Após repetidos estímulos inflamatórios observamos alterações metabólicas similares a um quadro de síndrome metabólica, entretanto com perda da adiposidade. Os animais com colite crônica demonstram aumento nas concentrações de glicose, colesterol total, triglicérides e resistina e redução na concentração de leptina acompanhado de intolerância à glicose e resistência insulínica.

## **Materiais e métodos**

### ***Animais utilizados***

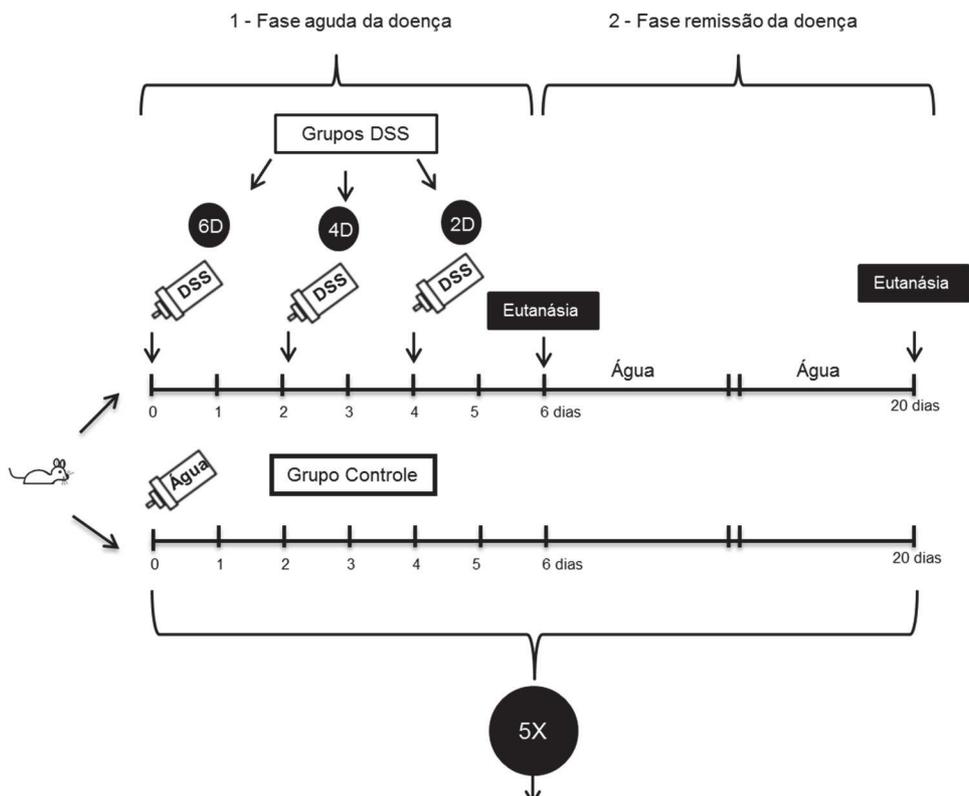
Camundongos BALB/c fêmeas, entre 6-8 semanas de idade (peso entre 20-24g), foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos no laboratório de Imunofarmacologia/ICB, sob condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso à ração e água.

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG) protocolo 296/2012.

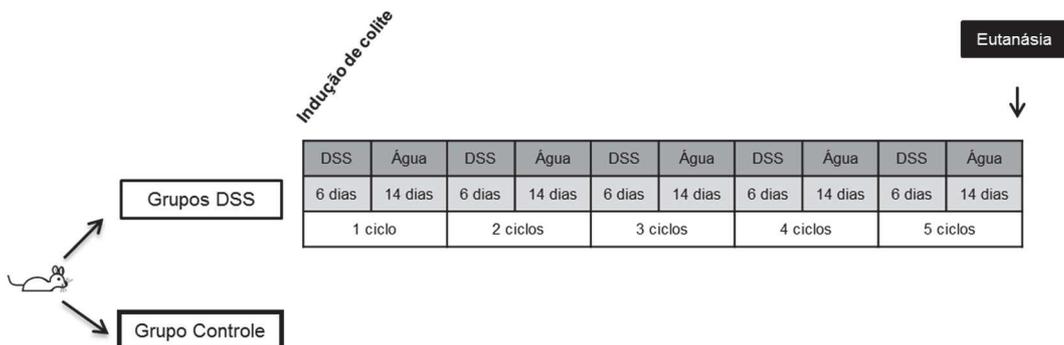
### ***Modelo de colite experimental aguda e crônica***

Os camundongos com colite aguda receberam DSS (36,000–50,000 kDa; MP Biomedicals, Solon, OH, USA) a 4% (peso/volume) diluído na água de beber *ad libitum* por no máximo seis dias e realizou-se a eutanásia após dois (2D), quatro (4D) ou seis dias (6D); ou receberam o agente químico por seis dias e realizou-se a eutanásia 14 dias após a remoção do DSS - fase de remissão/livre de DSS (um ciclo de doença) (Figura 1A). Para a indução da colite crônica administraram-se nos camundongos cinco ciclos de DSS (3%) (Figura 1B). Os animais do grupo controle receberam água filtrada durante todo o delineamento experimental (grupo controle, H<sub>2</sub>O - água). Protocolo similar de indução de colite foi utilizado em estudo anterior (**Capítulo 1**) (Silveira *et al.*, 2015). Ao término do protocolo experimental realizou-se a eutanásia dos animais por meio de sobredose de anestésico (cetamina/xilazina), e em seguida, as amostras de tecidos foram coletadas, pesadas e armazenadas para posteriores análises.

**A – Protocolo de indução de colite aguda - DSS 4%**



**B – Protocolo de indução de colite crônica - DSS 3%**



**Figura 1. Delineamento experimental I.** (A) Protocolo de indução de colite aguda (DSS 4%). (A.1) Fase aguda da doença, cinética da doença. Grupos experimentais: Controle: animais que receberam água pura; 2D: 2 dias com DSS; 4D: 4 dias com DSS; 6D: 6 dias com DSS. Os animais foram submetidos à eutanásia no mesmo dia experimental, dia 6. (A.2) Fase de remissão da doença. Grupos experimentais: Controle: animais que receberam água pura; 6D: 6 dias com DSS. Os animais foram submetidos à eutanásia do mesmo dia experimental, 14 dias após a remoção do DSS no grupo com indução de colite. (B) Protocolo de indução de colite crônica (DSS 3%). Grupos experimentais: Controle: animais que receberam água pura; DSS: animais submetidos a cinco ciclos de administração de DSS, cada ciclo equivale a seis dias de DSS seguidos por intervalo de 14 dias livres de DSS. Todos os animais foram submetidos à eutanásia do mesmo dia experimental, ao final do quinto ciclo de administração de DSS.

### ***Avaliação do escore clínico e progressão da colite experimental***

Durante a colite aguda, os camundongos foram pesados a cada dois dias e o escore clínico avaliado. Já durante o protocolo de colite crônica essa avaliação foi realizada três vezes durante a administração do DSS e duas vezes no período livre de DSS. O peso dos animais foi representado como percentual em relação ao peso inicial.

Para a avaliação dos sinais clínicos, os animais foram colocados individualmente em gaiolas, por cerca de 10 minutos para a coleta das fezes e análise da consistência e presença de sangue oculto e/ou muco. Para a análise da presença de sangue oculto, as fezes foram coletadas e maceradas em cartelas Hexagon OBScreen (Human Diagnostic, Wiesbaden, Alemanha). A quantificação numérica dos sinais clínicos foi feita de forma individual, cada animal possuía a mesma identificação até o final do experimento, seguindo as seguintes características e pontuações: 0 = fezes normais e ausência de sangue, 1 = fezes normais e traços de sangue no teste de sangue oculto, 2 = fezes de consistência cremosa e teste positivo para presença de sangue oculto, 3 = fezes de consistência pastosa e teste positivo para presença de sangue oculto, 4 = fezes líquidas e teste positivo para presença de sangue oculto, 5 = fezes líquidas e moderado sangramento retal, 6 = fezes líquidas e intenso sangramento retal, 7 = diarreia e hemorragia, 8 = diarreia, hemorragia e sinais gerais de morbidade incluindo postura encurvada e piloereção (Vieira *et al.*, 2009).

### ***Dietas utilizadas durante os delineamentos experimentais***

A dieta comercial utilizada no biotério foi substituída pela dieta padrão AIN-93M, padronizada por Reeves e colaboradores (1993), duas semanas anteriores à indução de colite. Essa mesma dieta foi utilizada como dieta controle para todos os experimentos

realizados nesse trabalho. Os ingredientes da dieta padrão podem ser visualizados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição da dieta experimental - uso em animais com idade superior a seis semanas.

<b>Ingredientes</b>	<b>Dieta padrão* (g/kg dieta)</b>
Amido de milho	465,692
Caseína	140,000
Amido dextrinizado	155,000
Sacarose	100,000
Óleo de soja	40,000
Celulose	50,000
Mix mineral (AIN-93M)	35,000
Mix de vitaminas (AIN-93)	10,000
L-Cistina	1,800
Bitartarato de colina	2,500
BHT	0,008

\*AIN-93M dieta formulada para a manutenção de roedores adultos (Reeves *et al.*, 1993).

### ***Análises histopatológicas do cólon***

Nos animais submetidos à colite experimental, porção proximal do cólon foi removida logo após a eutanásia para a posterior confecção da lâmina histológica. Inicialmente os cólons coletados foram fixados em Bouin (solução saturada de ácido pícrico 750 mL+formol 37 % 250 mL+2 % de ácido acético) e enrolados em formato de rocambole. Após tempo mínimo de fixação (48 horas), os tecidos foram submetidos a etapas de desidratação, diafanização em xilol, banho e inclusão em parafina. Em seguida, foram realizados cortes em micrótomo e as lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Os cortes foram examinados ao microscópio óptico (x100) por patologista (análise cega) e pontuados de acordo a presença de inflamação (nenhuma: 0, sutil: 1, moderada: 2, grave: 3); presença de lesão (nenhuma: 0; mucosa: 1; mucosa e submucosa: 2 transmural: 3); danos nas criptas (nenhum: 0; basal 1/3: 1; basal 2/3: 2; apenas

superfície: 3; perda de cripta e epitelial: 4); percentual de acometimento tecidual (1-25%: 0; 26-50%: 1; 51-75%: 2; 76-100%: 4). Após as análises, os escores foram somados, valores de escores aumentados progressivamente indicam maior lesão e inflamação no órgão. Os cortes histológicos foram fotografados como parâmetro de comparação entre os grupos avaliados.

### ***Avaliação de parâmetros inflamatórios***

#### ***Quantificação do infiltrado de neutrófilos no tecido por meio da avaliação da atividade da mieloperoxidase - MPO***

A quantificação indireta do acúmulo de neutrófilos no cólon, tecido adiposo e fígado, foi realizada pelo ensaio da atividade da MPO (Souza *et al.*, 2002). Os fragmentos dos órgãos dos animais submetidos à colite experimental e dos seus controles foram removidos e congelados a -20°C, até o dia da homogeneização do tecido. Após o descongelamento do tecido, este foi homogeneizado em tampão (0,1 M NaCl; 0,02 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 0,015 M NaEDTA - pH 4,7) na proporção de 1,9mL de tampão para cada 100 mg de tecido, utilizando-se o homogeneizador de tecidos (PowerGen 125® - Fisher Scientific Pennsylvania, USA). Após esse procedimento, o homogenato foi centrifugado a 10000 rpm/15 minutos a 4°C (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA) e o precipitado foi submetido à lise hipotônica (1,5mL de solução de NaCl 0,2 % seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6 % e glicose 5 % - 30s após). Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuscitado em tampão 2 (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M; Hexadecyl trimethyl ammonium bromide - HTAB - Sigma 0,5 % p/v - pH 5,4) na proporção de 1,9 mL para cada 100 mg de tecido. Após essa etapa, o homogenato foi submetido a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas a 10000 rpm/15 minutos e foi

recolhido o sobrenadante para a realização do ensaio. As amostras foram diluídas no tampão 2 de acordo com o tecido inicial a ser quantificada a enzima e o modelo experimental avaliado. A atividade da mieloperoxidase foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450 nm utilizando a reação entre *tetramethylbenzidine* diluído em dimetilsulfóxido (1,6 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM). A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M e a leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). Os resultados obtidos foram expressos como unidade relativa, de acordo com curva padrão do número de neutrófilos versus OD obtida pelo processamento de neutrófilos purificados (> 95% pureza) e utilizado para a medida de atividade da mieloperoxidase, padronização realizada anteriormente no laboratório (Souza *et al.*, 2002).

#### *Quantificação do infiltrado de eosinófilos no tecido por meio da avaliação da atividade da peroxidase eosinofílica - EPO*

A quantificação da atividade de EPO no cólon, tecido adiposo e fígado, foi utilizada como maneira indireta de estimar a presença de eosinófilos nesses órgãos. Amostras dos tecidos dos animais submetido à eutanásia foi homogeneizada utilizando-se o homogeneizador de tecidos (PowerGen 125® - Fisher Scientific Pennsylvania, USA) com PBS 5X (phosphate-buffered saline pH = 7,2) na proporção 1,9mL em 100mg de tecido, em seguida o tecido foi centrifugado a 10000 rpm/10 minutos (12.000 g) e o sobrenadante foi posteriormente desprezado. O sedimento foi sujeito à lise hipotônica por adição de 1,5 mL (em 100 mg de tecido) de salina NaCl 0,2 %, seguido pela adição de 1,5 mL da preparação com salina 1,6 % e glicose 5,0 %. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 10000 rpm/10 minutos, e o sobrenadante foi novamente desprezado e ao sedimento acrescido 1,9 mL de PBS (pH 7,4), contendo HTAB 0,5 %.

Essa solução foi novamente homogeneizada, e o homogenato submetido ao processo de congelamento e descongelamento, por três vezes, em nitrogênio líquido e centrifugado a 10000 rpm/15 minutos. Apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificação da enzima. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, 75 µL de amostra (sem diluição) ou branco (PBS) foi incubada com 75 µL de substrato (1,5 mM de o-fenilenodiamina, OPD em tampão Tris-HCl - 0,075 mM – pH = 8 suplementado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6,6 mM) por poço. A placa foi incubada no escuro por aproximadamente 30 minutos, e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M, a leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 492 nm. Este ensaio foi conduzido como descrito anteriormente (Strath *et al.*, 1985).

#### *Determinação das concentrações de citocinas e adipocinas - ensaio imunoenzimático/ELISA*

As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram avaliadas em amostras do cólon, tecido adiposo e fígado (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). No soro adiponectina, leptina e resistina (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) foram avaliadas, bem como insulina (Millipore, Bedford, MA, USA). Para quantificação de citocinas, amostras dos tecidos foram homogeneizadas em solução tampão de fosfato (PBS) (0,4 M NaCl e 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) contendo inibidor de proteases (0,1 mM *phenylmethanesulfonyl fluoride*, 0,1 mM *benzethonium chloride*, 10 mM EDTA e 20KI aprotinina A) e 0,05 % Tween 20, na proporção de 0,1 g de tecido para cada mL de solução; foi utilizado homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fischer Scientific Pennsylvania, USA). As amostras foram mantidas a -20°C para posterior realização do ensaio enzimático. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As placas foram sensibilizadas com 100

$\mu\text{L}/\text{poço}$  de solução dos respectivos anticorpos monoclonal anti-camundongo para as citocinas a serem analisadas e incubadas a  $4^{\circ}\text{C}$  *overnight*. Após três lavagens ( $300 \mu\text{L}/\text{poço}$  - Bio-Tek Instruments, INC) com PBS-Tween 20 X (0,05 % - pH = 7,4); adicionou-se às placas  $200 \mu\text{L}$  por poço de tampão bloqueio (1 % albumina bovina-BSA em PBS pH = 7,4) e estas foram, então, incubadas a temperatura ambiente por no mínimo uma hora. Após nova etapa de lavagem, adicionou-se  $100 \mu\text{L}/\text{poço}$  dos padrões ( $500-1000 \text{ pg/mL}$ ) e das amostras diluídas (diluição varia de acordo com a citocina a ser quantificada e a amostra utilizada) em BSA-PBS (0,1 % - pH = 7,4) e prosseguiu-se nova incubação a  $4^{\circ}\text{C}$  *overnight* ou por no mínimo de duas horas. Após lavagem das placas, adicionou-se  $100 \mu\text{L}/\text{poço}$  de solução de anticorpo de detecção anti-camundongo para as citocinas em questão e incubaram-se as placas por duas horas. Após nova lavagem, adicionou-se  $100 \mu\text{L}/\text{poço}$  de solução de estreptavidina ( $50 \mu\text{L}$  de estreptavidina em 10 mL de solução BSA 0,1 %) e incubou-se por 30 minutos após esse intervalo de tempo foi adicionado  $100 \mu\text{L}/\text{poço}$  do substrato OPD (o-fenilenodiamina, Sigma) diluído em tampão citrato (pH = 5,0) acrescido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 v/v). As placas foram incubadas ao abrigo da luz por 30 minutos ou até que a reação ocorresse. A reação foi interrompida com a adição de  $50 \mu\text{L}/\text{poço}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M e a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm (Status - labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). Todos os passos de incubação (exceto *overnight*) foram feitos à temperatura ambiente.

### ***Parâmetros metabólicos avaliados***

*Ensaio enzimático, índice de resistência insulínica, teste de tolerância oral à glicose, teste de sensibilidade insulínica*

Glicose, colesterol total e triglicérides de jejum (4 horas) foram quantificados no soro dos animais por meio de kits enzimáticos conforme orientação fornecida pelo

fabricante (Katal, Belo Horizonte, MG, Brasil). Ácidos graxos não-esterificados (*non-esterified fatty acids* - NEFA) foram avaliados no soro dos animais por meio de método colorimétrico enzimático [HR Series NEFA-HR(2), Wako Life Sciences, Inc., Mountain View, CA,USA]. O índice de resistência insulínica foi calculado conforme fórmula: HOMA-IR = concentração da glicose em jejum (mmol/L) X concentração de insulina de jejum ( $\mu\text{U/mL}$ )  $\div$  22.5. Para o teste de tolerância oral à glicose (TTOG) os animais foram submetidos a jejum de 4 horas, em seguida aos camundongos administrou-se por meio de gavagem, solução concentrada de D-glicose (2 mg/g peso corpóreo). As concentrações da glicemia sérica foram monitoradas, por meio de amostras de sangue da cauda do animal, nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 minutos após a sobrecarga de glicose, por meio de glicosímetro Accu-Check (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). O teste de sensibilidade insulínica foi realizado após injeção intraperitoneal de insulina em animais no estado alimentado (0,75 unidades/kg de peso corporal - Sigma, St. Louis, MO). Da mesma forma que no TTOG as glicemias foram obtidas por meio de amostras de sangue da cauda do animal, nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 minutos.

### ***Análises hepáticas***

#### ***Extração de lipídio hepático***

Conteúdo de gordura hepático foi extraído de amostras do fígado por meio do método de extração lipídica *Folch* (Folch *et al.*, 1957). Resumidamente, amostras de fígado foram homogeneizadas em clorofórmio:metanol, na proporção de 2:1, para a extração da gordura total. Após a extração, a solução foi submetida à filtração, e, então misturada à solução salina (NaCl 0,9%). A fase superior do homogenato foi aspirada e descartada, enquanto alíquota de volume definido foi coletada e pipetada em tubo, de peso inicial conhecido. A gordura foi determinada por gravimetria da solução evaporada

e diferença de pesos do tubo coletor. A gordura contida no tubo foi homogeneizada a 500µL de isopropanol e então, as concentrações de triglicérides e colesterol total foram aferidas, no momento, por meio do uso de kits enzimáticos para essas moléculas (Katal, Belo Horizonte, MG, Brasil).

#### *Escore histopatológico no fígado - índice inflamatório e conteúdo de gordura hepática*

Após a eutanásia, o fígado foi removido e parte do órgão separado e submetido à fixação por formol tamponado (4 %) durante período mínimo de 24 horas. Após esse período, o tecido foi armazenado em etanol 70 % e posteriormente submetido à desidratação, realizada em concentrações crescentes de etanol (70 %, 80 %, 90 % e absoluto I, II e III), por período de 30 minutos em cada solução, seguida por diafanização em xilol durante 1 hora. Os tecidos foram impregnados com parafina durante 1 hora e incluídos na mesma. Em seguida, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (5 µm) e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas obtidas foram avaliadas em microscópio de luz, equipado com câmera digital (Motican 2500). Para as análises histológicas do fígado, foi realizado o escore histológico, baseando-se nos seguintes parâmetros para quantificação dos resultados: infiltrado inflamatório, inflamação perivascular e conteúdo de gordura hepática (0 - ausente; 1 - leve; 2 - moderado; 3 - grave), adaptado de Brunt e colaboradores (1999) de acordo com as principais alterações hepáticas observadas nos camundongos.

#### *Estresse oxidativo*

A concentração total de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*thiobarbituric acid-reactive substance* - TBARS) que avalia a produção de malonaldeído (*malonyldialdehyde* - MDA) foi determinada em amostras do fígado

conforme descrito anteriormente (Ohkawa *et al.*, 1979). Em resumo, 100 mg de amostra de fígado foram homogeneizados em PBS. Solução de ácido tiobarbitúrico (em metanol) e butil hidroxitolueno (em 5 mM hidróxido de sódio - NaOH) foi acrescida ao homogenato seguido ao acréscimo de ácido fosfórico (7 %). As amostras foram aquecidas e então colocadas em gelo, como última etapa do protocolo, butanol foi adicionado às amostras que foram posteriormente centrifugadas e o sobrenadante transferido para placa de 96 poços. A absorbância foi aferida em dois comprimentos de onda: 532 e 600 nm.

Concentrações de glutathiona reduzida (GSH) foram determinadas por meio da homogeneização de 100 mg de fígado com PBS. Ao homogenato foi acrescido ácido tricloroacético e em seguida as amostras foram mantidas no gelo por 30 minutos e centrifugadas. O sobrenadante foi coletado e transferido para uma placa de 96 poços e então se acrescentou Tris-HCl 0,4 M pH 8, e como última etapa adicionou-se solução de *5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)* em metanol. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 415 nm (Spectramax plus 384 da molecular devices). As concentrações foram determinadas por curva padrão de GSH (*L-Glutathione reduced*: Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (Sedlak e Lindsay, 1968).

### ***Real-time polymerase chain reaction - PCR em Tempo Real (RT-PCR)***

#### *Extração do RNA total e mensageiro*

O RNA total foi isolado do cólon, fígado e tecido adiposo mesentérico pelo reagente TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguindo o procedimento recomendado pelo fabricante. Em seguida o RNA obtido foi colocado em microtubo de 2 mL adicionado de 200 µL de Clorofórmio (Merck), sendo a solução vigorosamente agitada até adquirir coloração rosa clara. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 10000 rpm a 4°C. A fase incolor situada na parte superior do tubo foi transferida para um

novo tubo, no qual foi adicionado 500  $\mu$ L de isopropanol (Merck). O tubo foi homogeneizado gentilmente e armazenado em freezer *overnight* e novamente centrifugado como nas condições anteriores. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado 150  $\mu$ L de etanol 70 %. O tubo foi novamente centrifugado por 3 minutos nas mesmas configurações que as anteriores. Foi descartado o sobrenadante e após seco à temperatura ambiente o precipitado formado foi ressuspendido em 20  $\mu$ L de água ultrapura DEPC. A suspensão foi dissolvida em banho Maria a 65°C por 10 minutos. Após a extração, o RNA total obtido foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, Delaware, USA) e armazenado a -80°C. Devido a contaminação das amostras com o DSS que impede a correta amplificação da reação de qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*), kit de purificação de RNA mensageiro (mRNA) a partir do RNA total extraído foi utilizado (Dynabeads mRNA Purification Kit - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) conforme orientações do fabricante. O mRNA extraído pelas *beads* magnéticas foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 1000 e deu-se seguimento à síntese do DNA complementar (cDNA).

#### *Síntese de DNA complementar*

Para a confecção das moléculas de cDNA por RT-PCR (reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase), foram utilizados 75 ng de mRNA total. O RNA foi então submetido à ação da enzima SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) conforme as condições indicadas pelo fabricante. Em cerca de 75  $\mu$ g de RNA total (13  $\mu$ L) foi adicionado 1  $\mu$ L de primer Oligo (dT) (500  $\mu$ g/mL) e 1  $\mu$ L de dNTP (10 mM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Essa solução foi incubada a 70°C durante 5 minutos e após, por um período de 5 minutos a

4°C. Em seguida, foram adicionados 4 µL de GeneAmp® 10X PCR Buffer, 1 µL de UltraPure™ Dithiothreitol (DTT) (0,1 M), 1 µL de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/L) e 1 µL da enzima SuperScript III (200 U/L) seguido de incubação por 1 hora e 30 minutos a 42°C, subindo para 70°C por 15 minutos. Ao final, as amostras de DNAc foram armazenadas a -20°C, anterior à reação de PCR, específica para cada gene.

#### *Reação de PCR em tempo real*

As reações foram realizadas em placas de 96 poços MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, cobertas com adesivos ópticos e processadas pela máquina 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, RU). Foi utilizado o sistema de quantificação por fluorescência SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para tal, foram utilizadas amostras de DNAc (diluídas conforme curva de padronização realizada para cada primer no tecido a ser avaliado) em água DEPC. O ensaio foi realizado em duplicata, sendo que a cada poço foi adicionado 2 µL da amostra associada ao mix contendo 5 µL SYBR Green, 1 µL água DEPC, 1 µL oligonucleotídeo senso e 1 µL oligonucleotídeo anti-senso. O branco (NTC) foi considerado como tudo menos a amostra (água DEPC em substituição). A Tabela 2 mostra as sequências dos oligonucleotídeos que foram utilizados nas reações.

**Tabela 2.** Sequências dos oligonucleotídeos para as reações de PCR em Tempo Real.

Gene	Oligonucleotídeo senso	Oligonucleotídeo anti-senso
CPT1	5'- TCC CAG GCA AAG AGA CAG ACT TGC -3'	5'- GCA GGC GCG AGC CCT CAT AG -3'
GLUT1	5'-GTC TGG CGG GAG ACG CAT AG-3'	5'-GTC ACC TTC TTG CTG CTG GGA T-3'
GLUT4	5'-GGC TCT GAC GAT GGG GAA C-3'	5'-AAA CTG AAG GGA GCC AAG CA-3'
G6Pase	5'-TGGTAGCCCTGTCTTTCTTG-3'	5'-TTCCAGCATTACACTTTCCT-3'
HSL	5'-AAC GAG ACA GGC CTC AGT GTG-3'	5'-GAA TCG GCC ACC GGT AAA GAG-3'
LPL	5'- AGT CTG GCC TCG AAC TAA ACT ATG TAT -3'	5'- TCC CAG GAC ACA GGA AGC TAA -3'
PKM1	5'-GCT GTT TGA AGA GCT TGT GC-3'	5'-TTA TAA GAG GCC TCC ACG CT-3'
PKM2	5'-TTGCAGCTATTCGAGGAACTCCG-3'	5'-CACGATAATGGCCCCACTGC-3'
RPL4	5'- TCC CTC AAG AGT AAC TAT AAC CTG CCC -3'	5'- TGG TGC TCG GAG GGC TCT TTG -3'
SGLT1	5'-TCT GTA GTG GCA AGG GGA AG-3'	5'-ACA GGG CTT CTG TGT CTT GG-3'

As condições da reação de PCR em tempo real foram as seguintes: uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. Os valores médios de medições em duplicata do Ct (ciclo limiar) foram usados para calcular a expressão do gene alvo, com normalização de um gene constitutivo (RPL4) de cada amostra, utilizando-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### **Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para a análise de mais de dois grupos, com distribuição paramétrica, os dados foram analisados por meio da análise de variância (One-way ANOVA), seguida de pós-teste Dunnett. Já nas análises com dois fatores, tempo e tratamento, two way ANOVA seguida de pós-teste Bonferroni foi utilizado. Nas avaliações entre dois grupos o teste t de *student* foi utilizado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se  $P < 0,05$  e os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software Inc -San Diego, CA, USA).

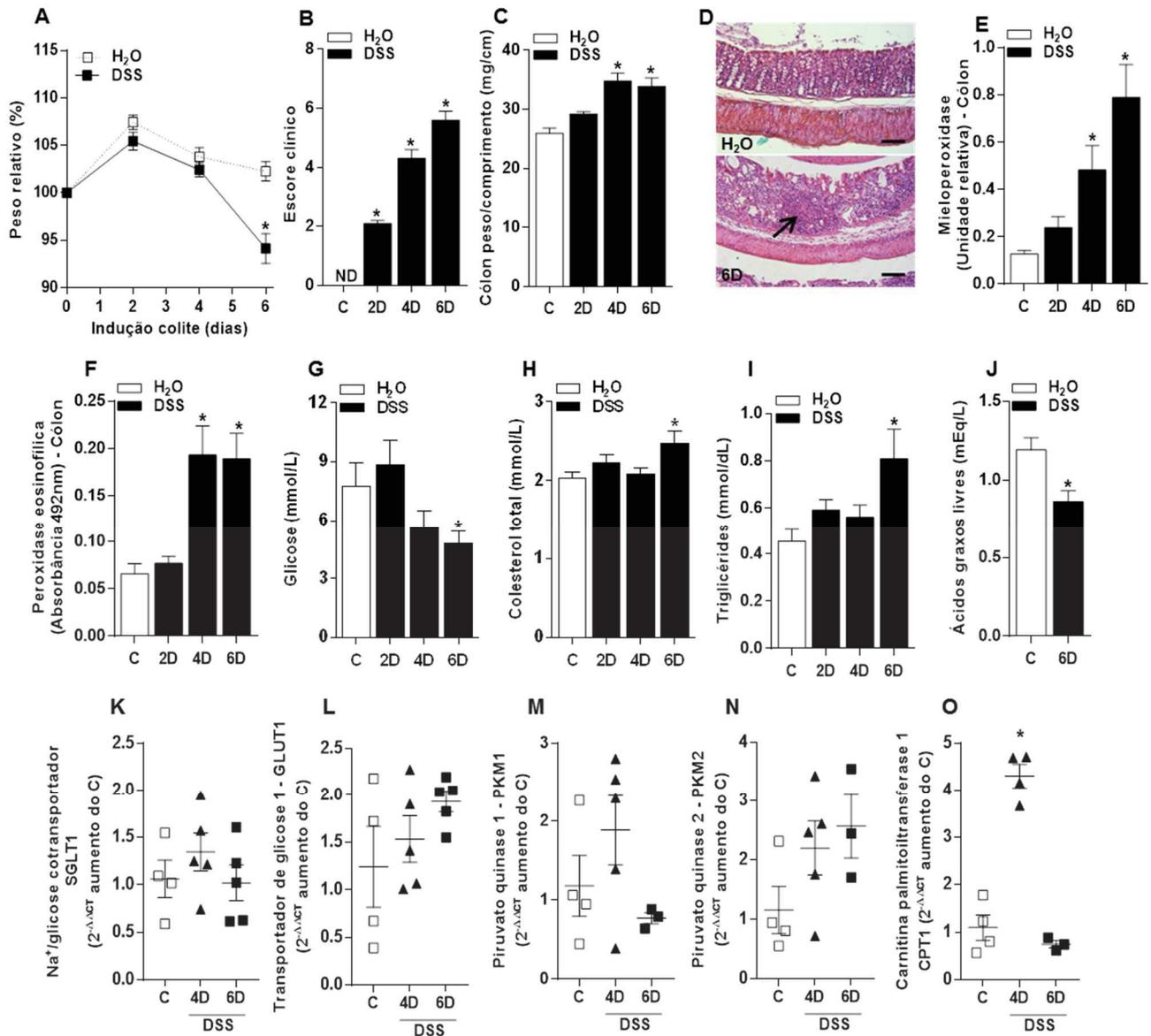
## Resultados

### Colite experimental aguda induziu adaptações metabólicas nos camundongos no pico da resposta inflamatória

Durante a colite aguda, os animais submetidos à administração de DSS na água de beber tiveram perda de peso significativa após seis dias de administração do agente químico (Figura 2A), associada a aumento no escore clínico após dois, quatro e seis dias em comparação ao grupo controle (Figura 2B). Após ingestão de DSS por quatro e seis dias, os animais apresentaram aumento na razão peso/comprimento do cólon (Figura 2C). Camundongos que receberam DSS por seis dias apresentaram intenso infiltrado inflamatório, acompanhado por perda das criptas no cólon, como pode ser observado em corte histológico desse órgão, indicado pela seta na Figura 2D. Amostras colônicas dos grupos 4D e 6D apresentaram aumento das atividades de MPO (Figura 2E) e EPO (Figura 2F), que indicam de forma indireta maior presença de neutrófilos e eosinófilos, respectivamente, em comparação ao grupo controle.

Em relação aos parâmetros metabólicos, animais com colite submetidos a seis dias de DSS apresentaram redução da concentração de glicose e aumento na concentração de colesterol total e triglicérides no soro em comparação ao grupo controle (Figura 2G-I). Visto que as principais alterações séricas ocorreram no sexto dia após a indução de colite experimental, quantificou-se ácidos graxos livres no grupo 6D e foi observado redução em relação ao grupo controle (Figura 2J). Com o objetivo de compreender a correlação entre resposta inflamatória colônica e alterações metabólicas séricas, avaliamos no cólon desses animais, por meio da técnica de qPCR, a expressão de moléculas relacionadas ao metabolismo glicídico e lipídico. A expressão do co-transportador de glicose dependente de sódio 1 (*sodium-glucose linked transporter 1* - SGLT1), presente principalmente em células do intestino, não foi alterada pela administração de DSS; da mesma forma não

houve alteração na expressão do transportador de glucose 1 (*glucose transporter 1* - GLUT1) (Figuras 2K e L, respectivamente). A expressão das isoformas da piruvato quinase, 1 e 2 (*pyruvate kinase* - PKM), não apresentou alteração, em amostras colônicas, entre os grupos avaliados (Figuras 2M e N, respectivamente). Animais que receberam DSS por quatro dias apresentaram aumento da expressão de carnitina palmitoiltransferase 1 (*carnitine palmitoyl transferase 1* - CPT1) em amostras do cólon quando comparado ao grupo controle. Já o grupo que recebeu DSS por seis dias não demonstrou esse aumento (Figura 2O).



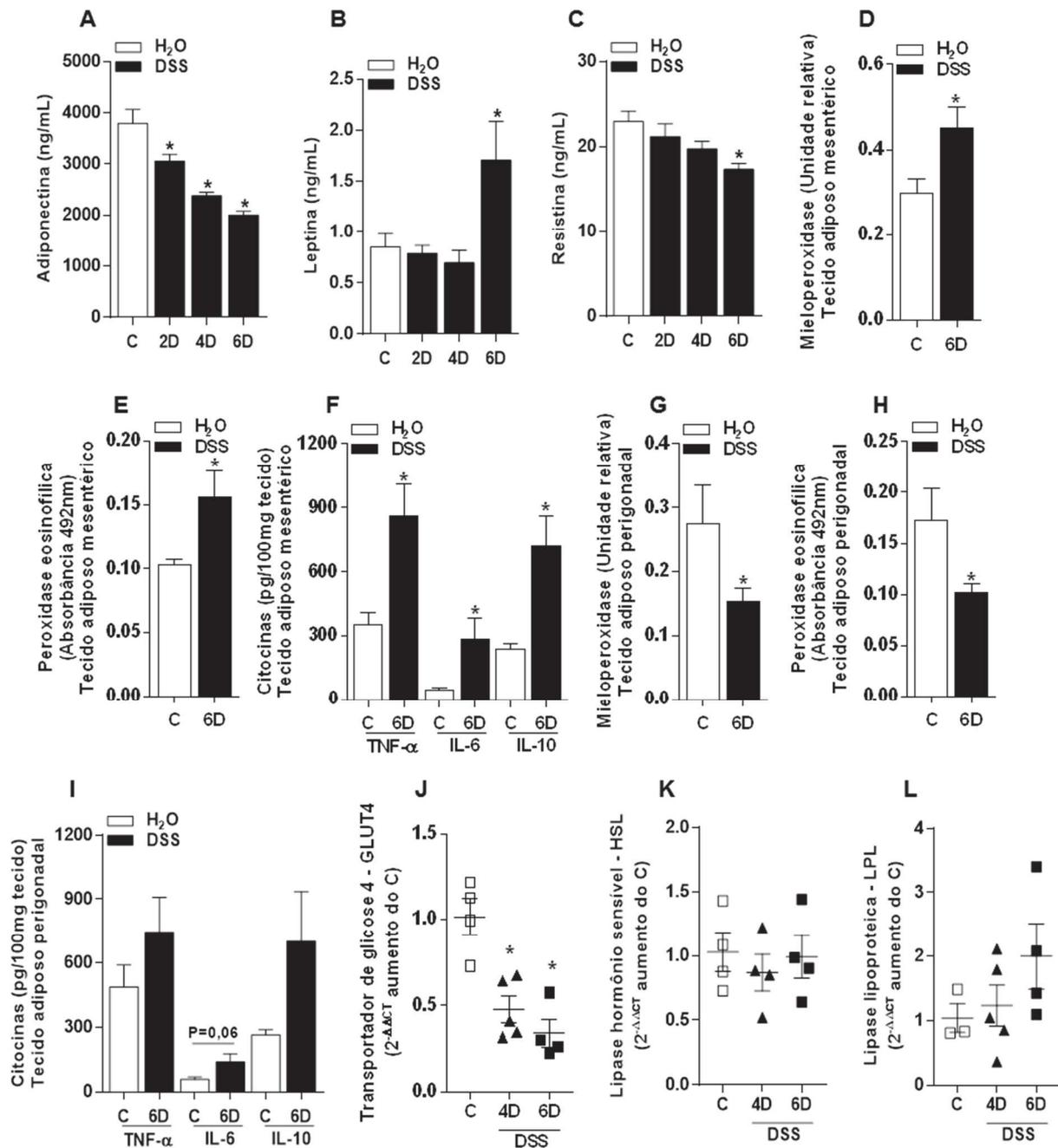
**Figura 2. Progressão da resposta inflamatória colônica, das adaptações metabólicas séricas e da expressão de moléculas relacionados ao metabolismo no cólon de animais submetidos à colite aguda por DSS.** (A) Peso relativo durante indução de colite por DSS. (B) Escore clínico após a administração de DSS por dois, quarto ou seis dias. (C) Razão peso/comprimento do cólon. (D) Secções de parafina de tecido colônico corados com H&E, X100. Barra = 50 µm. (E) Mieloperoxidase e (F) Peroxidase eosinofílica em amostras colônicas. Parâmetros metabólicos séricos de jejum: concentração de (G) Glicose, (H) Colesterol total, (I) Triglicérides e (J) Ácidos graxos livres. Expressão de moléculas relacionados ao metabolismo em amostras colônicas: (K) SGLT1; (L) GLUT1; (M) PKM1; (N) PKM2 e (O) CPT1. A-J  $n = 7-10$ ; K-O  $n = 3-5$ . Resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM);  $P < 0,05$ . \*versus controle. 2D: 2 dias de administração de DSS; 4D: 4 dias de administração de DSS; 6D: 6 dias de administração de DSS.

## **Colite experimental aguda induziu alteração na concentração de adipocinas séricas e inflamação do tecido adiposo mesentérico**

As concentrações de adipocinas, moléculas produzidas principalmente pelo tecido adiposo, também se encontraram alteradas em amostras de soro de animais submetidos à colite aguda experimental, apesar de não haver diferença no peso dos tecidos adiposos entre os grupos avaliados (dados não mostrados). Animais com DSS apresentaram redução da concentração de adiponectina (Figura 3A) e resistina após seis dias de indução da doença (Figura 3C); associada ao aumento nas concentrações de leptina em comparação aos animais controle (Figura 3B). Visto que as principais diferenças ocorreram após seis dias de colite, avaliamos as atividades das enzimas MPO e EPO, no tecido adiposo nos animais do grupo controle e 6D. No tecido adiposo mesentérico de animais com colite experimental observou-se aumento na atividade das enzimas MPO e EPO em relação ao grupo controle (Figura 3D e E). Maior concentração de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 também foram identificadas no mesmo tecido após seis dias de DSS em relação ao grupo controle (Figura 3F). Tais alterações não foram observadas no tecido adiposo perigonadal (Figura 3G-I).

Avaliamos a expressão de moléculas relacionadas à captação de glicose, liberação e captação de triglicerídeos pelo tecido adiposo mesentérico, para tentar compreender as alterações séricas previamente observadas e as consequências da resposta inflamatória presente no cólon e tecido adiposo mesentérico.

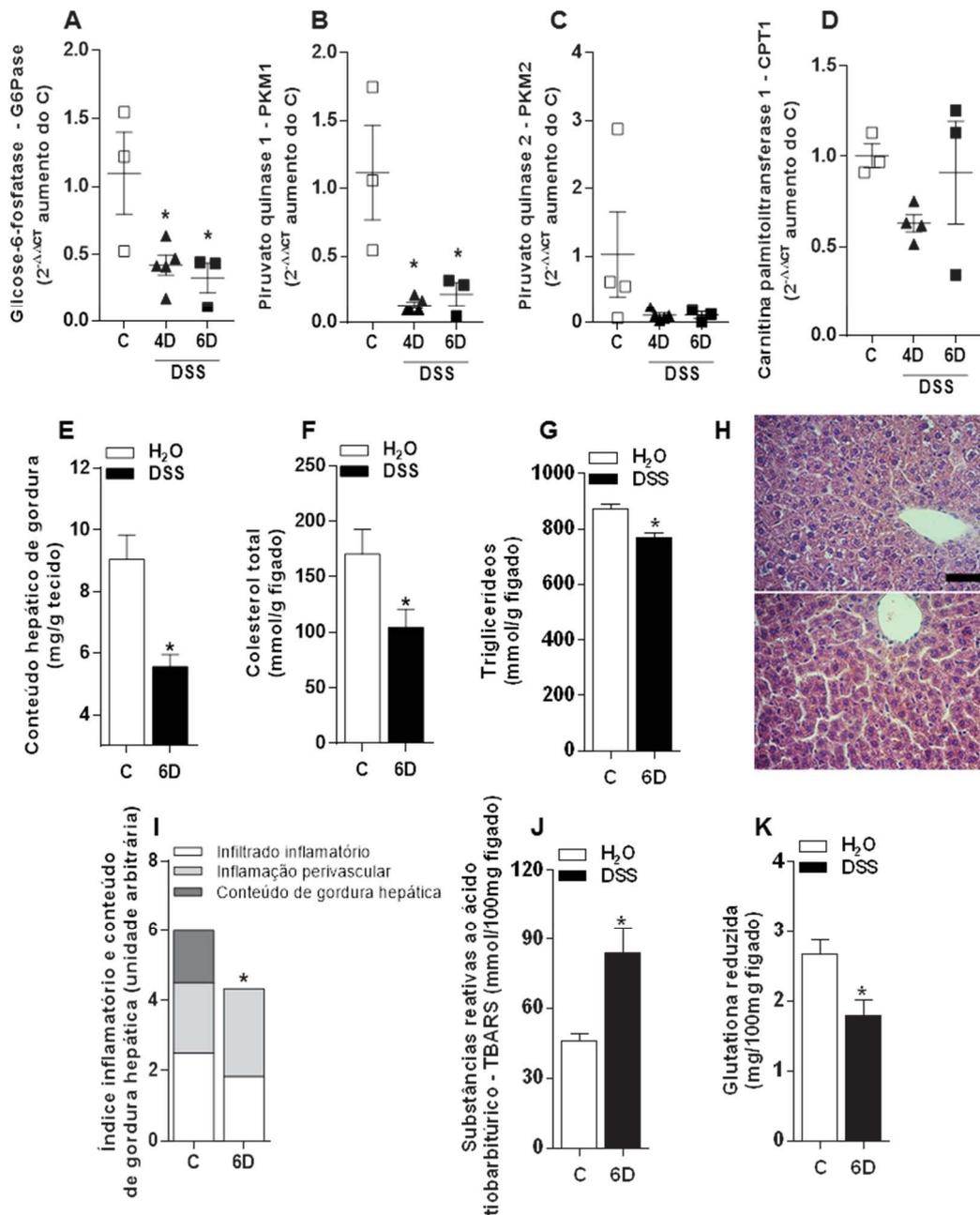
Após quatro e seis dias de DSS os animais apresentaram redução na expressão do transportador de glicose 4, *glucose transporter 4* - GLUT4, em relação ao grupo controle (Figura 3J). Não foram observadas diferenças na expressão da lipase hormônio sensível - HSL, e da lipase lipoproteica - LPL entre os grupos avaliados (Figura 3K e L).



**Figura 3. Avaliação das concentrações de adipocinas séricas e de parâmetros inflamatórios e metabólicos no tecido adiposo.** Concentração de adipocinas séricas: (A) Adiponectina, (B) Leptina e (C) Resistina. Atividade das enzimas (D) Mieloperoxidase e (E) Peroxidase eosinofílica e concentração das citocinas: (F) TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 no tecido adiposo mesentérico. Atividade das enzimas: (G) Mieloperoxidase e (H) Peroxidase eosinofílica e concentração das citocinas: (I) TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 no tecido adiposo perigonadal. Expressão das moléculas: (J) GLUT4, (K) HSL, (L) LPL no tecido adiposo mesentérico.  $n = 3-10$ . Resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM);  $P < 0,05$ . \*versus controle. 2D: 2 dias de administração de DSS; 4D: 4 dias de administração de DSS; 6D: 6 dias de administração de DSS

**Colite aguda induziu alterações na expressão hepática de moléculas do metabolismo, redução do conteúdo de gordura hepática e aumento do estresse oxidativo no fígado**

No fígado, importante órgão controlador do metabolismo glicídico e lipídico, observamos redução da expressão de glicose-6-fosfatase (Figura 4A) e piruvato quinase 1 (Figura 4B) nos animais que receberam DSS por quatro e seis dias em relação ao grupo controle. Não foram observadas diferenças estatísticas em relação à expressão de piruvato quinase 2 e carnitina palmitoiltransferase 1 nos grupos avaliados (Figura 4C e D). Animais com DSS apresentaram menor conteúdo hepático de gordura, avaliado pelo método de *Folch*, associado à redução no colesterol total e triglicérides no órgão, em comparação ao grupo controle (Figura 4E-G). Resultado similar avaliado por meio de escore histológico. O fígado dos animais submetidos ao tratamento com DSS demonstrou menor conteúdo hepático de gordura quando comparado ao grupo controle (Figura 4H e I). O estresse oxidativo foi avaliado pela presença de peroxidação lipídica por meio do ensaio de TBARS e de glutathiona reduzida. De fato, observou-se presença de estresse oxidativo no fígado de animais que receberam DSS, representado por aumento de TBARS e redução da concentração de glutathiona reduzida em comparação aos animais controles (Figura 4J e K, respectivamente). Não foram encontradas diferenças nos valores de MPO, EPO e citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 no fígado de animais submetidos ao tratamento com DSS (dados não mostrados).

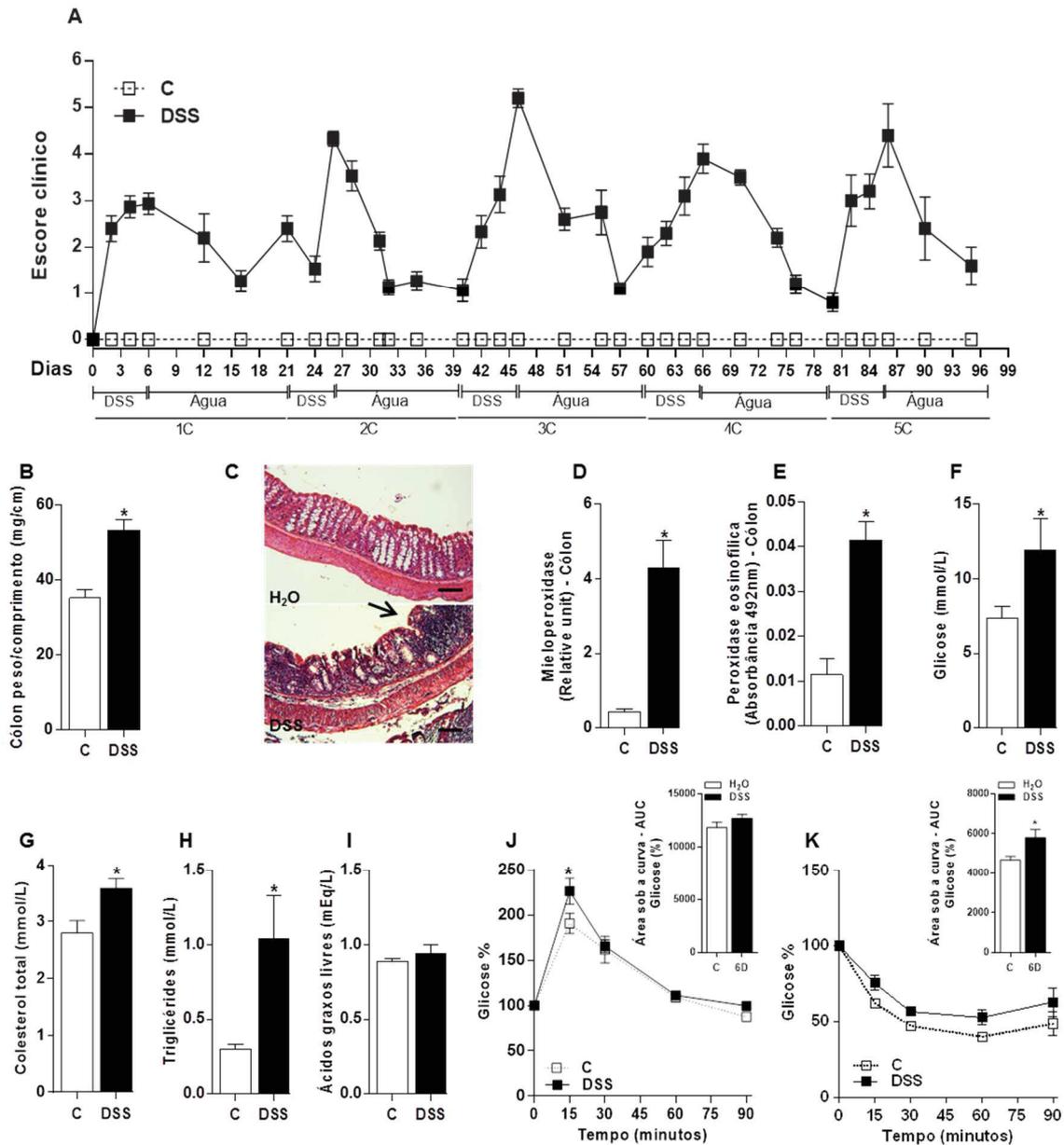


**Figura 4. Análises hepáticas de animais submetidos à indução de colite aguda por DSS.** Expressão de: (A) Glicose-6-fosfatase; (B) PKM1; (C) PKM2 e (D) CPT1 em amostras hepáticas. (E) Conteúdo de gordura hepática determinada pelo método *Folch*. (F) Colesterol total e (G) triglicérides provenientes da gordura hepática total extraída. (H) Seções de parafina, de fígado, corados com H&E, X400. Barra = 50µm. (I) Escore histopatológico determinado pelo índice inflamatório e conteúdo de gordura hepática. Quantificação de (J) substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS e (K) Glutathiona reduzida em amostras de fígado. A-D  $n = 3-5$ ; E-K  $n = 4-10$ . Resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM);  $P < 0,05$ . \*versus controle. 4D: 4 dias de administração de DSS; 6D: 6 dias de administração de DSS.

## **Diferente perfil das alterações metabólicas na colite crônica**

Com o objetivo de avaliar como o organismo lidaria com as adaptações agudas induzidas pela colite, avaliamos o metabolismo intermediário de animais submetidos à colite crônica. Durante a administração de DSS, no protocolo de indução de colite crônica, os escores clínicos nos animais com colite aumentaram durante a administração do agente químico, e reduziram nos períodos livre de DSS, comparado ao grupo controle (Figura 5A). Apesar da remoção do DSS por 14 dias, anteriores à eutanásia, ao final do quinto ciclo, as amostras colônicas coletadas demonstraram ainda aumento na razão peso/comprimento no cólon do grupo que recebeu DSS em comparação ao grupo controle (Figura 5B). Por meio de cortes histológicos, observamos a presença de infiltrado inflamatório e destruição das criptas em amostras de intestino dos animais com colite em relação ao grupo controle (Figura 5C). Essas alterações foram acompanhadas por aumento das atividades das enzimas MPO e EPO (Figura 5D e E, respectivamente).

Camundongos com colite crônica demonstraram aumento nas concentrações séricas de glicose, colesterol total e triglicérides em relação ao grupo controle (Figura 5F-H). Não houve diferenças nas concentrações séricas de ácidos graxos livres entre os grupos avaliados (Figura 5I). Devido ao aumento na concentração da glicose sérica de jejum nos animais com colite em relação ao grupo controle, realizamos o teste de tolerância oral à glicose. Animais submetidos à colite crônica apresentaram intolerância à glicose, representado no gráfico pelo maior pico glicêmico 15 minutos após a administração de solução saturada com glicose (Figura 5J) e resistência à insulina, demonstrada pela AUC (Figura K).

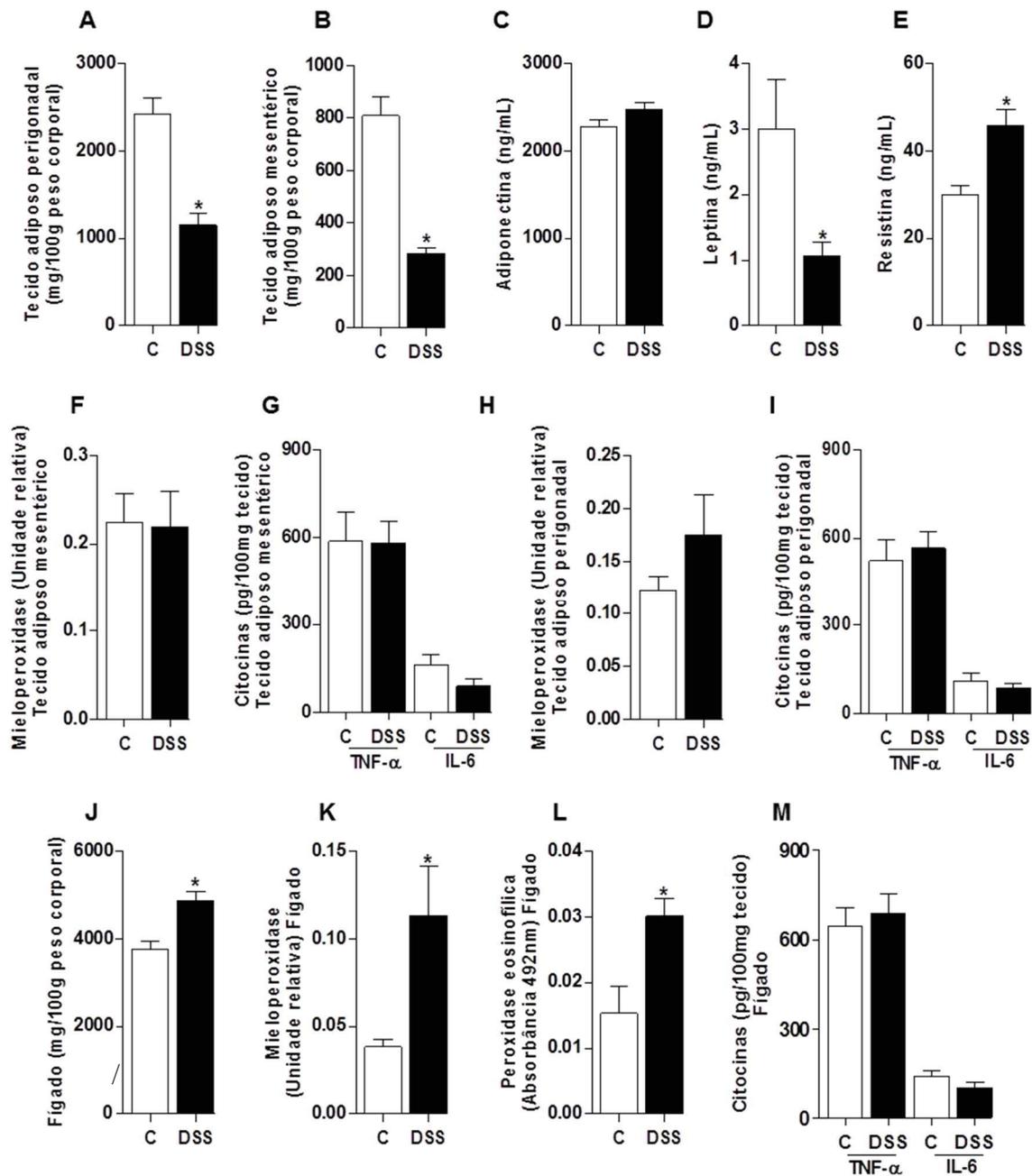


**Figura 5. Avaliação da progressão da doença e análises séricas após cinco ciclos de administração de DSS.** (A) Escore clínico em animais submetidos a cinco ciclos de DSS. (B) Razão peso/comprimento do cólon. (C) Secções de parafina de tecido colônico corados com H&E, X100. Barra = 50µm. Atividades das enzimas (D) Mieloperoxidase e (E) Peroxidase eosinofílica em amostras colônicas na colite crônica. Concentrações séricas de jejum de (F) Glicose, (G) Colesterol total, (H) Triglicérides e (I) Ácidos graxos livres em animais após cinco ciclos de DSS. (J) Teste de tolerância oral à glicose (TOOG - %). Gráfico na região superior direita representa a área sob a curva do gráfico de TOOG. (K) Teste de sensibilidade à insulina (TSI). Gráfico na região superior direita representa a área sob a curva do gráfico de TSI.  $n = 5-10$ . Resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM);  $P < 0,05$ . \*versus controle. C: controle, H<sub>2</sub>O; DSS: colite crônica, cinco ciclos de administração de DSS.

### **Camundongos submetidos à colite crônica mostraram perda de adiposidade e atenuação em diversos parâmetros observados no tecido adiposo e fígado na fase aguda da doença**

Ao final do quinto ciclo de DSS, camundongos com colite apresentaram menor peso dos tecidos adiposos perigonadal e mesentérico comparados ao grupo controle (Figura 6A e B). O grupo DSS não mostrou alteração nas concentrações de adiponectina (Figura 6C), no entanto, as concentrações de leptina reduziram e de resistina aumentaram no soro dos animais que receberam DSS em comparação ao grupo controle (Figura 6D e E, respectivamente). Tais resultados apresentaram-se contrários ao encontrado no modelo experimental de colite aguda. Não foram identificadas no tecido adiposo mesentérico e perigonadal diferenças quanto à atividade da MPO e concentração das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 entre os grupos avaliados (Figura 6F-I).

Camundongos com inflamação colônica persistente mostraram aumento no peso do fígado e nas atividades de MPO e EPO, nesse órgão, quando comparados ao grupo controle (Figura 6J-L), alterações essas não observadas no modelo agudo da doença (dados não mostrados). As concentrações das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 (Figura 6M) e TBARS não foram diferentes entre os grupos avaliados (Tabela 3). Por outro lado, o fígado dos camundongos que receberam DSS apresentaram valores inferiores de glutathiona reduzida em relação ao fígado dos animais do grupo controle. Não foram identificadas diferenças no conteúdo de gordura hepática e de triglicérides no fígado de animais com DSS, apenas redução nos valores de colesterol total quando comparado aos controles (Tabela 3).



**Figura 6. Adipocinas séricas e parâmetros inflamatórios no tecido adiposo e no fígado de camundongos submetidos à colite experimental crônica.** Tecido adiposo (A) Perigonadal e (B) Mesentérico - peso corrigido pelo peso corpóreo (PC). Concentrações séricas de adipocinas avaliadas por meio de ELISA: (C) Adiponectina; (D) Leptina; (E) Resistina. Concentrações de (F) Mieloperoxidase e de citocinas (G) TNF- $\alpha$  e IL-6 no tecido adiposo mesentérico. Concentrações de (H) Mieloperoxidase e de citocinas (I) TNF- $\alpha$  e IL-6 no tecido adiposo perigonadal. (J) Peso do fígado corrigido pelo PC. Concentrações de (K) Mieloperoxidase, (L) Peroxidase eosinofílica e de citocinas (M) TNF- $\alpha$  e IL-6 em amostras hepáticas.  $n = 4-10$ . Resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM);  $P < 0,05$ . \*versus controle. C: controle, H<sub>2</sub>O; DSS: colite crônica, cinco ciclos de administração de DSS.

**Tabela 3.** Análises hepáticas de camundongos submetidos à colite crônica.

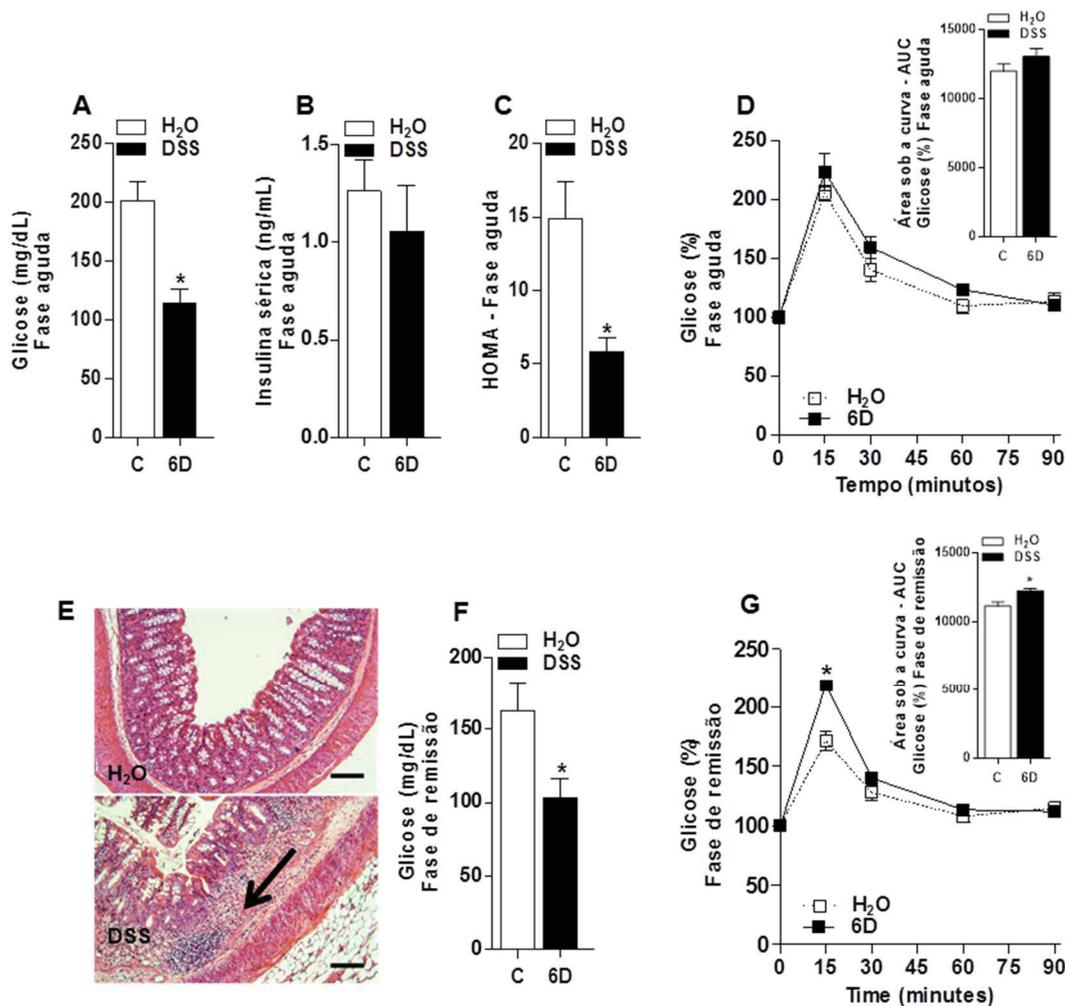
	TBARS	Glutaciona reduzida	Conteúdo de gordura hepática	Colesterol total	Triglicérides
	(mmol/100mg fígado)	(mg/100mg fígado)	(mg/g fígado)	(mmol/g fígado)	
C	17.8±1.4	5.7±0.1	7.7±0.4	169.9±26.4	843.3±12.2
DSS	15.0±1.4	2.9±0.2*	6.6±0.7	100.7±7.5*	795.8±33.4

*n* = 6-8; Resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM); *P*<0,05.  
\*versus controle.

As respostas observadas durante a colite aguda progrediram para um estado de intolerância à glicose e resistência insulínica no modelo experimental de colite crônica, contribuindo para a manutenção e desenvolvimento de alguns distúrbios também observados na síndrome metabólica. Visando identificar se essas alterações estariam presentes nos animais após a interrupção do agente químico, na fase de remissão, sem a necessidade de múltiplos ciclos de DSS, o próximo delineamento experimental baseou-se na administração de apenas um ciclo do agente químico e na análise da tolerância oral à glicose nos animais na fase aguda, após 6 dias de DSS, e na fase de remissão da doença após 14 dias livres de DSS.

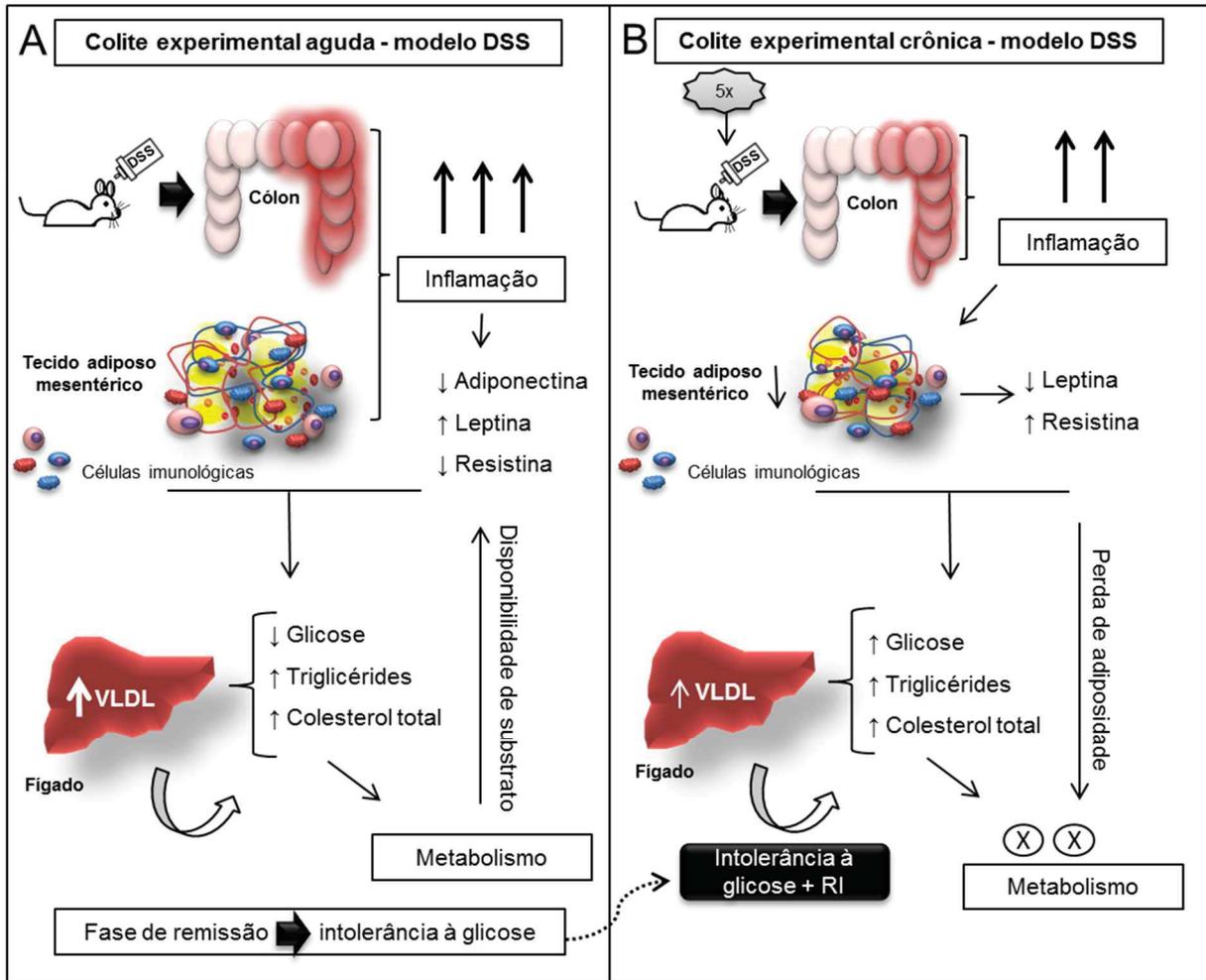
De maneira consistente, após seis dias da administração de DSS, animais com colite aguda demonstraram redução na concentração sérica de glicose, observada na figura 2G e repetida na 7A, em relação ao grupo controle. Essa alteração não é acompanhada de variação na concentração sérica de insulina, ou ainda alteração na tolerância à glicose, em relação aos animais controles (Figura 7A-D). Na verdade, observamos melhor sensibilidade à insulina, avaliada por meio do índice HOMA-IR, Figura 7C, nos animais com colite aguda.

Durante a fase de remissão, um ciclo completo de DSS (seis dias de administração de DSS seguido por intervalo de 14 dias de água pura), apesar de melhora do escore clínico nos animais que receberam DSS, ainda observamos razão peso/comprimento colônico elevada em relação ao grupo controle (dados não mostrados). Infiltrado de células imunológicas também foi observado em corte histológico, conforme apontado por seta, no grupo DSS (Figura 7E). A concentração de glicose de jejum sérica manteve-se reduzida nos animais com DSS em relação aos controles da mesma forma que na fase ativa da doença (Figura 7F). No entanto, de forma contrária ao observado na fase ativa da doença, os animais na fase de remissão apresentaram-se intolerantes à sobrecarga de glicose (Figura 7G).



**Figura 7.** Avaliações da resposta glicêmica no modelo de colite aguda e na fase de remissão em camundongos submetidos a um ciclo de administração de DSS. (A) Glicose e (B) Insulina sérica em camundongos no sexto dia de exposição ao DSS. (C) Índice HOMA-IR. (D) Teste de tolerância oral a glicose em estado de jejum em camundongo com colite aguda, valores em relação à concentração basal (%), região superior direita área sob a curva. (E) Secções de parafina de tecido colônico corados com H&E, X100. Barra = 50µm. (F) Glicemia de jejum em animais na fase de remissão da doença. (G) Teste de tolerância oral a glicose (TTOG - %) na fase de remissão da colite experimental. Gráfico na região superior direita representa a área sob a curva do gráfico de TTOG. *n*: 4-10. Resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM); *P*<0,05. \*versus controle. C: controle, H<sub>2</sub>O; 6D: seis dias de administração de DSS.

A Figura 8, mostra de forma resumida os principais resultados obtidos durante o estudo no modelo de colite aguda e crônica induzida por DSS.



**Figura 8. Resumo das principais adaptações e alterações metabólicas demonstradas durante inflamação colônica aguda e crônica induzida pela administração de DSS.** (A) Durante colite aguda, a intensa inflamação colônica induzida por DSS gera inflamação no tecido adiposo mesentérico e consequentemente alterações nas secreções de adipocinas com redução da adiponectina e resistina e aumento da leptina séricas. Associado a esse quadro, foi observado a presença de outras adaptações metabólicas, como redução nas concentrações séricas de jejum de glicose e aumento nas concentrações de colesterol e triglicérides. Essas modificações promovem maior disponibilidade de substrato à maior necessidade energética ocasionada pela presença da resposta inflamatória. O aumento de lipídio circulante nos animais submetidos à administração de DSS poderia em parte ser proveniente do fígado, via aumento na secreção de moléculas de *very-low-density lipoprotein* - VLDL (?), uma vez que nesses animais o

conteúdo de gordura hepática encontra-se reduzido em relação aos animais não doentes. Na fase de remissão (seis dias de DSS seguidos por 14 dias livres de DSS) as adaptações metabólicas iniciais progridem e os animais já se encontram intolerantes à glicose. Essa alteração poderia então explicar, pelo menos em parte, os distúrbios subsequentes presentes na colite crônica. (B) Durante a colite crônica induzida por DSS, a presença de inflamação persistente de menor grau induz alterações contrárias à fase aguda na secreção de adipocinas, como redução da leptina e aumento da resistina. Observou-se também aumento nas concentrações séricas de jejum de glicose, colesterol total e triglicérides em camundongos com colite crônica, acompanhado por presença de intolerância à glicose e resistência insulínica (RI). Os estímulos persistentes, induzidos por repetidos ciclos de DSS, afetaram negativamente o metabolismo, que mesmo com perda de adiposidade mostram alterações metabólicas que se assemelham em parte a um estado de síndrome metabólica.

## **Discussão**

Nesse trabalho, objetivamos descrever a progressão da resposta inflamatória colônica, em modelo de colite experimental, em associação à evolução das alterações metabólicas. Além disso, buscamos avaliar as possíveis alterações/adaptações presentes no fígado e tecido adiposo, órgãos importantes no controle metabólico, buscando associar a inflamação e o metabolismo no contexto das DIIs. Nossos principais achados foram: (i) a progressão da inflamação induziu o desenvolvimento de um quadro metabólico sistêmico alterado; (ii) a inflamação intestinal em modelo agudo de DSS induziu inflamação no tecido adiposo mesentérico e adaptações no fígado, importantes órgãos de controle metabólico; (iii) o estímulo crônico com DSS induziu alterações metabólicas que se assemelham a um quadro de síndrome metabólica, entretanto, sem aumento de adiposidade.

Já é descrito na literatura que várias doenças crônicas estão associadas à presença de alterações metabólicas importantes, dentre elas a obesidade (Han e Lean, 2016), artrite

(Mcgrath e Young, 2015), lúpus (Wu *et al.*, 2012) e DII (Valentini *et al.*, 2009; Tigas e Tsatsoulis, 2012), entre outras. De fato, a inflamação observada nessas doenças parece contribuir de forma importante para o aumento no risco de distúrbios crônicos secundários (Rungoe *et al.*, 2013; Zhang, J. *et al.*, 2013). Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa demonstrou a presença de alterações metabólicas associadas à modelo experimental de resposta inflamatória aguda articular (Oliveira *et al.*, 2016) e na alergia alimentar (Yamada *et al.*, 2016).

Pacientes com CD apresentam hipertrofia do tecido adiposo mesentérico, que se localiza próximo à região inflamada do intestino. No entanto, não é claro o papel que essa hipertrofia tem na resposta inflamatória da doença (Sheehan *et al.*, 1992; Kredel e Siegmund, 2014). Também já é descrito que existe um perfil diferente na secreção de adipocinas por esse tecido (Barbier *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2006). Pacientes com DII mostraram altas concentrações séricas de resistina, adipocina associada à presença de resistência insulínica, em relação a pacientes controles (Konrad *et al.*, 2007; Valentini *et al.*, 2009). Enquanto as concentrações de leptina foram similares entre os pacientes com DII, na fase ativa e de remissão da doença em relação aos controles; já as concentrações de adiponectina foram encontradas reduzidas tanto na fase ativa quanto inativa da doença (Valentini *et al.*, 2009). No entanto, essas respostas variam de acordo com os trabalhos publicados na literatura e indicam a falta de um perfil único de alterações metabólicas na DII, conforme demonstrado por Karrasch e Schaeffler (2016) em sua revisão literária.

Em modelos experimentais, camundongos submetidos à administração de DSS demonstraram maior presença de células imunológicas infiltradas no tecido adiposo mesentérico, o que poderia contribuir para o aumento na produção e alteração no perfil de secreção de adipocinas e outras citocinas, por esse tecido (Mustain *et al.*, 2013; Olivier *et al.*, 2014). Demonstramos no nosso trabalho aumento nas atividades das enzimas MPO

e EPO, bem como aumento nas concentrações das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 no tecido adiposo mesentérico de animais com colite aguda, resultados não identificados no tecido adiposo perigonadal. A resposta inflamatória aumentada no tecido adiposo mesentérico poderia ser devido a sua proximidade e produção de citocinas e quimiocinas pelo intestino, e, devido ao aumento na permeabilidade intestinal observado nesse modelo experimental. Inclusive existe uma hipótese de que o tecido adiposo mesentérico atuaria como uma segunda barreira de proteção à translocação de microrganismos intestinais (Batra *et al.*, 2012). Em relação à produção e secreção de adipocinas em modelos experimentais, o tecido adiposo mesentérico de ratos submetidos à colite por TNBS demonstrou maior produção de leptina e adiponectina em relação ao grupo controle (Gambero *et al.*, 2007). Oposto ao demonstrado por Olivier e colaboradores (2014), que mostraram redução na concentração plasmática de adiponectina no modelo de colite induzida por 2,4 dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS) e DSS. Resultado similar aos observado no nosso trabalho quando avaliamos a fase aguda da doença. Mostramos também, que na fase aguda, camundongos com colite apresentaram aumento da leptina o que, pode estar relacionado ao seu perfil pró-inflamatório e, conseqüente, participação na a resposta inflamatória à lesão intestinal. De fato, Singh e colaboradores (2013) mostraram que o bloqueio dessa adipocina por meio de antagonista, em camundongos deficientes para a produção de IL-10, que desenvolvem colite de forma espontânea, atenuou resposta inflamatória intestinal. Além disso, animais deficientes para a produção da leptina (camundongos *ob/ob*) ou do seu receptor (camundongos *db/db*) apresentaram atenuação da resposta inflamatória em modelo de colite induzida por TNBS e DSS (Siegmund *et al.*, 2002; Gove *et al.*, 2009).

As alterações metabólicas séricas descritas na literatura, assim como em relação às adipocinas, em pacientes com DII muitas vezes são controversas. Ripollés Piquer e

colaboradores (2006) demonstraram que pacientes na fase ativa da doença apresentam redução da concentração sérica de colesterol e aumento na concentração de triglicerídeos. Sappati Biyyani (2010) também mostraram redução no colesterol total nos pacientes com DII, porém, os pacientes apresentaram alterações diferentes no perfil de triglicerídeos sérico em relação ao gênero dos indivíduos avaliados. Pacientes do gênero masculino com DII mostraram aumento das concentrações de triglicérides, no entanto, em mulheres os valores foram reduzidos em comparação ao grupo controle. Tal fato indica que fatores genéticos e hormonais também podem influenciar as alterações metabólicas observadas.

Em modelo experimental, Karlsson e colaboradores (2008) observaram aumento de triglicerídeos plasmático nos animais que receberam DSS. O que corrobora com nossos resultados, visto que também mostramos aumento nas concentrações séricas de triglicérides e de colesterol total. O aumento dos lipídios séricos, na fase aguda, parece ser devido a maior liberação de lipoproteínas pelo fígado, uma vez que observamos redução da gordura hepática, identificada no escore histológico e na extração de lipídeo total. Esse resultado foi acompanhado por presença de estresse oxidativo no fígado dos camundongos com colite, demonstrado também por Farombil e colaboradores (2016). Além disso, os animais na fase aguda da doença parecem utilizar de forma mais intensa ácidos graxos livres séricos, que apresentaram-se reduzidos no soro dos animais com colite. É possível que essas adaptações metabólicas sejam importantes para a disponibilidade energética necessária no contexto inflamatório da doença. Assim, as reduções da glicose e dos ácidos graxos séricos indicam uma possível utilização eficiente desses substratos. Por outro lado, a maior disponibilidade de lipídios circulantes poderia ajudar a manter o *status* energético do animal durante a fase aguda da colite.

Para melhor entender a menor glicemia durante o desenvolvimento da colite aguda, avaliamos a capacidade absorptiva intestinal dessa molécula e se existiria maior

metabolização da glicose, no cólon dos animais, no contexto da presença de lesão intestinal. Visto que trabalhos publicados nos últimos anos mostram que existe reprogramação metabólica nas células do sistema imunológico, durante resposta inflamatória, cujo principal objetivo seria potencializar a atividade dessas células por meio da maior captação e metabolização de glicose (Alves-Filho e Palsson-Mcdermott, 2016; Loftus e Finlay, 2016). A ingestão alimentar dos animais com colite aguda não alterou entre os grupos avaliados. Além disso, não observamos alteração na expressão de moléculas relacionadas à captação de glicose, como o SGLT1 e GLUT1, no intestino de animais que receberam DSS. Também não observamos diferenças na expressão de moléculas relacionadas à via final da metabolização da glicose, pela glicólise, representada pelas isoformas avaliadas da piruvato quinase, PMK1 e PKM2. Uma limitação nessa análise inclui a avaliação da expressão das enzimas envolvidas na via glicolítica no cólon dos animais e não nas células imunológicas recrutadas ao sítio da lesão. Assim, apesar dessa limitação, interpretamos que não havia comprometimento na captação da glicose ingerida pelos animais e tão pouco utilização demasiada da glicose no sítio da lesão. Dessa forma, partimos do pressuposto que outras adaptações metabólicas poderiam estar ocorrendo. Em seguida, avaliamos a expressão da glicose-6-fosfatase (G6Pase) no fígado dos animais com colite aguda e controle, uma vez que é a enzima responsável pela etapa final para liberação da glicose, para corrente sanguínea, proveniente da glicogenólise e gliconeogênese. Identificamos redução na expressão dessa enzima no fígado dos animais dos grupos que receberam DSS por quatro e seis dias. Por esse motivo, sugere-se que a redução da glicose sérica nos animais com colite possa ser, pelo menos em parte, decorrente da menor liberação de glicose pelo fígado. Além disso, observamos haver redução na expressão das enzimas PKM1 e PKM2, enzimas responsáveis pela via final da glicólise, no fígado desses animais, uma possível adaptação

metabólica que teria como objetivo a disponibilização da glicose para as demais células que precisam dessa molécula como substrato energético rápido. Seguindo o mesmo modelo experimental de colite aguda por DSS, Melgar e colaboradores (2007) também demonstraram que camundongos C57/BL com colite apresentaram adaptações metabólicas como redução da taxa metabólica e das concentrações séricas de glicemia e leptina.

Uma vez que na fase aguda da colite observamos adaptações metabólicas importantes, partimos para a investigação de como se comportaria o metabolismo de animais com estímulo contínuo da inflamação intestinal. Utilizamos para tal o modelo de colite crônica padronizado em nosso trabalho anterior e apresentado no **Capítulo 1** da tese (Silveira *et al.*, 2015) em que animais submetidos à colite crônica receberam cinco ciclos de DSS. Os resultados foram parcialmente diferentes da fase aguda da doença, visto que as adaptações metabólicas iniciais parecem progredir para um quadro de alteração metabólica similar à síndrome metabólica, apesar de perda de adiposidade induzida pela inflamação colônica crônica. Observamos o desenvolvimento de intolerância à glicose e resistência insulínica, que contribuíram para valores séricos aumentados de glicose, colesterol total e triglicérides nos animais com colite. Identificamos também aumento na concentração de resistina e redução da concentração sérica de leptina fatores que poderiam contribuir ainda mais para o aumento da glicemia, visto que a primeira adipocina se correlaciona à resistência insulínica e a leptina é necessária para a correta produção, eliminação e ação da insulina (Koch *et al.*, 2010). Em seguida nos questionamos se as alterações metabólicas, em relação à via da glicose, se iniciariam em momento tardio, mas com a administração de apenas um ciclo de DSS sem a necessidade de múltiplos estímulos inflamatórios. E, então, avaliamos a resposta glicêmica dos animais na fase de remissão da doença, após a remoção do estímulo inflamatório por 14

dias. E como resultado final, mostramos que o desenvolvimento de intolerância à glicose, observado no modelo experimental de colite crônica, inicia-se após a conclusão de apenas um ciclo de DSS (14 dias da remoção do agente químico) e culmina na perda da capacidade que o organismo tem em manter as concentrações séricas da glicose em valores similares ao grupo controle na inflamação persistente.

Melgar e colaboradores (2007), demonstraram que camundongos C57/BL com colite crônica apresentaram redução da taxa metabólica e das concentrações de glicemia e leptina, resultado similar ao que os autores demonstraram, no mesmo trabalho, na colite aguda. Acreditamos que a diferença entre nossos resultados de glicemia na fase crônica se deva a concentração e período de administração de DSS e a linhagem de animais utilizados entre os trabalhos, visto que Melgar e colaboradores (2007) consideraram como crônico a administração de apenas um ciclo de DSS. Consideração baseada em trabalho anterior, desse mesmo grupo de pesquisadores, que demonstraram que animais C57/BL progridem para inflamação crônica com a administração de apenas um ciclo de DSS, fato não observado em animais da linhagem BALB/c (Melgar *et al.*, 2005).

## **Conclusão**

Demonstramos, em modelo experimental de colite induzida por DSS, os vários estágios da progressão das alterações metabólicas, que incluíram a inflamação colônica aguda e crônica e a fase de remissão de doença. Nessa abordagem mimetizamos nos modelos experimentais, utilizados no trabalho, distúrbios observados em pacientes com DII. As adaptações metabólicas séricas iniciais, no intestino, tecido adiposo e fígado, induzidas no modelo de inflamação aguda, demonstram demanda energética diferenciada provavelmente induzida pela inflamação colônica intensa. Já numa fase mais tardia da doença observamos a progressão para alteração metabólica, semelhante a quadro de

síndrome metabólica, com aumento nas concentrações séricas de glicose, colesterol total e triglicérides associado à presença de intolerância à glicose e resistência à insulina, apesar da perda de adiposidade pelos animais que receberam DSS. Alterações essas que poderiam justificar o aumento no risco para o desenvolvimento de outras doenças crônicas secundárias em pacientes com DII.

### 4.3 Capítulo 3 - Papel da leptina na inflamação intestinal experimental

Devido às alterações nas concentrações de adipocinas em pacientes com DII e em animais submetidos à inflamação intestinal experimental, o papel dessas moléculas na resposta inflamatória intestinal vem sendo estudado nos últimos anos. Animais deficientes para a síntese da leptina, adipocina com característica pró-inflamatória, ou do seu receptor (camundongos *ob/ob* e *db/db*, respectivamente) demonstraram redução da resposta inflamatória na colite experimental induzida por TNBS e DSS (Siegmund *et al.*, 2002; Gove *et al.*, 2009). No entanto, na inflamação intestinal induzida por agentes infecciosos, a ausência da leptina ou da sua sinalização piorou o quadro inflamatório e infeccioso (Madan *et al.*, 2014). Além disso, o uso da leptina no modelo de mucosite experimental, outro tipo de inflamação que acomete o TGI induzida por agente quimioterápico, exerceu efeito benéfico (Sukhotnik *et al.*, 2009). O papel controverso dessa molécula na inflamação intestinal experimental demonstra ainda a necessidade de investigar melhor a leptina na inflamação intestinal, em diferentes modelos experimentais de inflamação intestinal, por exemplo, colite e mucosite, bem como sua relação com as alterações metabólicas observadas na colite experimental. No nosso trabalho, conforme observamos no **Capítulo 2**, obtivemos resposta distinta no que se refere às concentrações de leptina sérica, uma importante adipocina com características inflamatórias, no modelo de colite aguda e crônica. Animais na fase aguda da colite apresentaram aumento na concentração de leptina, ao passo que na colite crônica houve redução em suas concentrações apesar de ainda haver inflamação intestinal, acompanhado por menor massa adiposa. Dessa forma, para entendermos melhor papel da leptina nas alterações inflamatórias e metabólicas na inflamação intestinal experimental, investigamos o efeito

da ausência de sua sinalização em dois modelos de inflamação intestinal, na colite e na mucosite experimental.

## **Introdução**

A incidência e prevalência das Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), doença de Crohn (*Crohn's disease* - CD) e colite ulcerativa (*Ulcerative Colitis* - UC), estão aumentando mundialmente (Ananthakrishnan, 2015). A CD pode acometer qualquer porção do trato gastrointestinal enquanto a UC acomete o intestino grosso (Bischoff *et al.*, 1996; Strober *et al.*, 2002). Essas doenças são crônicas e caracterizadas por intenso infiltrado de células imunológicas no trato gastrointestinal e, conseqüentemente, aumento na produção de mediadores inflamatórios, como citocinas (Strober *et al.*, 2002; Lampinen *et al.*, 2008). Já a mucosite, outro tipo de inflamação que acomete o trato gastrointestinal, aparece como efeito colateral ao tratamento contra o câncer. Cerca de 40 a 80% nos indivíduos submetidos à radioterapia e/ou quimioterapia apresentam essa resposta inflamatória e estão clinicamente associados à pior prognóstico, visto que as doses e o tratamento contra o câncer são reduzidos ou adiados, contribuindo para aumento da letalidade nesse grupo de indivíduos (Lalla *et al.*, 2008; Van Vliet *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de inflamação no trato gastrointestinal leva a alterações metabólicas e inflamatórias sistêmicas importantes e aumento na incidência de outras doenças crônicas secundárias como as doenças cardiovasculares (Van Leuven *et al.*, 2007; Rungoe *et al.*, 2013; Theocharidou *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2015). Uma dessas alterações é a alteração na concentração circulante de adipocinas, moléculas produzidas principalmente pelo tecido adiposo, dentre elas leptina, adiponectina e resistina (Barbier *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2006; Dawiskiba *et al.*, 2014; Waluga *et al.*, 2014). A leptina foi

inicialmente descrita como hormônio, produto do gene obeso (*obese - ob*), produzido principalmente pelo tecido adiposo branco, que agiria no sistema nervoso central controlando o apetite (Zhang *et al.*, 1994). Estudos posteriores demonstraram que a ausência de leptina induz mais do que apenas obesidade, mas também função reprodutiva anormal (Perez-Perez *et al.*, 2015); imunidade deficiente de células T (Lord *et al.*, 1998) e alteração na hematopoese (Bennett *et al.*, 1996).

No contexto das DII, o uso de antagonista de leptina em camundongos deficientes para a produção de IL10, que desenvolvem colite crônica espontaneamente, mostrou melhora da resposta inflamatória (Singh *et al.*, 2013). Além disso, a leptina é considerada mediador da inflamação intestinal em camundongos durante colite induzida por sulfato de sódio dextrana (*dextran sulfate sodium - DSS*) e por 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), visto que camundongos *ob/ob* (animais deficientes para o gene da leptina) demonstraram atenuação da inflamação intestinal (Siegmund *et al.*, 2002). De forma interessante, em outro contexto de inflamação intestinal experimental, na mucosite, o uso da leptina *in vivo* demonstrou melhora da recuperação intestinal e aumentou a renovação do enterócito (Sukhotnik *et al.*, 2009), demonstrando o seu uso como potencial estratégia terapêutica a ser investigada.

O objetivo desse estudo foi avaliar o papel da sinalização da leptina na resposta inflamatória e metabólica em modelo de inflamação intestinal aguda, que incluiu a colite induzida por DSS e a mucosite induzida pelo quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU). Nossos resultados mostraram que camundongos *db/db*, deficientes no receptor da leptina, com colite aguda são protegidos contra inflamação intestinal e letalidade induzida por DSS. Além disso, camundongos *db/db* apresentaram alterações metabólicas séricas basais, aumento de glicemia e colesterol total, como consequência da obesidade induzida pela elevada ingestão alimentar por esses animais, em relação aos animais selvagens, que

não foi alterada pela administração de DSS. Além disso, não foi observada inflamação no tecido adiposo ou fígado de camundongos *db/db* em comparação a seus controles e a camundongos selvagens. Na mucosite, a ausência da sinalização da leptina reduziu parâmetros clínicos e inflamatórios nos animais que receberam 5-FU, mas ainda assim, não foram suficientemente eficazes para a proteção contra a letalidade observada em nosso trabalho.

## **Materiais e métodos**

### ***Animais utilizados***

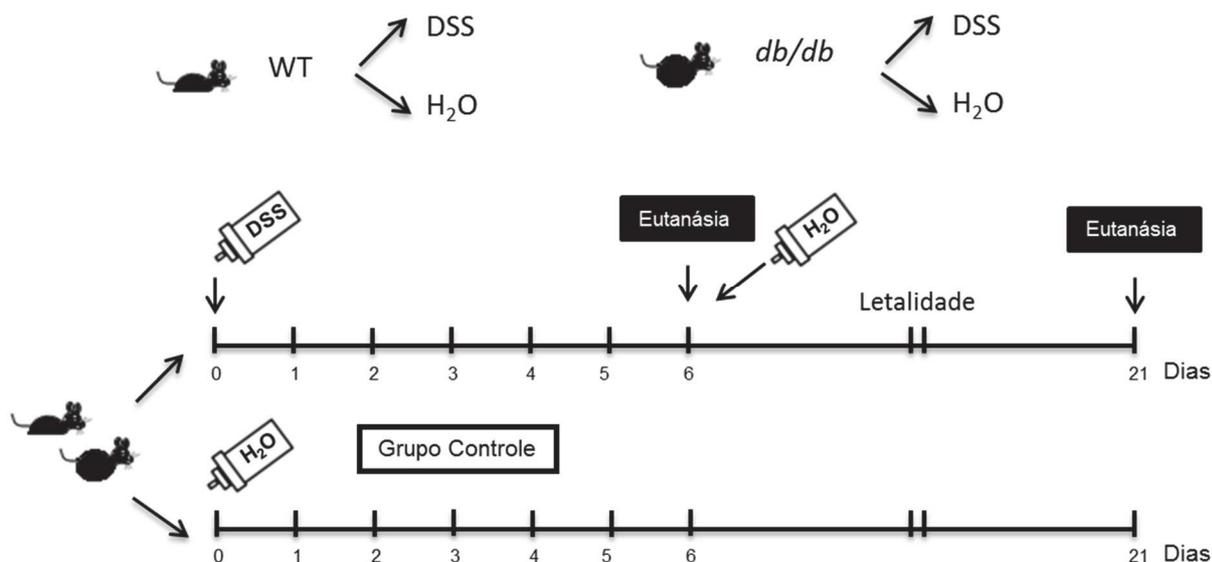
Camundongos C57BL/6 (*wild-type* - WT) e deficiente para o receptor de leptina (*db/db*) fêmeas, 8-10 semanas de idade (peso wt: 20-24 g; *db/db* 35-45 g), foram obtidos do biotério do Departamento de Fisiologia e Imunofarmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os animais foram mantidos no laboratório de Imunofarmacologia/ICB, sob condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG) protocolo 296/2012.

### ***Modelo de colite aguda experimental***

Os camundongos com colite aguda receberam DSS (36,000–50,000 kDa; MP Biomedicals, Solon, OH, USA) a 2,5% (peso/volume) na água de beber *ad libitum* por seis dias e foram submetidos à eutanásia. Os animais controles receberam água filtrada durante todo o delineamento experimental (grupo controle, H<sub>2</sub>O - água). Ao término do protocolo experimental os animais foram submetidos à eutanásia realizada por meio de sobredose de anestésico (cetamina/xilazina), e em seguida, as amostras de tecidos foram

coletadas e armazenadas para posteriores análises. Nos experimentos de letalidade, após o período de indução da colite com o DSS e remoção do agente químico, os camundongos foram acompanhados por mais 15 dias (totalizando 21 dias de acompanhamento) com a finalidade da observação das taxas de letalidade ocasionadas pela doença. Conforme pode ser visualizado na Figura 9 o delineamento experimental.



**Figura 9. Delineamento experimental II.** Animais *wild type* (selvagens) e *db/db* (deficientes para o receptor de leptina) foram inicialmente divididos em dois grupos: DSS (administração de 2,5% de DSS na água de beber), H<sub>2</sub>O (água - controle). Após o término da indução da colite aguda experimental os animais foram submetidos à eutanásia, ou, para a avaliação da taxa de sobrevivência foram acompanhados por 15 dias após a substituição do DSS por água pura no dia 6, o que totaliza 21 dias de acompanhamento dos animais.

### ***Avaliação do escore clínico e progressão da colite experimental***

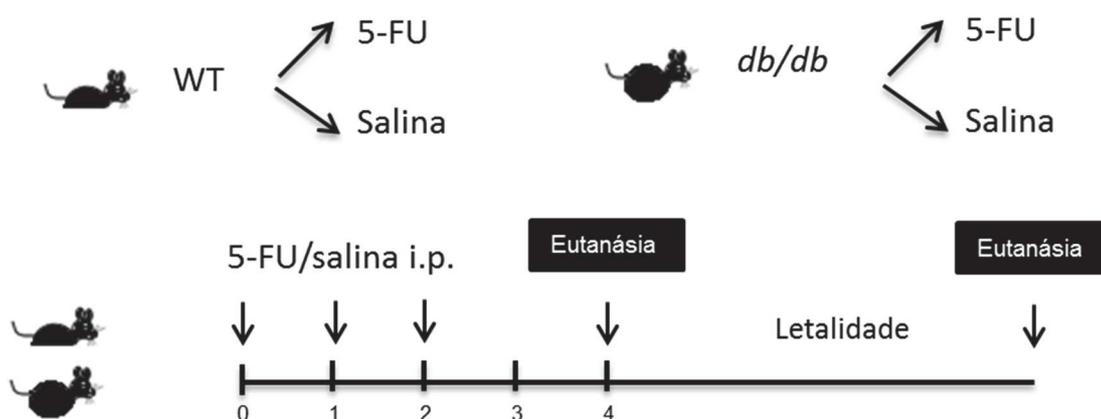
Durante a colite aguda, os camundongos foram pesados a cada dois dias e o escore clínico avaliado. O peso dos animais foi representado como percentual em relação ao peso inicial. Para a avaliação dos sinais clínicos, os animais foram colocados individualmente em gaiolas, por cerca de 10 minutos para a coleta das fezes e análise da consistência e presença de sangue oculto e/ou muco. Para a análise da presença de sangue oculto, as

fezes foram coletadas e maceradas em cartelas Hexagon OBScreen (Human Diagnostic, Wiesbaden, Alemanha). A quantificação numérica dos sinais clínicos foi feita de forma individual (cada animal possuía uma identificação) seguindo as seguintes características e pontuações: 0 = fezes normais e ausência de sangue, 1 = fezes normais e traços de sangue no teste de sangue oculto, 2 = fezes de consistência cremosa e teste positivo para presença de sangue oculto, 3 = fezes de consistência pastosa e teste positivo para presença de sangue oculto, 4 = fezes líquidas e teste positivo para presença de sangue oculto, 5 = fezes líquidas e moderado sangramento retal, 6 = fezes líquidas e intenso sangramento retal, 7 = diarreia e hemorragia, 8 = diarreia, hemorragia e sinais gerais de morbidade incluindo postura encurvada e piloereção (Vieira *et al.*, 2009).

#### ***Modelo de indução de mucosite experimental, avaliação do escore clínico e progressão da doença***

Para a indução de mucosite aguda experimental, animais receberam três doses de 150 mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal, do quimioterápico *5-fluorouracil* (5-FU). O grupo controle recebeu salina pela mesma via de administração. Os animais foram submetidos à eutanásia dois dias após a última administração do fármaco. Para a avaliação da progressão da doença o peso dos animais foi aferido diariamente e o escore clínico avaliado no primeiro e no último dia do protocolo experimental. O peso foi apresentado como peso relativo em relação ao peso inicial. O escore clínico avaliou os seguintes parâmetros: 0 = fezes normais, 1 = fezes pastosas, 2 = fezes líquidas; 0 = ausência de sangue oculto, 1 = traços de sangue oculto, 2 = sangue oculto presente; 0 = perda de até 5% do peso corporal, 1 = perda de até 10% do peso corporal, 2 = perda de até 15% do peso corporal, 3 = perda de até 20% do peso corporal, 4 = perda de peso corporal superior a 20%; 0 = sem sinais de morbidade, 1 = pelos arrepiados, 2 = pelos arrepiados e postura

arqueada, 3 = pelos arrepiados, postura arqueada e inatividade. O escore clínico final abrangeu a somatória de todos os parâmetros, cujo valor máximo atinge a pontuação de 11. Nos experimentos de sobrevivência, após o período de indução da mucosite com o 5-FU, os camundongos foram acompanhados até letalidade ou submetidos à eutanásia após perda de peso igual a 30% em relação ao peso inicial de administração do fármaco. Conforme pode ser observado no delineamento experimental (Figura 10).



**Figura 10. Delineamento experimental III.** Animais *wild type* (selvagens) e *db/db* (deficientes para o receptor de leptina) foram inicialmente divididos em dois grupos: 5-FU (administração intraperitoneal - i.p. de 5-FU → 150 mg/kg de peso corporal, grupo mucosite) e salina (administração i.p. de salina → grupo controle). Os animais foram submetidos à eutanásia dois dias após o término da indução da mucosite experimental, dia quatro ou, para a avaliação da taxa de sobrevivência foram acompanhados até letalidade ou foram submetidos à eutanásia se perda de peso igual ou superior a 30% do peso inicial.

### ***Dieta utilizada durante os delineamentos experimentais***

A dieta comercial utilizada no biotério foi substituída pela dieta padrão AIN-93M, padronizada por Reeves e colaboradores (1993), duas semanas anteriores à indução de colite ou mucosite aguda. Essa mesma dieta foi utilizada como dieta controle para todos os experimentos realizados nesse trabalho. Os ingredientes da dieta padrão podem ser visualizados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição da dieta experimental - uso em animais com idade superior a seis semanas.

<b>Ingredientes</b>	<b>Dieta padrão* (g/kg dieta)</b>
Amido de milho	465,692
Caseína	140,000
Amido dextrinizado	155,000
Sacarose	100,000
Óleo de soja	40,000
Celulose	50,000
Mix mineral (AIN-93M)	35,000
Mix de vitaminas (AIN-93)	10,000
L-Cistina	1,800
Bitartrato de colina	2,500
BHT	0,008

\*AIN-93M dieta formulada para a manutenção de roedores adultos (Reeves *et al.*, 1993).

### ***Análises histopatológicas do cólon e intestino delgado***

Para a confecção das lâminas histológicas, nos animais submetidos à colite experimental, removeu-se uma porção proximal do cólon de cada animal, logo após a eutanásia. Já nos animais submetidos à mucosite experimental, dividiu-se o intestino delgado em três partes iguais e uma porção de cada parte foi utilizada para a realização desse procedimento. Inicialmente as porções de cólon e de intestinos delgados coletados foram fixados em Bouin (solução saturada de ácido pícrico 750 mL+formol 37% 250 mL+2% de ácido acético) e enrolados em formato de rocambole. Após tempo mínimo de fixação (48 horas), os tecidos foram submetidos a etapas de desidratação, diafanização em xilol, banho e inclusão em parafina. Em seguida, foram realizados cortes em micrótomo e as lâminas coradas com H&E. Os cortes foram examinados ao microscópio óptico (x100) por patologista (análise cega) e pontuados de acordo a presença de inflamação (nenhuma: 0, sutil: 1, moderada: 2, grave: 3); presença de lesão (nenhuma: 0; mucosa: 1; mucosa e submucosa: 2 transmural: 3); danos nas criptas/vilosidades (nenhum: 0; basal 1/3: 1; basal 2/3: 2; apenas superfície: 3; perda de cripta/vilosidades e

epitelial: 4); percentual de acometimento tecidual (1-25%: 0; 26-50%: 1; 51-75%: 2; 76-100%: 4). Após as análises, os escores foram somados e valores de escores aumentados progressivamente indicam maior lesão e inflamação no órgão. Os cortes histológicos foram fotografados como parâmetro de comparação entre os grupos avaliados.

### ***Avaliação de parâmetros inflamatórios***

#### *Quantificação da infiltração de neutrófilos no tecido por meio da avaliação da atividade da mieloperoxidase - MPO*

A quantificação indireta do acúmulo de neutrófilos no cólon, nas três porções do intestino delgado, no tecido adiposo e no fígado foi realizada pelos ensaios de atividade da MPO (Souza *et al.*, 2002). Os fragmentos dos órgãos dos animais submetidos à colite ou mucosite experimental e dos seus controles foram removidos e congelados a -20°C, até o dia da homogeneização do tecido. Após o descongelamento do tecido, este foi homogeneizado em tampão (0,1 M NaCl; 0,02 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 0,015 M NaEDTA - pH 4,7) na proporção de 1,9 mL de tampão para cada 100mg de tecido, utilizando-se o homogeneizador de tecidos (PowerGen 125® - Fisher Scientific Pennsylvania, USA). Após esse procedimento, o homogenato foi centrifugado a 10000 rpm/15 minutos a 4°C (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA) e o precipitado foi submetido à lise hipotônica (1,5 mL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5% - 30s após). Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuscitado em tampão 2 (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M; *Hexadecyl trimethyl ammonium bromide* - HTAB - Sigma 0,5% p/v - pH 5,4) na proporção de 1,9 mL para cada 100 mg de tecido. Após essa etapa, o homogenato foi submetido a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas a 10000 rpm/15 minutos e foi recolhido o sobrenadante para a

realização do ensaio. As amostras foram diluídas no tampão 2 de acordo com o tecido a ser quantificada a enzima e o modelo experimental avaliado. A atividade da mieloperoxidase foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450nm utilizando a reação entre *tetramethylbenzidine* diluído em dimetilsufóxido (1,6 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM). A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M, e a leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). Os resultados obtidos foram expressos como unidade relativa, de acordo com curva padrão do número de neutrófilos versus OD que foi obtida pelo processamento de neutrófilos purificados (> 95% pureza) e utilizado para a medida de atividade da mieloperoxidase, padronização que havia sido realizada anteriormente no laboratório (Souza *et al.*, 2002).

#### *Quantificação do infiltrado de eosinófilos no tecido por meio da avaliação da atividade da peroxidase eosinofílica - EPO*

A quantificação da atividade EPO no cólon, nas três porções do intestino delgado, no tecido adiposo e no fígado, foi utilizada como maneira indireta de estimar a presença de eosinófilos nesses órgãos. Amostras dos tecidos dos animais submetido à eutanásia foi homogeneizada utilizando-se o homogeneizador de tecidos (PowerGen 125® - Fisher Scientific Pennsylvania, USA) com PBS 5X (phosphate-buffered saline pH=7,2) na proporção 1,9 mL em 100 mg de tecido, em seguida o tecido foi centrifugado a 10000 rpm/10 minutos (12.000 g) e o sobrenadante foi posteriormente desprezado. O sedimento foi sujeito à lise hipotônica por adição de 1,5 mL (em 100 mg de tecido) de salina NaCl 0,2%, seguido pela adição de 1,5 mL da preparação com salina 1,6% e glicose 5,0%. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 10000 rpm/10 minutos, e o sobrenadante foi novamente desprezado e ao sedimento acrescido 1,9 mL de PBS (pH 7,4), contendo

HTAB 0,5%. Essa solução foi novamente homogeneizada, e o homogenato submetido ao processo de congelamento e descongelamento, por três vezes, em nitrogênio líquido e centrifugado a 10000 rpm/15 minutos. Apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificação da enzima. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, 75 µL de amostra (sem diluição) ou branco (PBS) foi incubada com 75 µL de substrato (1,5 mM de o-fenilenodiamina, OPD em tampão Tris-HCl - 0,075 mM – pH=8 suplementado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6,6 mM) por poço. A placa foi incubada no escuro por aproximadamente 30 minutos, e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M, a leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 492 nm. Este ensaio foi conduzido como descrito anteriormente por Strath et al., (1985) (Strath *et al.*, 1985).

#### *Determinação das concentrações de adipocinas e outras citocinas - ensaio imunoenzimático/ELISA*

No soro adiponectina, leptina e resistina (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) foram avaliadas. As citocinas fator TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram avaliadas em amostras do cólon (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Para a quantificação de citocinas, amostras dos tecidos foram homogeneizadas em solução tampão de fosfato (PBS) (0,4 M NaCl e 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) contendo inibidor de proteases (0,1mM *phenylmethilsulfonyl fluoride*, 0,1 mM *benzethonium chloride*, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween 20, na proporção de 0,1 g de tecido para cada mL de solução; foi utilizado homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fischer Scientific Pennsylvania, USA). As amostras foram mantidas a -20°C para posterior realização do ensaio enzimático. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As placas foram sensibilizadas com 100 µL/poço de solução dos respectivos anticorpos

monoclonal anti-camundongo para as citocinas a serem analisadas e incubadas a 4°C *overnight*. Após três lavagens (300 µL/poço - Bio-Tek Instruments, INC) com PBS-Tween 20X (0,05% - pH=7,4); adicionou-se às placas 200 µL por poço de tampão bloqueio (1% albumina bovina-BSA em PBS pH=7,4) e estas foram, então, incubadas a temperatura ambiente por no mínimo uma hora. Após nova etapa de lavagem, adicionou-se 100 µL/poço dos padrões (500-1000 pg/mL) e das amostras diluídas (diluição varia de acordo com a citocina a ser quantificada e a amostra utilizada) em BSA-PBS (0,1% - pH=7,4) e prosseguiu-se nova incubação a 4°C *overnight* ou por no mínimo de duas horas. Após lavagem das placas, adicionou-se 100 µL/poço de solução de anticorpo de detecção anti-camundongo para as citocinas em questão e incubaram-se as placas por duas horas. Após nova lavagem, adicionou-se 100 µL/poço de solução de estreptavidina (50 µL de estreptavidina em 10 mL de solução BSA 0,1%) e incubou-se por 30 minutos após esse intervalo de tempo foi adicionado 100 µL/poço do substrato OPD (o-fenilenodiamina, Sigma) diluído em tampão citrato (pH=5,0) acrescido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30v/v). As placas foram incubadas ao abrigo da luz por 30 minutos ou até que a reação ocorresse. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm (Status - labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). Todos os passos de incubação (exceto *overnight*) foram feitos à temperatura ambiente.

#### *Contagem de células totais e diferenciais*

Anteriormente a eutanásia, sangue da veia da cauda foi coletado e acrescido à solução de TURK (Renylab Química e Farmacêutica, Rodovia Barbacena, MG, Brasil) a fim da realização da contagem dos leucócitos totais sanguíneo na câmara de Neubauer, e outra amostra coletada para a confecção de esfregaço sanguíneo. Os esfregaços foram

corados por meio de kits de rápida coloração em hematologia (Panótico Rápido - Laborclin, Pinhais, PR, Brasil) e em seguida utilizados para a contagem de células diferenciais (células mono e polimorfonucleares) em microscópio ótico no aumento de 1000X, sob imersão de óleo. Critérios de padrão morfológicos foram utilizados para a quantificação das células.

### ***Parâmetros metabólicos séricos avaliados***

Glicose, colesterol total e triglicérides de jejum (4 horas) foram quantificados no soro dos animais por meio de kits enzimáticos conforme orientação fornecida pelo fabricante (Katal, Belo Horizonte, MG, Brasil).

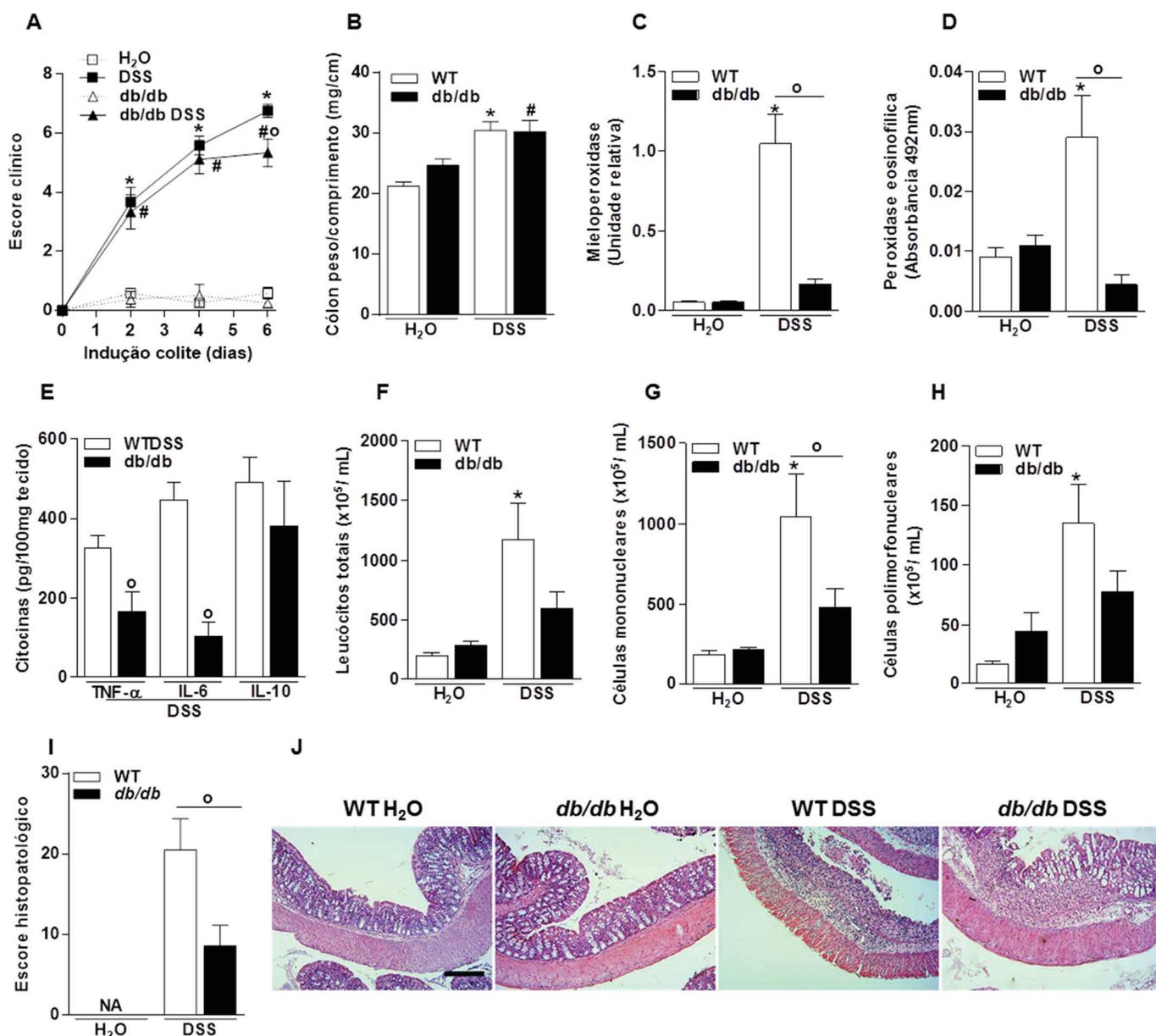
### ***Análises estatísticas***

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para a análise de mais de dois grupos, com distribuição paramétrica e dois fatores, linhagem e tratamento, two way ANOVA seguida de pós-teste Bonferroni foi utilizado. Nas avaliações entre dois grupos o teste t de *student* foi utilizado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se  $P < 0,05$  e os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para as curvas de sobrevivência, as diferenças entre os grupos foram comparadas usando o teste log-rank test. As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software Inc -San Diego, CA, USA).

## Resultados

### Ausência na sinalização da leptina atenua a resposta inflamatória da colite aguda

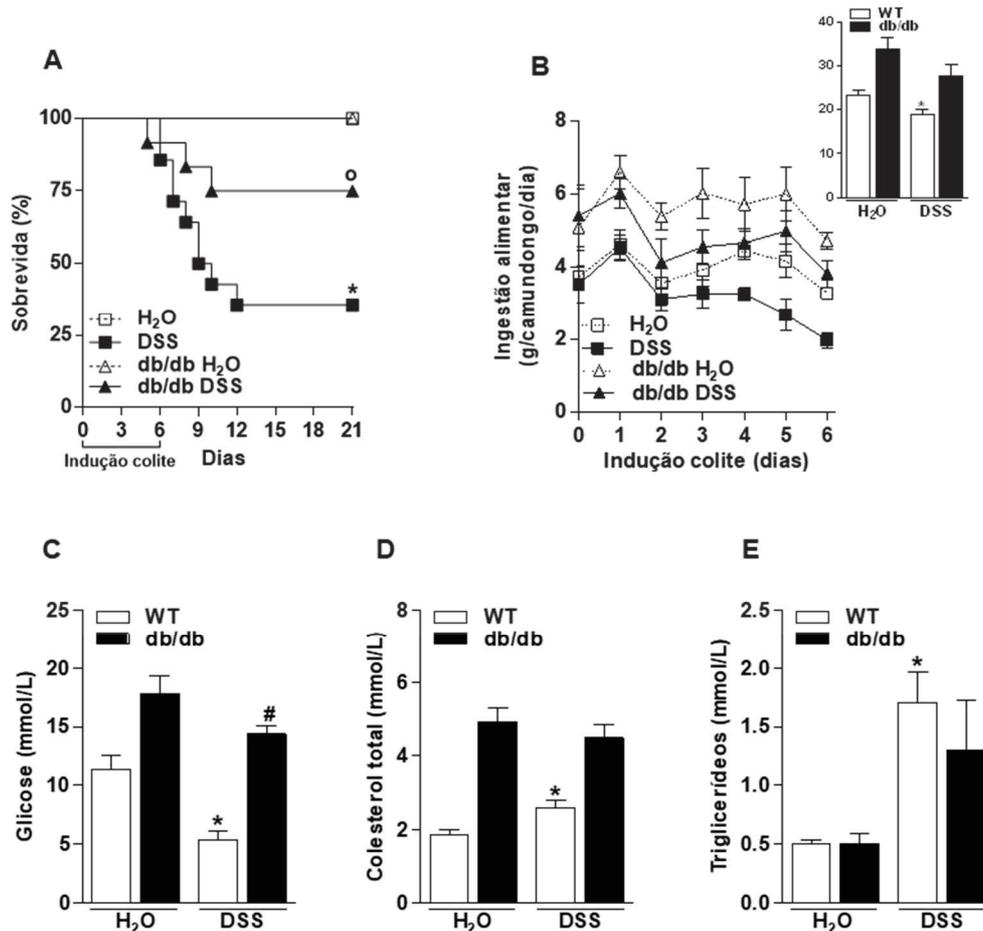
Animais com colite aguda apresentaram aumento no escore clínico e na razão peso/comprimento do cólon em relação aos seus respectivos controles. Os animais deficientes para o receptor de leptina (*db/db*) apresentaram aumento, no entanto, inferior ao observado nos animais selvagens (WT) em relação ao escore clínico (Figura 11A e B). Animais WT apresentaram aumento nas concentrações de MPO e EPO, em amostras colônicas, em relação ao grupo controle, todavia, essa alteração não foi observada nos animais *db/db* DSS (Figura 11C e D, respectivamente). A produção de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6, no cólon de animais submetidos à administração de DSS, encontrou-se superior nos animais selvagens em relação aos animais *db/db* (Figura 11E). Os leucócitos totais, células mono e polimorfonucleares mostraram-se aumentados em amostras de sangue nos animais WT que receberam DSS, em relação ao seu controle; alteração não observada nos animais deficientes no receptor da leptina (Figura 11F-H). Animais selvagens apresentam aumento no escore histopatológico em relação ao grupo controle, assim como animais *db/db*, no entanto, esse aumento é inferior em relação aos animais WT (Figura 11I). A menor lesão intestinal nos animais *db/db* pode ser visualizado pelo gráfico, mas também pelos cortes histopatológicos, visto que animais deficientes para a produção de leptina mostram maior manutenção da estrutura colônica e menor recrutamento de células imunológicas, quando comparados aos animais WT (Figura 11J).



**Figura 11. Avaliação da resposta inflamatória induzida pela administração aguda de DSS em animais selvagens e deficientes para o receptor de leptina.** (A) Escore clínico durante indução de colite aguda. Razão (B) peso/comprimento colônico. Atividades das enzimas: (C) Mieloperoxidase, (D) Peroxidase eosinofílica e concentração de (E) citocinas em amostras de cólon de animais submetidos à colite induzida por DSS. Contagem de células sanguíneas: (F) Leucócitos totais, (G) Células mononucleares, (H) Células polimorfonucleares. (I) Escore histopatológico de lâminas histológicas de tecido colônico. (J) Secções de parafina de tecido colônico corados com H&E, X100. Barra = 50  $\mu$ m Grupos: WT - animais selvagens; db/db - animais deficientes para receptor de leptina; H<sub>2</sub>O - animais controles; DSS - submetidos a administração de DSS.  $n = 7-12$ . Resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM);  $P < 0,05$ . \*versus controle, # versus db/db, <sup>o</sup> versus WTDSS.

### **Animais deficientes para o receptor da leptina apresentaram-se protegidos contra a letalidade induzida pela colite modelo experimental**

Animais WT que receberam DSS apresentaram elevada taxa de letalidade e essa letalidade foi reduzida em animais deficientes para o receptor de leptina (Figura 12A). Animais WT apresentaram redução na ingestão alimentar e nas concentrações de glicose em relação ao seu respectivo grupo controle, já animais *db/db* com DSS não mostraram redução da ingestão em relação ao grupo controle. A glicemia nos animais *db/db* submetidos à colite reduziu em relação ao *db/db* controle (Figura 12B e C). Os valores de colesterol total e triglicérides mostraram-se elevados em animais selvagens submetidos ao tratamento com DSS em relação ao grupo controle, no entanto, essa alteração não foi observada em animais deficientes para o receptor de leptina (Figura 12D e E).

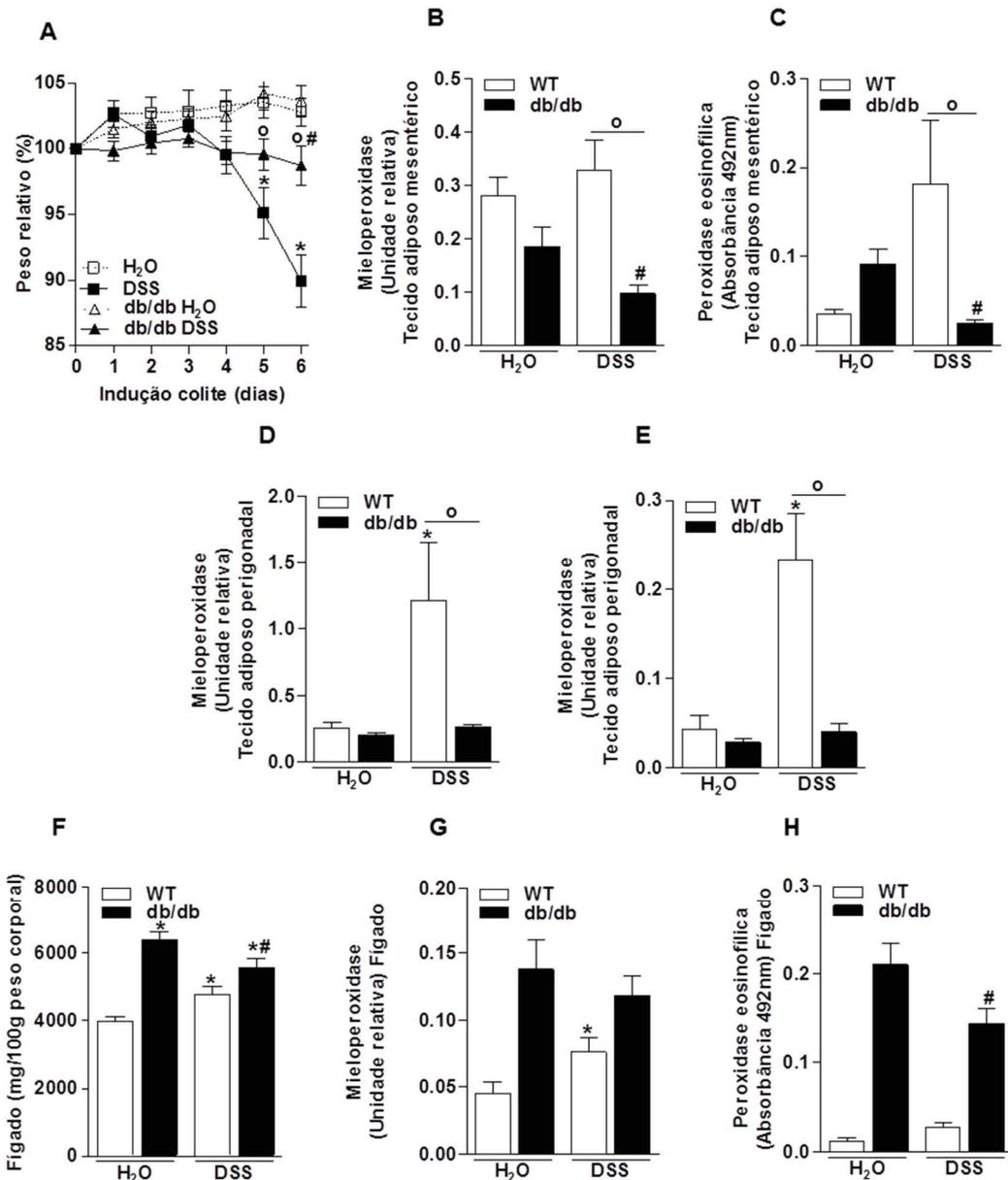


**Figura 12.** Curva de sobrevivência, ingestão alimentar e alterações metabólicas em animais selvagens e deficientes para receptor de leptina. (A) Curva de sobrevivência. (B) Ingestão alimentar - região superior - Área sob a curva. Concentrações séricas de (C) Glicose, (D) Colesterol total e (E) Triglicérides. Grupos: WT - animais selvagens; *db/db* - animais deficientes para receptor de leptina; H<sub>2</sub>O - animais controles; DSS - submetidos a administração de DSS. *n* = 6-12. Resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM); *P* < 0,05. \*versus controle, # versus *db/db*, <sup>o</sup> versus WT DSS.

### **Animais deficientes para o receptor de leptina mostraram redução na perda de peso e na inflamação do tecido adiposo induzida pela colite aguda**

Animais WT, ao receberem DSS, mostraram importante perda de peso em relação ao peso inicial e ao grupo controle. Em animais *db/db* com DSS essa perda de peso foi amenizada em comparação ao grupo controle e ao grupo WT DSS (Figura 13A). Animais WT com DSS mostraram aumento de EPO no tecido adiposo mesentérico e de MPO e

EPO no tecido adiposo perigonadal em relação ao grupo controle (Figura 13C-E). Em contrapartida, animais deficientes para o receptor de leptina com DSS mostraram redução nas concentrações de MPO e EPO no tecido adiposo mesentérico, em relação ao seu controle (Figura 13B e C). Nenhuma diferença nas concentrações de MPO e EPO no tecido adiposo perigonadal foi mostrada entre os grupos *db/db*. Animais WT com colite apresentaram aumento no peso do fígado ao serem submetidos ao tratamento com DSS, no entanto, animais deficientes para o receptor de leptina, ao receberem esse agente químico, apresentaram redução no peso do fígado em relação ao seu controle (Figura 13F). As concentrações de MPO, no fígado de animais WT DSS, encontraram-se elevadas em relação ao controle, alteração não encontrada em animais *db/db* (Figura 13G). No fígado dos animais WT a EPO não foi alterada. No entanto, animais deficientes para o receptor de leptina apresentaram redução em seus valores nos animais com colite em relação aos animais sem colite (Figura 13H).



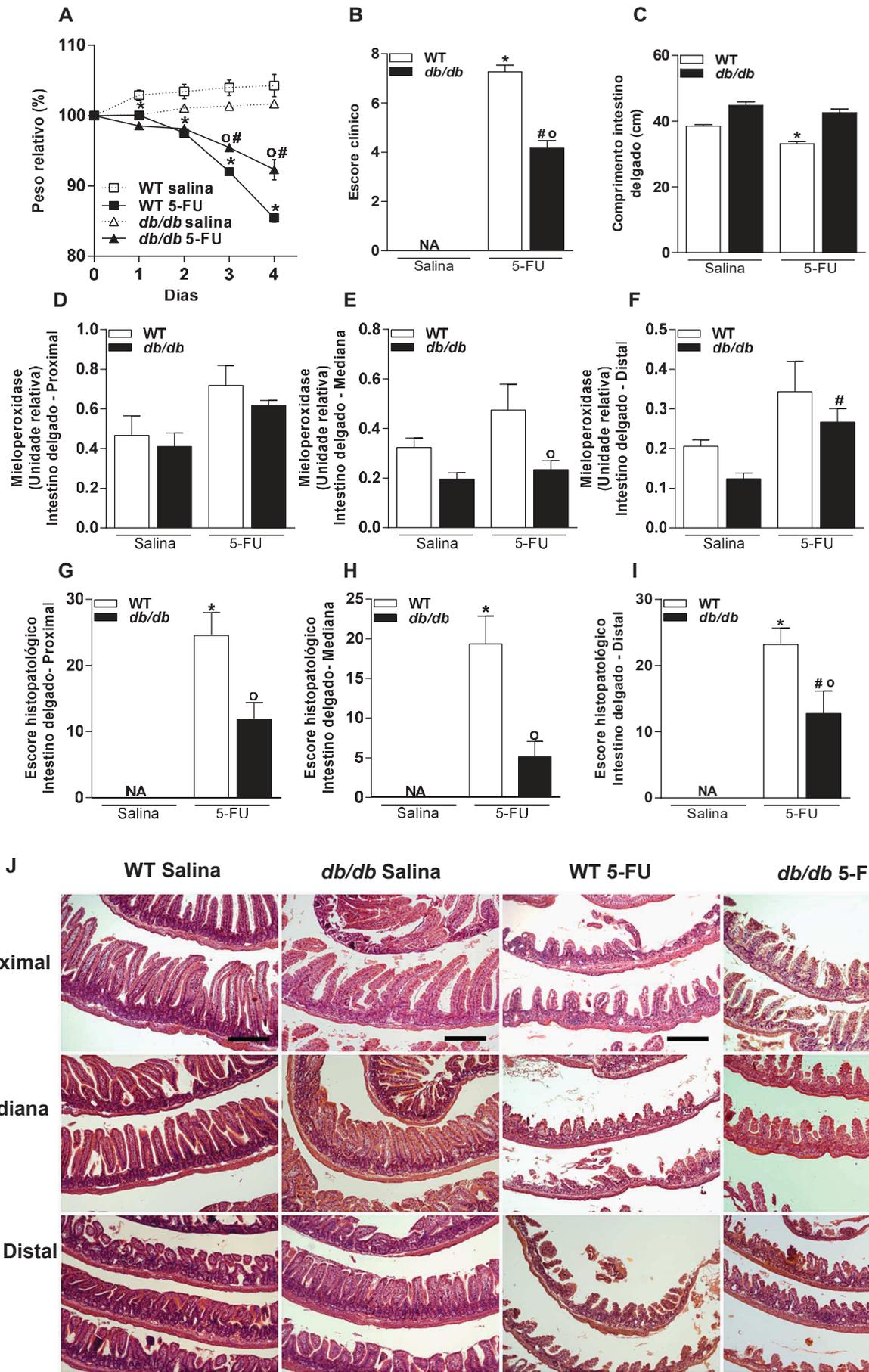
**Figura 13. Análises de órgãos chaves para o metabolismo durante colite aguda induzida por DSS.** (A) Peso relativo. Concentrações das enzimas: (B) Mieloperoxidase e (C) Peroxidase eosinofílica em tecido adiposo mesentérico. Concentrações das enzimas: (D) Mieloperoxidase e (E) Peroxidase eosinofílica em tecido adiposo perigonadal. (F) Peso de fígado de animais submetidos à colite, corrigido por peso corpóreo (PC). Concentrações das enzimas: (G) Mieloperoxidase e (H) Peroxidase eosinofílica em fígado de camundongos tratados com DSS. Grupos: WT - animais selvagens; *db/db* - animais deficientes para receptor de leptina; H<sub>2</sub>O - animais controles; DSS - submetidos a administração de DSS. *n* = 7-12. Resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM); *P*<0,05. \*versus controle, # versus *db/db*, ° versus WTDSS.

Alguns resultados existentes no modelo de colite aguda, demonstradas no **Capítulo 2**, diferem em alguns parâmetros em relação aos demonstrados no atual capítulo provavelmente devido à linhagem de animais utilizada e concentração de DSS. Demonstramos até então, que animais deficientes para o receptor da leptina apresentam redução na inflamação colônica induzida por DSS, efeito esse, que culminou na redução do escore clínico, da letalidade e menor perda de peso observado nesse modelo experimental. Além disso, essas alterações desencadeadas pela inflamação intestinal são minimizadas nos animais *db/db*, que já se encontram metabolicamente alterados; visto que no basal apresentam elevada glicemia e colesterol quando comparados aos animais controles. Assim, corroboramos da hipótese de que a leptina como citocina com características pró-inflamatórias é uma importante adipocina que contribui para a exacerbação da inflamação induzida por DSS. No desfecho clínico observado nos animais com colite experimental, o seu efeito provavelmente baseia-se na redução do recrutamento de células imunes para o cólon e tecido adiposo. Com o objetivo de avaliar se a leptina estaria envolvida em diferentes contextos de inflamação intestinal, observamos também a ausência da sinalização da leptina em modelo experimental de mucosite, que acomete o intestino delgado e possui características inflamatórias diferenciadas da colite, visto que o agente quimioterápico induz inicialmente imunossupressão sistêmica. Resultados apresentados no próximo tópico.

### **Leptina influencia na lesão intestinal observada na mucosite induzida pela administração de 5-FU**

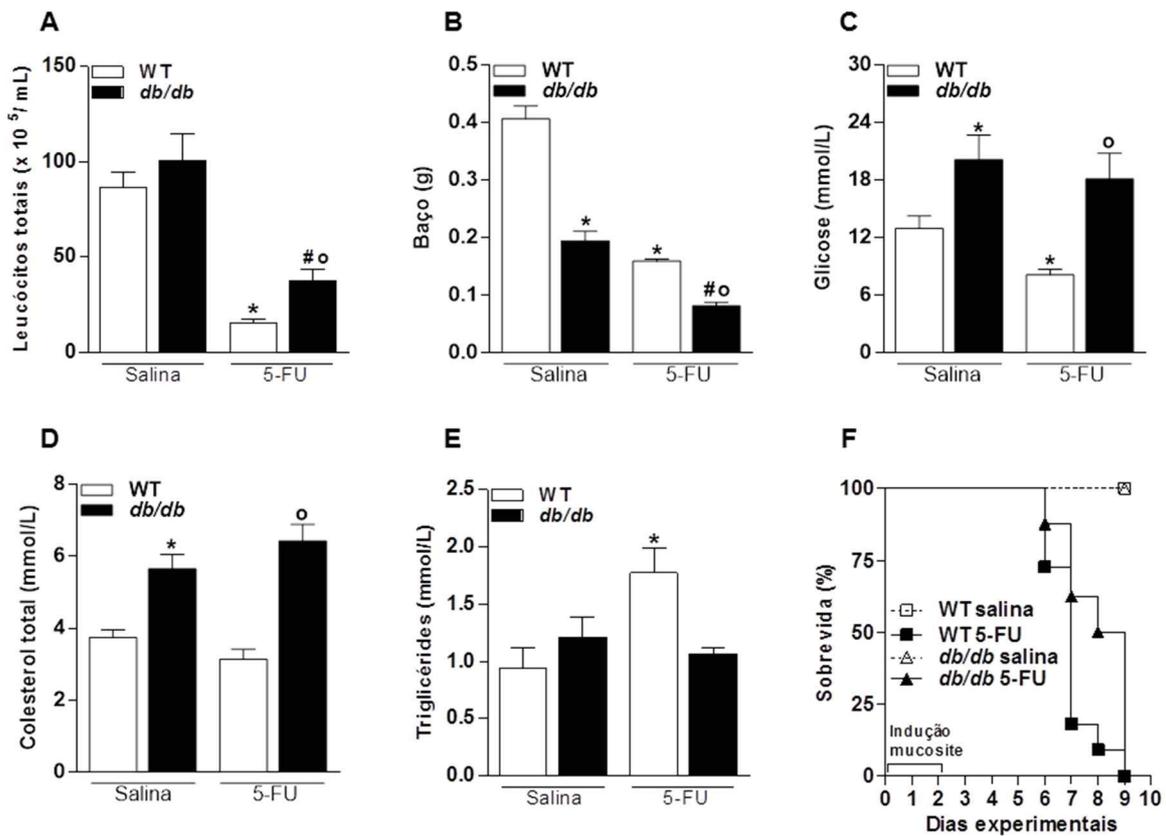
A administração de 5-FU induziu perda de peso nos animais selvagens, WT, em relação aos animais que receberam salina via i.p.. Animais deficientes para o receptor da leptina com mucosite também demonstraram perda de peso em relação ao seu grupo

controle, no entanto, em menor proporção quando comparado aos animais selvagens com a doença (Figura 14A). A administração de 5-FU nos animais induziu aumento no escore clínico em relação aos seus grupos controles, porém, observamos que nos animais *db/db* esse aumento foi inferior em relação aos animais WT (Figura 14B). Animais selvagens com mucosite mostraram redução do comprimento do intestino delgado em relação aos animais controle, sinal característico do modelo experimental avaliado, o mesmo não foi observado nos animais deficientes para o receptor de leptina (Figura 14C). Ao avaliarmos a atividade da mieloperoxidase não observamos diferenças significativas nas porções proximais e mediana do intestino delgado entre os grupos avaliados (Figura 14D e E, respectivamente), apenas na porção distal de animais deficientes no receptor da leptina observamos aumento em relação aos animais *db/db* salina (Figura 14F). Em contrapartida, todos os animais submetidos à administração de 5-FU demonstraram aumento no escore histopatológico, que avaliou presença de inflamação, dano nas criptas, lesão intestinal nos três sítios do intestino delgado, em relação aos animais que receberam salina. Os animais deficientes para o receptor da leptina mostraram maior preservação da arquitetura intestinal com menor escore histopatológico em relação aos animais WT nas três regiões avaliadas, como pode ser observado nos gráficos de escore histopatológico (Figura 14G-I) e nos cortes histológicos das três porções avaliadas (Figura 14J).



**Figura 14. Avaliação da resposta inflamatória no intestino delgado de animais WT e deficientes para o receptor de leptina em modelo experimental de mucosite induzida por 5-FU.** (A) Peso relativo. (B) Escore clínico. (C) Comprimento do intestino delgado. Atividade da enzima mieloperoxidase nas três porções do intestino delgado: (D) Proximal; (E) Mediana; (F) Distal. Escore histopatológico das porções do intestino delgado: (G) Proximal; (H) Mediana; (I) Distal. (J) Secções de parafina de intestino delgado corados com H&E, X100. Barra = 50µm. Grupos: WT - animais selvagens; *db/db* - animais deficientes para receptor de leptina; Salina - injeção i.p. de salina; 5-FU - injeção i.p. de 5-FU para indução de mucosite. *n* = 8-17. Resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM); *P*<0,05. \*versus WT salina, # versus *db/db* salina, ° versus WT 5-FU.

A administração de 5-FU induziu nos animais leucopenia e redução no peso dos baços no grupo WT ou deficientes para o receptor de leptina em relação aos seus respectivos controles (Figura 15A e B, respectivamente). A concentração de glicemia sérica nos animais com mucosite encontrou-se reduzida em relação ao grupo controle, no entanto não foram observadas essas diferenças nos animais *db/db* (Figura 15C). Não foram observadas alterações nas concentrações de colesterol total nos grupos submetidos à mucosite experimental em relação aos seus respectivos controles, no entanto, animais deficientes para o receptor de leptina apresentaram concentrações basais elevadas em relação aos animais selvagens (Figura 15D). A mucosite experimental induzida por 5-FU contribuiu para o aumento na concentração de triglicérides nos animais em relação ao grupo salina, mesma alteração não foi demonstrada pelo grupo de animais com mucosite e deficiente para o receptor de leptina (Figura 15E). Em relação à curva de sobrevivência, 100% dos animais submetidos à administração com 5-FU morreram em até nove dias experimentais, independentemente da linhagem (Figura 15F).



**Figura 15. Avaliação da resposta sistêmica, metabólica e sobrevida de animais WT e deficientes para o receptor de leptina com mucosite experimental induzida por 5-FU.** (A) Contagem de células sanguíneas - Leucócitos totais. (B) Peso do baço em animais submetidos à mucosite experimental. Avaliação das concentrações séricas de: (C) Glicose; (D) Colesterol total; (E) Triglicérides. (F) Curva de sobrevida. Grupos: WT - animais selvagens; *db/db* - animais deficientes para receptor de leptina; Salina -injeção i.p. de salina; 5-FU - injeção i.p. de 5-FU para indução de mucosite.  $n = 7-14$ . Resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM);  $P < 0,05$ . \*versus WT salina, # versus *db/db* salina, ° versus WT 5-FU.

## Discussão

A colite e a mucosite são inflamações que acometem o trato gastrointestinal e geram importante impacto na qualidade de vida dos indivíduos que as possuem. As duas doenças induzem perda de peso, redução na absorção de nutrientes, que contribui para a piora do quadro clínico, dores, diarreia, entre outros sinais e sintomas.

Até o momento não existem tratamentos eficazes e definitivos para ambas as doenças. A colite ulcerativa é uma doença crônica e está relacionada a alterações metabólicas e maior risco para o desenvolvimento de outras doenças crônicas secundárias, já a mucosite é efeito colateral muito comum no tratamento contra o câncer, doença cuja incidência tem aumentando ao longo dos anos. Trabalhos anteriores (Melgar *et al.*, 2007; Waluga *et al.*, 2014) e também do nosso grupo de pesquisa (**Capítulo 2**) demonstraram que a leptina encontra-se alterada no contexto das DII. Nesse trabalho objetivamos verificar qual o impacto da leptina no desenvolvimento da inflamação intestinal observada em modelos experimentais de colite aguda induzida por DSS e mucosite induzida pela administração do quimioterápico 5-FU. Nossos principais achados foram: (i) a ausência da sinalização da leptina induziu redução na resposta inflamatória no cólon, tecido adiposo e fígado de animais submetidos à colite experimental aguda por administração de DSS; (ii) a menor resposta inflamatória reduziu o escore clínico e protegeu os animais contra a letalidade observados nesse modelo experimental; (iii) no modelo de mucosite experimental induzido pela administração de 5-FU, a ausência da sinalização da leptina induziu redução na lesão e da inflamação no intestino delgado; (iv) apesar de animais *db/db* apresentarem menor inflamação em resposta a lesão induzida pelo 5FU, os mesmos não foram protegidos contra a letalidade.

Nossos resultados indicam que a leptina exerce papel importante na resposta inflamatória aguda intestinal tanto na colite e como na mucosite experimental. A leptina foi descrita inicialmente por Zhang e colaboradores (1994) como hormônio controlador do apetite, anos depois outras funções foram descritas e associadas a essa adipocina. Siegmund e colaboradores (2002) demonstraram em modelo de colite experimental aguda e crônica utilizando DSS e em modelo utilizando ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (*2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid - TNBS*) menor resposta inflamatória em animais

deficientes para a produção de leptina (camundongos *ob/ob*) em relação aos animais selvagens. Para comprovar que a proteção se devia à ação da leptina e não da obesidade, existente nesses animais, os autores realizaram reposição da leptina e observaram perda da proteção contra a resposta inflamatória observada (Siegmund *et al.*, 2002). Anos depois, Gove e colaboradores (2009) mostraram que animais deficientes para o receptor da leptina também eram protegidos no modelo de colite induzido por DSS e apresentavam atenuação do encurtamento colônico, menor produção de citocinas e escore histopatológico no cólon de animais com colite experimental. Resultados similares ao que encontramos em nosso trabalho, além disso, nós demonstramos também a ausência da sinalização da leptina protegeu os animais contra a letalidade e a resposta inflamatória no tecido adiposo, condições classicamente observadas nesse modelo experimental. Essa proteção ocorreu apesar dos animais deficientes para o receptor da leptina apresentarem alterações metabólicas importantes basais, como maiores concentrações de glicose e colesterol total séricos de jejum em relação aos animais selvagens, no entanto, essas alterações não foram modificadas pela resposta inflamatória, como observamos nos animais selvagens.

Apesar de satisfatórios e de corroborarem com alguns dados já apresentados na literatura, esses resultados nos intrigaram devido outras funções da leptina descrita em outros modelos experimentais. Amar e colaboradores (2011) mostraram que camundongos *ob/ob*, animais que não produzem leptina, quando submetidos à dieta rica em gordura, que induz modificação da microbiota intestinal, apresentam aumento de translocação bacteriana para o tecido adiposo e sangue. Além disso, em modelos que envolvem infecção por bactérias, a ausência da leptina é prejudicial, na colite induzida por infecção de *Clostridium difficile*, a ausência da sinalização da leptina em animais *db/db* impediu a adequada eliminação da bactéria, tornando esses animais mais

susceptíveis à infecção (Madan *et al.*, 2014). Guo e colaboradores (2011) também demonstraram que animais *db/db* são mais susceptíveis à infecção entérica por *Entamoeba histolytica*. Além da proteção contra agentes infecciosos, Umeki e colaboradores (2014) demonstram que o uso da leptina tópico apresentou efeito importante na cicatrização da mucosa oral de coelhos submetidos à lesão química. Além disso, Sukhotnik e colaboradores (2009) utilizaram a leptina em modelo de mucosite experimental induzido por metotrexato, em ratos, e observaram efeito benéfico, por meio da indução da proliferação de enterócito, recuperação intestinal e renovação celular. Devido à existência de fatores contraditórios em relação à função da leptina na mucosa do trato gastrointestinal, resolvemos avaliar o efeito da ausência da sinalização da leptina também no modelo de mucosite experimental.

Nossos resultados mostraram redução da resposta inflamatória, no modelo de mucosite experimental induzida por 5-FU, em animais deficientes para o receptor da leptina, representados pela proteção no comprimento do intestino e nos escores histopatológicos. De forma interessante, também observamos que animais selvagens com mucosite apresentam adaptações metabólicas induzidas pela resposta inflamatória do intestino delgado, como redução da glicemia e aumento das concentrações de triglicérides séricos de jejum em relação ao seu grupo controle. Parâmetros esses não alterados em animais *db/db* submetidos ao tratamento com o agente quimioterápico. Apesar de redução da resposta inflamatória no tempo avaliado, os animais deficientes para o receptor de leptina não foram protegidos contra letalidade observada nesse modelo experimental. Acreditamos que a perda da proteção à letalidade se deva a dose do quimioterápico utilizada, visto que os animais *db/db* apresentam uma tendência em atrasar o início da letalidade, no entanto, devido à intensa resposta inflamatória

demonstrada no modelo experimental utilizado (100% de letalidade), não fomos capazes de identificar de forma clara esse fator.

## **Conclusão**

A leptina parece ser fundamental para a adequada fisiologia intestinal, no entanto, nas respostas inflamatórias intestinais a sua presença parece contribuir para a exacerbação da inflamação observada. Apesar dos resultados serem consistentes com a literatura, em relação à deficiência da sinalização da leptina na colite experimental, a respeito da ação da leptina na mucosite os resultados são menos conclusivos, mas nosso trabalho demonstrou claramente ser essa molécula importante em ambos modelos de inflamação, visto que a sua ausência reduz a lesão intestinal e o recrutamento de células imunes.

## 5. Considerações gerais

O uso de estratégias moduladoras da microbiota intestinal, como por exemplo, os prebióticos e probióticos, parece ser eficiente como forma preventiva à inflamação intestinal experimental aguda. Para avaliar se estas estratégias teriam efeito terapêutico, desenvolvemos um modelo de colite crônica no laboratório. Nossos dados demonstram que a administração preventiva de tais estratégias, mas não terapêutica, diminuem de sobremaneira a colite no modelo crônico, mesmo quando associamos dois tratamentos, o pós-tratamento não foi eficiente, **Capítulo 1**. Por outro lado, a combinação terapêutica de estratégias moduladoras da microbiota intestinal com estratégias anti-inflamatórias merece ser estudada, esperando-se um benefício desta terapia conjunta. Associada à resposta inflamatória intestinal avaliada nos experimentos do **Capítulo 1**, identificamos adaptações metabólicas importantes, durante a fase aguda da doença, que progridem para um quadro similar à síndrome metabólica na inflamação persistente. Essas alterações metabólicas se associam à inflamação no tecido adiposo mesentérico, o sítio de tecido adiposo mais próximo da região inflamada, e alterações na expressão de moléculas relacionadas ao metabolismo no fígado, órgão central do controle metabólico, conforme demonstramos no **Capítulo 2** do trabalho. Se o tratamento com fibras e fármacos anti-inflamatórios alteram as adaptações metabólicas não foi estudado aqui e deverá ser objeto de estudos futuros.

Dentre as adaptações/alterações metabólicas observadas, vimos que as concentrações de leptina, adipocina com características pró-inflamatórias, encontram-se alteradas de forma oposta nos modelos de colite aguda e crônica induzida por DSS. Posteriormente, demonstramos que essa molécula está diretamente associada à inflamação intestinal, visto que em ambos os modelos avaliados de inflamação intestinal

aguda experimental, colite e mucosite, sua ausência atenuou a resposta inflamatória, resultados demonstrados no **Capítulo 3** do atual trabalho. Estudos futuros avaliarão o impacto da ausência da leptina na resposta inflamatória e alterações metabólicas em modelos de colite crônica.

## 6. Referências bibliográficas

ALVES-FILHO, J. C.; PALSSON-MCDERMOTT, E. M. Pyruvate Kinase M2: A Potential Target for Regulating Inflammation. **Front Immunol**, v. 7, p. 145, 2016.

AMAR, J. et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. **EMBO Mol Med**, v. 3, n. 9, p. 559-72, Sep 2011.

ANANTHAKRISHNAN, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 12, n. 4, p. 205-17, Apr 2015.

ARDIZZONE, S.; BIANCHI PORRO, G. Biologic therapy for inflammatory bowel disease. **Drugs**, v. 65, n. 16, p. 2253-86, 2005.

ARIFA, R. D. et al. Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecan-induced mucositis through IL-1beta and IL-18 in mice. **Am J Pathol**, v. 184, n. 7, p. 2023-34, Jul 2014.

ASSEMAN, C. et al. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. **J Exp Med**, v. 190, n. 7, p. 995-1004, Oct 4 1999.

AXELRAD, J. E.; LICHTIGER, S.; YAJNIK, V. Inflammatory bowel disease and cancer: The role of inflammation, immunosuppression, and cancer treatment. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 20, p. 4794-801, May 28 2016.

BARBIER, M. et al. Overexpression of leptin mRNA in mesenteric adipose tissue in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterol Clin Biol**, v. 27, n. 11, p. 987-91, Nov 2003.

BATES, S. H. et al. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. **Nature**, v. 421, n. 6925, p. 856-9, Feb 20 2003.

BATRA, A. et al. Mesenteric fat - control site for bacterial translocation in colitis? **Mucosal Immunol**, v. 5, n. 5, p. 580-91, Sep 2012.

BECHMANN, L. P. et al. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. **J Hepatol**, v. 56, n. 4, p. 952-64, Apr 2012.

BENNETT, B. D. et al. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. **Curr Biol**, v. 6, n. 9, p. 1170-80, Sep 1 1996.

BEUTHEU YOUNBA, S. et al. Methotrexate modulates tight junctions through NF-kappaB, MEK, and JNK pathways. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 54, n. 4, p. 463-70, Apr 2012.

BISCHOFF, S. C. et al. Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. **Histopathology**, v. 28, n. 1, p. 1-13, Jan 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS nº 858, de 04 de novembro de 2002. Institui o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas na Doença de Crohn. . 2010. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt\\_doenca\\_de\\_crohn.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_doenca_de_crohn.pdf)>. Acesso em: nov 11.

BREGENZER, N. et al. Increased insulin resistance and beta cell activity in patients with Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 12, n. 1, p. 53-6, Jan 2006.

BRUNT, E. M. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **Am J Gastroenterol**, v. 94, n. 9, p. 2467-74, Sep 1999.

CAMPOS, M. I. et al. Oral mucositis in cancer treatment: Natural history, prevention and treatment. **Mol Clin Oncol**, v. 2, n. 3, p. 337-340, May 2014.

CAPPELLO, M. et al. Liver Function Test Abnormalities in Patients with Inflammatory Bowel Diseases: A Hospital-based Survey. **Clin Med Insights Gastroenterol**, v. 7, p. 25-31, 2014.

CHEN, C. et al. Metabolomics reveals that hepatic stearyl-CoA desaturase 1 downregulation exacerbates inflammation and acute colitis. **Cell Metab**, v. 7, n. 2, p. 135-47, Feb 2008.

COSNES, J. et al. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1785-94, May 2011.

DAWISKIBA, T. et al. Serum and urine metabolomic fingerprinting in diagnostics of inflammatory bowel diseases. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 1, p. 163-74, Jan 7 2014.

DE CASSAN, C.; FIORINO, G.; DANESE, S. Second-generation corticosteroids for the treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis: more effective and less side effects? **Dig Dis**, v. 30, n. 4, p. 368-75, 2012.

DOS SANTOS, L. C. et al. Combination of Azathioprine and Aminosalicylate Treatment Prevent Risk of Cardiovascular Disease in Women with Ulcerative Colitis by Reducing Inflammation. **Med Sci Monit**, v. 21, p. 2305-15, Aug 07 2015.

DUERR, R. H. et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. **Science**, v. 314, n. 5804, p. 1461-3, Dec 1 2006.

ELSON, C. O. et al. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 109, n. 4, p. 1344-67, Oct 1995.

FAROMBI, E. O. et al. Dietary protocatechuic acid ameliorates dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis and hepatotoxicity in rats. **Food Funct**, v. 7, n. 2, p. 913-21, Feb 2016.

FAVA, F.; DANESE, S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 5, p. 557-66, Feb 7 2011.

FERNANDEZ-BANARES, F. et al. Randomized clinical trial of *Plantago ovata* seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. Spanish Group for the Study of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (GETECCU). **Am J Gastroenterol**, v. 94, n. 2, p. 427-33, Feb 1999.

FERREIRA, T. M. et al. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-Fluorouracil administration. **Lipids**, v. 47, n. 7, p. 669-78, Jul 2012.

FLINT, H. J. et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 10, p. 577-89, Oct 2012.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, May 1957.

FUKUDA, S. et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 543-7, Jan 27 2011.

GALVEZ, J.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E.; ZARZUELO, A. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. **Mol Nutr Food Res**, v. 49, n. 6, p. 601-8, Jun 2005.

GAMBERO, A. et al. Mesenteric adipose tissue alterations resulting from experimental reactivated colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 13, n. 11, p. 1357-64, Nov 2007.

GANDHI, S. et al. Are patients with inflammatory bowel disease at increased risk of coronary artery disease? **Am J Med**, v. 125, n. 10, p. 956-62, Oct 2012.

GEARRY, R. B. et al. Population-based cases control study of inflammatory bowel disease risk factors. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 25, n. 2, p. 325-33, Feb 2010.

GIONCHETTI, P. et al. Antibiotics and probiotics in treatment of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 21, p. 3306-13, Jun 7 2006.

GISBERT, J. P. et al. Liver injury in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 786 patients. **Inflamm Bowel Dis**, v. 13, n. 9, p. 1106-14, Sep 2007.

GOVE, M. E. et al. Role of leptin receptor-induced STAT3 signaling in modulation of intestinal and hepatic inflammation in mice. **J Leukoc Biol**, v. 85, n. 3, p. 491-6, Mar 2009.

GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. **Semin Immunopathol**, Nov 16 2012.

GUO, X. et al. Leptin signaling in intestinal epithelium mediates resistance to enteric infection by *Entamoeba histolytica*. **Mucosal Immunol**, v. 4, n. 3, p. 294-303, May 2011.

HAN, T. S.; LEAN, M. E. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **JRSM Cardiovasc Dis**, v. 5, p. 2048004016633371, Jan-Dec 2016.

HANAI, H. et al. Germinated barley foodstuff prolongs remission in patients with ulcerative colitis. **Int J Mol Med**, v. 13, n. 5, p. 643-7, May 2004.

HELLER, F. et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. **Gastroenterology**, v. 129, n. 2, p. 550-64, Aug 2005.

HENDRICKSON, B. A.; GOKHALE, R.; CHO, J. H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 1, p. 79-94, Jan 2002.

KANAUCHI, O. et al. Treatment of ulcerative colitis by feeding with germinated barley foodstuff: first report of a multicenter open control trial. **J Gastroenterol**, v. 37 Suppl 14, p. 67-72, Nov 2002.

KARLSSON, A. et al. Dextran sulphate sodium induces acute colitis and alters hepatic function in hamsters. **Int Immunopharmacol**, v. 8, n. 1, p. 20-7, Jan 2008.

KARMIRIS, K. et al. Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 12, n. 2, p. 100-5, Feb 2006.

KARRASCH, T.; SCHAEFFLER, A. Adipokines and the role of visceral adipose tissue in inflammatory bowel disease. **Ann Gastroenterol**, v. 29, n. 4, p. 424-438, Oct-Dec 2016.

KOCH, C. et al. Leptin rapidly improves glucose homeostasis in obese mice by increasing hypothalamic insulin sensitivity. **J Neurosci**, v. 30, n. 48, p. 16180-7, Dec 01 2010.

KOMIYAMA, Y. et al. Prebiotic treatment in experimental colitis reduces the risk of colitic cancer. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 26, n. 8, p. 1298-308, Aug 2011.

KONRAD, A. et al. Resistin is an inflammatory marker of inflammatory bowel disease in humans. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 19, n. 12, p. 1070-4, Dec 2007.

KREDEL, L. I.; SIEGMUND, B. Adipose-tissue and intestinal inflammation - visceral obesity and creeping fat. **Front Immunol**, v. 5, p. 462, 2014.

KRISTENSEN, S. L. et al. Inflammatory bowel disease is associated with an increased risk of hospitalization for heart failure: a Danish Nationwide Cohort study. **Circ Heart Fail**, v. 7, n. 5, p. 717-22, Sep 2014.

KURTOVIC, J.; SEGAL, I. Recent advances in biological therapy for inflammatory bowel disease. **Trop Gastroenterol**, v. 25, n. 1, p. 9-14, Jan-Mar 2004.

LALLA, R. V. et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer**, v. 120, n. 10, p. 1453-61, May 15 2014.

LALLA, R. V.; SONIS, S. T.; PETERSON, D. E. Management of oral mucositis in patients who have cancer. **Dent Clin North Am**, v. 52, n. 1, p. 61-77, viii, Jan 2008.

LAMPINEN, M. et al. Accumulation, activation, and survival of neutrophils in ulcerative colitis: regulation by locally produced factors in the colon and impact of steroid treatment. **Int J Colorectal Dis**, v. 23, n. 10, p. 939-46, Oct 2008.

LEVINE, J. S.; BURAKOFF, R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. **Gastroenterol Hepatol (N Y)**, v. 7, n. 4, p. 235-41, Apr 2011.

LOFTUS, E. V., JR. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v. 126, n. 6, p. 1504-17, May 2004.

LOFTUS, R. M.; FINLAY, D. K. Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator. **J Biol Chem**, v. 291, n. 1, p. 1-10, Jan 01 2016.

LOGAN, R. M. et al. Serum levels of NFkappaB and pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. **Cancer Biol Ther**, v. 7, n. 7, p. 1139-45, Jul 2008.

LORD, G. M. et al. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. **Nature**, v. 394, n. 6696, p. 897-901, Aug 27 1998.

LOUIS, E. Epidemiology of the transition from early to late Crohn's disease. **Dig Dis**, v. 30, n. 4, p. 376-9, 2012.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T. Regulation of short-chain fatty acid production. **Proc Nutr Soc**, v. 62, n. 1, p. 67-72, Feb 2003.

MADAN, R. et al. Role of leptin-mediated colonic inflammation in defense against *Clostridium difficile* colitis. **Infect Immun**, v. 82, n. 1, p. 341-9, Jan 2014.

MARTINEZ-MEDINA, M. et al. Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 12, n. 12, p. 1136-45, Dec 2006.

MARTINEZ-MONTIEL, M. P. et al. Pharmacologic therapy for inflammatory bowel disease refractory to steroids. **Clin Exp Gastroenterol**, v. 8, p. 257-69, 2015.

MARTINS, F. S. et al. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. **Arch Microbiol**, v. 191, n. 8, p. 623-30, Aug 2009.

MASLOWSKI, K. M. et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1282-6, Oct 29 2009.

MCGRATH, C. M.; YOUNG, S. P. Lipid and Metabolic Changes in Rheumatoid Arthritis. **Curr Rheumatol Rep**, v. 17, n. 9, p. 57, Sep 2015.

MELGAR, S. et al. Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 292, n. 1, p. G165-72, Jan 2007.

MELGAR, S.; KARLSSON, A.; MICHAELSSON, E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 288, n. 6, p. G1328-38, Jun 2005.

MEYER, D.; STASSE-WOLTHUIS, M. The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. **Eur J Clin Nutr**, v. 63, n. 11, p. 1277-89, Nov 2009.

MIJAC, D. D. et al. Nutritional status in patients with active inflammatory bowel disease: prevalence of malnutrition and methods for routine nutritional assessment. **Eur J Intern Med**, v. 21, n. 4, p. 315-9, Aug 2010.

MIYAUCHI, E. et al. Bifidobacterium longum alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing IL-17A response: involvement of intestinal epithelial costimulatory molecules. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79735, 2013.

MIYAZAKI, M. et al. The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. **J Biol Chem**, v. 275, n. 39, p. 30132-8, Sep 29 2000.

MOHAMED-ALI, V.; PINKNEY, J. H.; COPPACK, S. W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 22, n. 12, p. 1145-58, Dec 1998.

MOLODECKY, N. A. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 46-54 e42; quiz e30, Jan 2012.

MOREAU, N. M. et al. Restoration of the integrity of rat caeco-colonic mucosa by resistant starch, but not by fructo-oligosaccharides, in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. **Br J Nutr**, v. 90, n. 1, p. 75-85, Jul 2003.

MUSTAIN, W. C. et al. Inflammatory cytokine gene expression in mesenteric adipose tissue during acute experimental colitis. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e83693, 2013.

NAGALINGAM, N. A.; KAO, J. Y.; YOUNG, V. B. Microbial ecology of the murine gut associated with the development of dextran sodium sulfate-induced colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 17, n. 4, p. 917-26, Apr 2011.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351-8, Jun 1979.

OKAYASU, I. et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 98, n. 3, p. 694-702, Mar 1990.

OLIVEIRA, M. C. et al. Tumor Necrosis Factor, but Not Neutrophils, Alters the Metabolic Profile in Acute Experimental Arthritis. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0146403, 2016.

OLIVIER, I. et al. Modifications of mesenteric adipose tissue during moderate experimental colitis in mice. **Life Sci**, v. 94, n. 1, p. 1-7, Jan 14 2014.

PAUL, G. et al. Profiling adipocytokine secretion from creeping fat in Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 12, n. 6, p. 471-7, Jun 2006.

PERAN, L. et al. Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 33, p. 5185-92, Sep 7 2005.

PEREZ-PEREZ, A. et al. Role of leptin in female reproduction. **Clin Chem Lab Med**, v. 53, n. 1, p. 15-28, Jan 2015.

PERSE, M.; CERAR, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 718617, 2012.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993.

RIPOLLES PIQUER, B. et al. Altered lipid, apolipoprotein, and lipoprotein profiles in inflammatory bowel disease: consequences on the cholesterol efflux capacity of serum using Fu5AH cell system. **Metabolism**, v. 55, n. 7, p. 980-8, Jul 2006.

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 33, n. 2, p. 103-48, 1993.

ROBERFROID, M. Prebiotics: the concept revisited. **J Nutr**, v. 137, n. 3 Suppl 2, p. 830S-7S, Mar 2007.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **Br J Nutr**, v. 104 Suppl 2, p. S1-63, Aug 2010.

ROBINSON, C. E. et al. Regulation of neutrophils in ulcerative colitis by colonic factors: a possible mechanism of neutrophil activation and tissue damage. **J Lab Clin Med**, v. 130, n. 6, p. 590-602, Dec 1997.

RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E. et al. Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. **J Nutr**, v. 132, n. 11, p. 3263-71, Nov 2002.

RUNGOE, C. et al. Risk of ischaemic heart disease in patients with inflammatory bowel disease: a nationwide Danish cohort study. **Gut**, v. 62, n. 5, p. 689-94, May 2013.

SAKAMOTO, N. et al. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. **Inflamm Bowel Dis**, v. 11, n. 2, p. 154-63, Feb 2005.

SAPPATI BIYYANI, R. S.; PUTKA, B. S.; MULLEN, K. D. Dyslipidemia and lipoprotein profiles in patients with inflammatory bowel disease. **J Clin Lipidol**, v. 4, n. 6, p. 478-82, Nov-Dec 2010.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, n. 1, p. 192-205, Oct 24 1968.

SEZER, A.; USTA, U.; CICIN, I. The effect of *Saccharomyces boulardii* on reducing irinotecan-induced intestinal mucositis and diarrhea. **Med Oncol**, v. 26, n. 3, p. 350-7, 2009.

SHANAHAN, F. Probiotics in inflammatory bowel disease--therapeutic rationale and role. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 56, n. 6, p. 809-18, Apr 19 2004.

SHEEHAN, A. L. et al. Fat-wrapping in Crohn's disease: pathological basis and relevance to surgical practice. **Br J Surg**, v. 79, n. 9, p. 955-8, Sep 1992.

SHIBOLET, O. et al. Variable response to probiotics in two models of experimental colitis in rats. **Inflamm Bowel Dis**, v. 8, n. 6, p. 399-406, Nov 2002.

SIEGMUND, B.; LEHR, H. A.; FANTUZZI, G. Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice. **Gastroenterology**, v. 122, n. 7, p. 2011-25, Jun 2002.

SILVEIRA, A. L. et al. Preventive rather than therapeutic treatment with high fiber diet attenuates clinical and inflammatory markers of acute and chronic DSS-induced colitis in mice. **Eur J Nutr**, Oct 12 2015.

SILVEIRA, A. L. M. **Avaliação do efeito terapêutico da dieta rica em fibra na colite experimental induzida por sulfato de sódio dextrana**. 2013. 92 Dissertação (Mestrado). Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SINGH, S. et al. Epidemiology, risk factors and management of cardiovascular diseases in IBD. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 12, n. 1, p. 26-35, Jan 2015.

SINGH, U. P. et al. Leptin antagonist ameliorates chronic colitis in IL-10(-)/(-) mice. **Immunobiology**, v. 218, n. 12, p. 1439-51, Dec 2013.

SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 4, p. 277-84, Apr 2004.

SOUZA, D. G. et al. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. **Am J Pathol**, v. 160, n. 5, p. 1755-65, May 2002.

STRATH, M.; WARREN, D. J.; SANDERSON, C. J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **J Immunol Methods**, v. 83, n. 2, p. 209-15, Nov 7 1985.

STROBER, W.; FUSS, I. J.; BLUMBERG, R. S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 495-549, 2002.

SUKHOTNIK, I. et al. Leptin accelerates enterocyte turnover during methotrexate-induced intestinal mucositis in a rat. **Cancer Biol Ther**, v. 8, n. 10, p. 899-906, May 2009.

TARTAGLIA, L. A. The leptin receptor. **J Biol Chem**, v. 272, n. 10, p. 6093-6, Mar 7 1997.

TESTA, A. et al. The burden of anaemia in patients with inflammatory bowel diseases. **Dig Liver Dis**, Nov 22 2015.

THEOCHARIDOU, E. et al. Is there an association between inflammatory bowel diseases and carotid intima-media thickness? Preliminary data. **Angiology**, v. 65, n. 6, p. 543-50, Jul 2014.

TIGAS, S.; TSATSOULIS, A. Endocrine and metabolic manifestations in inflammatory bowel disease. **Ann Gastroenterol**, v. 25, n. 1, p. 37-44, 2012.

UMEKI, H. et al. Leptin promotes wound healing in the oral mucosa. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101984, 2014.

VALENTINI, L. et al. Circulating adipokines and the protective effects of hyperinsulinemia in inflammatory bowel disease. **Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 172-81, Feb 2009.

VAN LEUVEN, S. I. et al. Enhanced atherogenesis and altered high density lipoprotein in patients with Crohn's disease. **J Lipid Res**, v. 48, n. 12, p. 2640-6, Dec 2007.

VAN VLIET, M. J. et al. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 5, p. e1000879, May 27 2010.

VIEIRA, A. T. et al. Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. **Am J Pathol**, v. 175, n. 6, p. 2382-91, Dec 2009.

VYAS, U.; RANGANATHAN, N. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. **Gastroenterol Res Pract**, v. 2012, p. 872716, 2012.

WALUGA, M. et al. Serum adipokines in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 22, p. 6912-7, Jun 14 2014.

WILLIAMS, H. R. et al. Serum metabolic profiling in inflammatory bowel disease. **Dig Dis Sci**, v. 57, n. 8, p. 2157-65, Aug 2012.

WU, T. et al. Metabolic disturbances associated with systemic lupus erythematosus. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e37210, 2012.

XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 427-34, Jul 26 2007.

YAMADA, L. T. et al. Immunologic and metabolic effects of high-refined carbohydrate-containing diet in food allergic mice. **Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 273-80, Feb 2016.

ZHANG, J. et al. The risk of metabolic syndrome in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e78151, 2013.

ZHANG, Y. et al. <sup>1</sup>H NMR-based spectroscopy detects metabolic alterations in serum of patients with early-stage ulcerative colitis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 433, n. 4, p. 547-51, Apr 19 2013.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, Dec 1 1994.

ZHAO, H. M. et al. Probiotics increase T regulatory cells and reduce severity of experimental colitis in mice. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 5, p. 742-9, Feb 7 2013.