

**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Efeito da ingestão combinada de proteína do
soro do leite com probióticos na colite induzida
por Dextran Sulfato de Sódio**

Amanda Ascanio

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Alimentos e Nutrição para obtenção
do título de Mestre em Alimentos e
Nutrição.

Área de Concentração: Ciências
Nutricionais

Orientadora: Profa. Dra. Daniela
Cardoso Umbelino Cavallini

**Araraquara
2022**

Efeito da ingestão combinada de proteína do soro do leite com probióticos na colite induzida por Dextran Sulfato de Sódio

Amanda Ascanio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciências Nutricionais

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

**Araraquara
2022**

A812e

Ascanio, Amanda.

Efeito da ingestão combinada de proteína do soro do leite com probióticos na colite induzida por Dextran Sulfato de Sódio / Amanda Ascanio. – Araraquara, 2022.

71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos. Área de Concentração em Ciências Nutricionais.

Orientadora: Daniela Cardoso Umbelino Cavallini.

1. Colite. 2. Probiótico. 3. Soro de leite. 4. Microbiota. I. Cavallini, Daniela Cardoso Umbelino, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeito da ingestão combinada de proteína do soro do leite com probióticos na colite induzida por Dextran Sulfato de Sódio

AUTORA: AMANDA ASCANIO

ORIENTADORA: DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Alimentos e Nutrição, área: Ciências Nutricionais pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Prof. Dr. LUIS CARLOS SPOLIDORIO (Participação Virtual)
Departamento de Fisiologia e Patologia / Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Profa. Dra. RENATA PIRES DE ASSIS (Participação Virtual)
Instituto de Ciências da Saúde / Universidade Paulista - UNIP - Araraquara

Araraquara, 14 de dezembro de 2022

Dedicatória

Dedico este trabalho a meus
pais, familiares e amigos que
sempre me incentivaram.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP e a minha orientadora Profa. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini, pelo seu incentivo, por sua disponibilidade, dedicação e apoio durante toda a trajetória. Expresso-lhe aqui toda a minha gratidão.

Agradeço também os colaboradores do projeto, Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros, Profa. Dra. Amanda Martins Baviera, Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio, Profa. Dra. Renata Pires de Assis e a Dra. Camila Cesario Fernandes Sartini.

Resumo

Objetivo(s): a proposição desse estudo foi avaliar o efeito da ingestão combinada de proteína do soro do leite (0,2g/kg de peso) e da cepa probiótica *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (8 log UFC por dia) na colite induzida em modelo animal. **Métodos:** o estudo foi conduzido com camundongos C57BL/6J e a indução da colite foi realizada por ingestão de Dextran Sulfato de Sódio (DSS – 3%), dissolvido na água oferecida diariamente aos animais. Os camundongos foram distribuídos em quatro grupos (n=10): Grupo C – controle saudável sem indução da colite; Grupo CL - com indução da colite e sem tratamento; Grupo CS - com indução da colite e que receberam proteína do soro de leite e Grupo CSP - com indução da colite e que receberam proteína do soro de leite e a cepa probiótica. Para a mensuração dos efeitos dos tratamentos foram avaliados o índice de atividade da doença, alterações histológicas no cólon, perfil de citocinas e composição da microbiota por sequenciamento do gene 16s rRNA. **Resultados:** A ingestão diária da proteína do soro de leite e da combinação proteína do soro de leite e probiótico resultou em menor perda de peso em relação ao controle, manutenção da relação peso/ comprimento do cólon e atenuou os demais sintomas da colite, efeito evidenciado pelo IAD. Não houve variação na concentração de TNF- α e IL-10, porém, as citocinas inflamatórias IL-12 e IL-6 apresentaram menores níveis nos grupos controle saudável, sem diferir dos grupos CS e CSP. A análise histológica evidenciou que a proteína do soro do leite associada ao probiótico (CSP) reduziu significativamente a intensidade do infiltrado inflamatório, mas não recuperou integridade do epitélio intestinal. **Conclusão:** Os resultados demonstram que a proteína do soro de leite, sozinha ou em combinação com *L. rhamnosus* GG, pode ser uma alternativa não farmacológica para auxiliar no controle da colite.

Palavras-chave: Colite; Probiótico; Soro de leite; Microbiota.

Abstract

Objective(s): The purpose of this study was to evaluate the effect of the combined intake of whey protein (0.2g/kg of weight) and the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG (8 log CFU per day) on induced colitis in animal model. **Methods:** the study was carried out with C57BL/6J mice and colitis was induced by ingestion of dextran sulfate sodium (DSS – 3%), dissolved in the water offered daily to the animals. Mice were divided into four groups (n=10): Group C – healthy control without colitis induction; Group CL - with colitis induction and without treatment; Group CS - with colitis induction and receiving whey protein and CSP Group - with colitis induction and receiving whey protein and the probiotic strain. To measure the effects of treatments, the disease activity index, histological alterations in the colon, cytokine profile and microbiota composition by sequencing the 16s rRNA gene were evaluated. **Results:** The daily intake of whey protein and the whey protein plus probiotic combination resulted in less weight loss compared to the control, maintenance of the weight/colon length ratio and attenuation of the other symptoms of colitis. There was no variation in the concentration of TNF- α and IL-10, however, the inflammatory cytokines IL-12 and IL-6 showed lower levels in the healthy control groups, without differing from the CS and CSP groups. Histological analysis showed that the whey protein associated with the probiotic (CSP) significantly reduced the intensity of the inflammatory infiltrate, but did not recover the integrity of the intestinal epithelium. **Conclusion:** The results demonstrate that whey protein, alone or in combination with *L. rhamnosus* GG, can be a non-pharmacological alternative to help control colitis.

Keywords: Colitis; Probiotic; Whey; Microbiota.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATG16L1	Gene 16-like 1 relacionado à autofagia
C	Controle sem indução da colite
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CL	Com indução da colite e sem tratamento
COX-2	Ciclooxygenase-2
CS	Com colite quimicamente induzida e que receberam proteína do soro de leite
CSP	Com colite quimicamente induzida e que receberam proteína do soro de leite e a cepa probiótica
CU	Colite ulcerativa
DC	Doença de Crohn
DII	Doenças inflamatórias intestinais
DNBS	Ácido 2,4-dinitrobenzenesulfônico
DSS	Dextran Sulfato de Sódio
EH-WPC	Proteína soro de leite extensivamente aquecido
EPS	Exopolissacarídeo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
HE	Hematoxilina/eosina
IAD	Índice de atividade da doença
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
i-NOS	Óxido nítrico sintase induzível
L.	<i>Lactocaseibacillus</i>
LPO	Peroxidação lipídica
MPO	Atividade da enzima mieloperoxidase
MP-WPC	Proteína soro de leite levemente pasteurizado
MUC	Mucinas
NOD2	Gene do domínio 2 de oligomerização de ligação a nucleotídeos
SOCs-1	Supressor da sinalização de citocinas 1
SPF	Specific Pathogen Free
SPSS	Statistical Package for the Social Science
TNF-α	Fator necrose tumoral alfa
UFC	Unidade formadora de colônias
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
WPC	Proteína do soro de leite concentrada
α-La	α -lactoalbumina
β-Lg	β -lactoglobulina

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1 – Variação ponderal dos animais (%) dos diferentes grupos experimentais	33
Tabela 2 – Relação média do peso/comprimento do colón dos grupos experimentais.	39

Lista de Figuras

	Página
Figura 1 – Esquema do protocolo experimental para estudo da colite.	29
Figura 2 – Escores de IAD dos diferentes grupos experimentais ao longo do experimento.	35
Figura 3 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre os níveis de citocinas no cólon.	40
Figura 4 – Escores das pontuações histopatológicas dos cólons dos grupos experimentais analisados.	45
Figura 5 – Fotomicrografias representativas de seções distais do cólon de camundongos coradas com hematoxilina e eosina.	46
Figura 6 – Composição da microbiota fecal dos animais dos grupos experimentais em diferentes tempos representados por filos.	48
Figura 7 – Composição da microbiota fecal dos animais dos grupos experimentais em diferentes tempos representados por espécies.	49

Lista de Apêndices e Anexos

	Página
Apêndice 1 – Figura Suplementar 1. Variação ponderal dos animais (%) dos diferentes grupos experimentais.	70
Apêndice 2 – Tabela Suplementar 1. Escores de IAD dos diferentes grupos experimentais ao longo do experimento.	71

Sumário

	Página
Resumo	6
Abstract	7
Lista de Abreviaturas e Sigla	8
Lista de Tabela	9
Lista de Figuras	10
Lista de Apêndices e Anexos	11
Introdução	13
Objetivos	15
Revisão Bibliográfica	16
Materiais e Métodos	27
Resultados e Discussão	32
Conclusão	51
Referências	52
Apêndices	70

1 Introdução

As doenças Inflamatórias Intestinais (DII), representadas majoritariamente pela colite ulcerativa (CU) e doença de Crohn (DC), são complexas e provocam inflamações crônicas e recidivantes associadas ao trato gastrointestinal acometendo, principalmente, o colón, ceco e reto. Além disso, os sinais são semelhantes aos das gastroenterites simples, o que pode dificultar o diagnóstico da doença (BAUMGART et al., 2007). Os sintomas típicos das DII incluem diarreia, presença de sangue e muco nas fezes, dor abdominal, fadiga e perda de peso. Esses sintomas têm impacto direto no cotidiano do indivíduo, pois essa doença altera o bem-estar do paciente (DILLY et al., 2020).

Embora a incidência das DII esteja se estabilizando em muitos países ocidentais, em 2018, a prevalência excedeu 0,3% da população na América do Norte e na Europa e chegou a 0,7% no Canadá. A incidência e prevalência no Brasil mostram um notável aumento nas regiões mais desenvolvidas (Sul e Sudeste). Neste cenário, a prevalência de DII no Estado do Piauí (12,8 por 100.000) é significativamente menor do que no estado de São Paulo (52,6 por 100.000) (QUARESMA et al., 2019).

A etiologia das DII é multifatorial e está relacionada a fatores genéticos, ambientais e alteração na composição da microbiota intestinal, que resultam em perda da função protetora da barreira intestinal e exacerbação do processo inflamatório (FERRAZ, 2016).

O tratamento farmacológico das DII é complicado e envolve a administração de diferentes fármacos anti-inflamatórios (ácido 5 -

aminosalicílico, corticosteróides) e imunossupressores, cujo uso está associado a vários efeitos adversos, que prejudicam a efetividade e adesão ao tratamento (FORD et al., 2011; CORRÊA et al., 2017).

Dietas ricas em carboidratos simples, gorduras, alimentos processados à base de carne e baixa ingestão de fibra são associadas à alteração na composição da microbiota intestinal e produção de metabólitos, na resposta imune e na permeabilidade da mucosa intestinal, levando a uma inflamação sistêmica (MANZEL et al., 2014; KNIGHT-SEPULVEDA et al., 2015; STATOVCI et al., 2017). Por outro lado, a ingestão de probióticos, prebióticos e proteína do soro do leite tem sido associada à melhora no quadro das DII, com potencial para serem utilizados na redução de risco ou controle dos sintomas de tais doenças (LINDSAY et al., 2006; STEED et al., 2010; MEDINA-REMÓN et al., 2017).

Os mecanismos de ação associados aos probióticos e prebióticos envolve a modulação da microbiota e da produção de metabólitos, como substâncias antimicrobianas e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), manutenção da integridade da barreira intestinal e, conseqüente, redução da inflamação (CELIBERTO et al., 2018; SHEN et al., 2018). Já a proteína do soro de leite exerce seus efeitos via liberação de peptídeos bioativos e aminoácidos, que atuam na modulação da microbiota e do sistema imune e estimula a síntese de mucina (HERRERA-PONCE et al., 2019; MAQUEDA et al., 2012)

Diferentes estudos mostram que a cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG (antes *Lactobacillus rhamnosus* GG) atua de forma positiva na redução

das recidivas da colite (ZOCCO et al, 2006), controle da diarreia do viajante e infecção por *Clostridium difficile* (REID; BURTON, 2002), sendo que tais efeitos foram associados à sua capacidade de aderir e colonizar a mucosa intestinal e modular o sistema imune (SCHULTZ et al., 2003).

Frente ao exposto, acredita-se que a ingestão regular de uma bebida à base de proteína do soro do leite contendo *L. rhamnosus* GG possui potencial para auxiliar na atenuação dos sintomas e redução do risco de recidivas da colite. O estudo foi conduzido em modelo animal de colite induzida por DSS.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve por objetivo estudar o efeito da ingestão combinada de proteína do soro do leite e da cepa probiótica *L. rhamnosus* GG, na colite induzida em modelo animal.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Avaliar a evolução da colite nos diferentes grupos experimentais, pela determinação do índice de atividade da doença (IAD).
- Determinar a concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias nas amostras de cólon.
- Determinar as alterações histológicas no cólon dos animais.
- Determinar a composição da microbiota fecal dos animais.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Doenças Inflamatórias Intestinais

As DII, especialmente a DC e a UC, produzem um quadro de infecção crônica na mucosa intestinal, muitas vezes grave e associada à necessidade de hospitalização e consequentemente má qualidade de vida (NG et al., 2017).

Na fase ativa das DII são observados sintomas como diarreia, presença de sangue e muco nas fezes, dor abdominal, fadiga e perda de peso. Esses sintomas influenciam o cotidiano do indivíduo, pois alteram os hábitos alimentares, o bem-estar psicológico e com impacto em aspectos sociais como relacionamentos, lazer, escola e trabalho (LIMKETKAI et al., 2019; CZUBER-DOCHAN et al., 2020 apud DILLY et al., 2020).

Apesar da sintomatologia semelhante, a DC afeta diferentes regiões do intestino delgado e cólon, enquanto a CU restringe-se às últimas porções do cólon e reto (NG et al., 2017).

A causa da doença ainda não pode ser completamente explicada. Contudo, acredita-se que fatores genéticos podem promover uma maior sensibilidade à doença, e que a disbiose da microbiota intestinal e fatores ambientais (dieta, estresse, uso de antibióticos, etc) também estejam relacionados com o início e a progressão da inflamação intestinal (HANAUER, 2006).

Geneticamente, as DII fazem parte de um grupo de doenças bem descritas, com mais de 200 variantes genéticas associadas. Entre essas variantes, gene do domínio 2 de oligomerização de ligação a nucleotídeos

(NOD2) e gene 16-like 1 relacionado à autofagia (ATG16L1), são consideradas fundamentais. NOD2 é expresso em macrófagos, células dendríticas, células epiteliais intestinais, enquanto a proteína ATG16L1 é expressa no cólon, intestino delgado, células epiteliais intestinais e leucócitos. NOD2 detecta peptídeos da parede de bactérias e promove sua eliminação. ATG16L1 relaciona-se ao processo de autofagia, desempenhando um papel fundamental na manutenção da homeostase imunológica no intestino. Variações genéticas no NOD2 e ATG16L1 causam alterações no reconhecimento e eliminação bacteriana, afetando a saúde intestinal. As variantes de risco genéticas apenas predis põem os indivíduos à doença, e a presença de fatores modificáveis, como dieta e composição da microbiota intestinal, parecem ter um papel importante na gênese da doença (PIERDOMENICO, 2016; PUGAZHENDHI et al., 2017).

Os padrões alimentares ocidentais contêm, em geral, poucas frutas, legumes e grãos integrais, sendo baseados na ingestão de carne vermelha e alimentos com altos teores de carboidratos simples e gorduras. Esse tipo de dieta foi associado a alterações na composição de microrganismos da microbiota intestinal e a um risco aumentado de desenvolver DII. O mecanismo envolvido nessa maior susceptibilidade inclui a alteração barreira intestinal, translocação de patógenos entéricos para a lâmina própria e a estimulação do sistema imune (GU; FEAGINS, 2020). Além disso, pacientes acometidos por DII apresentam alterações nos hábitos alimentares, sendo de extrema importância a implementação da terapia dietética, que visa o

consumo de alimentos que diminuam a atividade da doença e melhorem o estado nutricional (CZUBER-DOCHAN et al., 2020).

A microbiota intestinal, definida como o conjunto de microrganismos que coloniza o intestino, é formada por 100 trilhões de microrganismos, representados principalmente pelas bactérias dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, que vivem em simbiose. Considerando a teoria de colonização intrauterina, desde a gestação o feto começa a ser colonizado por microrganismos e a formar o seu microbioma (conjunto de microrganismos e seus genes), que irá influenciar a sua saúde durante a vida. O tipo de parto é um fator determinante para a diversidade e abundância de cepas existentes no intestino, onde o parto vaginal contribui para a maior diversidade da microbiota. Uso de antibióticos, exposição ao estresse, demografia e tipo de dieta também são fatores relacionados à modulação da microbiota (OSADCHIY et al, 2019).

A disbiose representa um desequilíbrio da microbiota intestinal onde a proporção de bactérias patogênicas torna-se superior ao número de microrganismos benéficos e comensais. Esta alteração possibilita uma maior sensibilidade e consequentemente invasão da mucosa intestinal por patógenos, levando à ativação do sistema imune a ponto de ocasionar respostas inflamatórias exacerbadas. Esse processo pode contribuir para o surgimento da CU, DC, enterocolite necrosante e doenças autoimunes (YASMINE B.; TIMOTHY, 2014).

A microbiota intestinal de portadores de DII é caracterizada por baixa diversidade microbiana, abundância reduzida de *Bifidobacterium* spp.

Lactobacillus spp. e *Faecalibacterium prausnitzii*, e uma maior abundância de *Escherichia coli* e *Clostridium difficile*, com consequente redução nas concentrações de AGCC. O butirato, um AGCC considerado a principal fonte de energia para os colonócitos, influencia a manutenção da integridade da barreira intestinal (JOSENS et al., 2011; SOKOL et al., 2008). Neste sentido, a modulação da microbiota intestinal possui um promissor potencial terapêutico para o tratamento das DII e melhora das condições clínicas da doença (SHEN et al., 2018).

A patogênese da colite ulcerativa engloba a quebra da homeostase da mucosa intestinal, que provoca excessivas respostas inflamatórias no organismo. O processo envolve a ação de citocinas, responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias para a mucosa intestinal e manutenção da inflamação (OHMAN; SIMRÉN, 2010; ARAB et al., 2014). A citocina imunorreguladora nomeada fator necrose tumoral alfa (TNF- α) favorece a inflamação, estimulando a produção de diferentes mediadores como metabólitos lipídicos, outras citocinas e espécies reativas de oxigênio (ERO), que promovem um estresse oxidativo. Em modelos de colite também se verifica aumento da expressão do óxido nítrico sintase induzível (i-NOS) e de óxido nítrico, relacionados ao desenvolvimento da inflamação (FIOCCHI, 1998; ARAB et al., 2014).

O tratamento farmacológico para as DII envolve o uso de ácido 5-aminosalicílico (mesalazina), azatioprina, mercaptopurinas, ciclosporina e corticosteróides (glicocorticoide). A introdução de produtos biológicos, como anticorpos monoclonais anti-TNF- α nos tratamentos, demonstrou eficácia

clínica, mas também aumentam o risco de infecção e hipersensibilidade (FORD et al., 2011; CORRÊA et al., 2017).

Mesmo que essas inovações farmacológicas melhorem os sintomas e consequentemente a qualidade de vida dos pacientes, os medicamentos administrados para induzir a remissão da doença causam efeitos colaterais (alterações renais, acne, edema, distúrbios do sono e do humor, intolerância à glicose e dispepsia), que muitas vezes reduzem a adesão ao tratamento (LICHTENSTEIN et al., 2009; DERWA et al., 2017).

Algumas abordagens alternativas para melhorar a saúde intestinal, reduzir os sintomas e aumentar os períodos remissão da colite têm se mostrado promissoras, entre elas destaca-se o uso de dietas com potencial anti-inflamatório e capazes de modular o sistema imune e a microbiota (CELIBERTO et al., 2018).

3.2 Estratégias dietéticas para controle das DII

As estratégias dietéticas adotadas para o controle das DII incluem a restrição calórica, para o intestino descansar e se recuperar, e a ingestão de alimentos funcionais (CELIBERTO et al., 2018; COSTA et al., 2021).

O termo alimentos funcionais refere-se a produtos naturais ou processados que, necessariamente, “devem promover a saúde, reduzir o risco de doenças e/ou controlar os seus sintomas, sem fazer referência à prevenção ou tratamento de doenças”. Por possuírem uma composição diferenciada, conferem propriedades específicas que podem atuar no organismo favorecendo uma ou mais funções metabólicas e,

consequentemente, melhoram a saúde, o bem-estar e reduzem o risco de desenvolver algumas doenças (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA 1999a; 1999b; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; MARTIROSYAN; KANYA; NADALET, 2021).

Entre os alimentos funcionais com potencial para auxiliar no controle das DII estão as substâncias prebióticas, os microrganismos probióticos (CELIBERTO et al., 2018) e proteína do soro de leite (COSTA et al., 2021).

3.3 Probióticos e DII

Uma forma de reverter a disbiose observada em pacientes portadores de DII envolve a administração de probióticos – microrganismos vivos, que quando administrados em doses apropriadas, conferem um benefício ao hospedeiro (HILL et al., 2014).

Os microrganismos probióticos mais estudados são *Bifidobacterium* spp. e diferentes gêneros de bactérias lácticas, com destaque para *Lactobacillus* spp. pois, já existem comprovações científicas de efeitos benéficos associados a tais microrganismos e suas diferentes espécies e cepas, além de serem considerados seguros para o consumo humano (PLAZA-DIAZ et al., 2019).

Lactobacillus rhamnosus GG é uma das cepas mais estudadas quanto às suas propriedades probióticas e exibe atividade benéfica em modelos animais e estudos clínicos envolvendo DII e outras doenças gastrointestinais incluindo: redução da inflamação da mucosa, modulação da

resposta imune e da microbiota intestinal (ZOCCO et al., 2006; ROSELLI et al., 2006; SEGERS, LEBEER, 2014; SZAJEWSKA et al., 2015; FLACH et al., 2018).

Os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos benéficos dos probióticos incluem a produção de AGCC, a exclusão de patógenos do intestino por competição por espaço e nutrientes, melhora da função de barreira epitelial e produção de peptídeos antimicrobianos. Além disso, os probióticos demonstraram aumentar a secreção de mucina das células caliciformes intestinais, melhorando a camada protetora de muco. Agem ainda modulando benéficamente o sistema imunológico do hospedeiro, através da estimulação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , e das células T reguladoras (Treg). Destaca-se que os efeitos observados são dependentes da cepa e dose utilizadas (YASMINE.; TIMOTHY, 2014).

Alguns estudos foram conduzidos com o objetivo de avaliar a ingestão combinada de leite e probióticos no controle da colite.

Kato et al. (2004) concluíram que a ingestão regular de um leite fermentado com *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus acidophilus* resulta em melhora nos parâmetros clínicos e histológicos de pacientes acometidos por colite ulcerativa moderada e os resultados foram superiores aos obtidos apenas com o tratamento medicamentoso convencional (salazosulfapiridina ou ácido 5 -aminosalicílico).

Lee et al. (2015) evidenciaram que o efeito de probióticos na saúde intestinal é dependente da cepa e da matriz alimentar e que *Lactocaseibacillus*

casei BL23 (antes *Lactobacillus casei* BL23) apresentou um efeito protetor somente quando associado ao leite.

Yoon et al. (2019) avaliaram o efeito de um leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* em modelo animal de colite induzida por DSS. O consumo regular do produto fermentado levou à modulação benéfica do sistema imune (redução de IL-6 e aumento de IL-4 e IL-10).

Yan et al. (2020) estudaram o efeito de três leites fermentados (*Bifidobacterium longum subsp. longum* YS108R; *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB12; e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*). O leite fermentado YS108R diminuiu o índice de atividade da doença (IAD), a atividade da mieloperoxidase, a expressão de IL-6 e IL-17A, manteve as proteínas de junção e oclusão e aumentou a expressão de mucina 2 (MUC 2). O produto ainda modulou a microbiota intestinal, impedindo o aumento de *Enterobacteriaceae*.

3.4 DII e proteína do soro de leite

O soro do leite (*whey protein*) é um subproduto da indústria de laticínios, sendo produzido durante a elaboração do queijo. Essa fonte proteica é composta por β -lactoglobulina (45-57%), α -lactoalbumina (15–25%), imunoglobulina (10–15%), glicomacropéptido (10–15%), albumina sérica bovina (10%), lactoferrina ($\pm 1\%$) e lactoperoxidase ($<1\%$) (MADUREIRA et al., 2010; SOUSA et al., 2012; BENTSEN et al., 2013).

A proteína do soro de leite é considerada uma fonte proteica de alto valor biológico, pois contém todos os aminoácidos essenciais e necessários para a manutenção da nutrição e saúde humana, como lisina, isoleucina, treonina e triptofano (ADAMS; BROUGHTON, 2016; HERRERA-PONCE et al., 2019).

A ingestão de proteína do soro de leite também tem sido associada a um efeito protetor em relação às DII devido a presença de peptídeos bioativos e aminoácidos de cadeia ramificada, isoleucina, leucina e valina, que são liberados após hidrólise, e podem, indiretamente, afetar a resposta glicêmica e inibir o desenvolvimento da colite (AUESTAD; LAYMAN, 2021). A ação anti-inflamatória da proteína do soro do leite deve-se à presença de ácidos graxos poli-insaturados, como os isômeros de ácido linoleico conjugado, e oligossacarídeos, que foram associados à redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL – 6, IL – 1 β e TNF - α . Sabe-se que concentrações elevadas de IL – 6, IL - 1 β , e TNF- α estão presentes em pacientes portadores de colite e em modelos experimentais de colite induzida (ARAÚJO et al., 2017).

Um estudo em modelo animal, avaliou o efeito de concentrado de proteína de soro de leite levemente pasteurizado (MP-WPC) em comparação com outro extensivamente aquecido (EH-WPC) na saúde intestinal. A proteína do soro do leite levemente pasteurizada limitou a inflamação (redução na expressão colônica de IL-1 β , IL-8 e TNF- α) e estimulou a maturação intestinal em leitões prematuros (NAVIS et al., 2020).

Araújo et al. (2017) mostraram que a ingestão de proteína do soro do leite de cabra resultou em melhora dos sintomas clínicos da colite, como diarreia, presença de sangue oculto nas fezes, perda de peso e lesões macroscópicas no epitélio intestinal de camundongos induzidos à colite por ácido 2,4-dinitrobenzenesulfônico (DNBS). Nota – se um efeito protetor desse suplemento, que poderia ser consumido por indivíduos para redução dos sintomas associados às DII. Além disso, o soro do leite promoveu aumento nos supressores de sinalização de citocinas (SOCs – 1) e redução nos níveis de correlação da molécula de adesão intercelular (ICAM – 1), fato que pode melhorar o quadro de inflamação intestinal por reduzir a produção de citocinas pro-inflamatórias.

Resultados positivos relacionados à ingestão de proteína do soro de leite também foram identificados em análise histopatológica dos segmentos do cólon de camundongos e na minimização da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), que é um marcador da infiltração de neutrófilos. Ainda, observa-se melhora na arquitetura intestinal e aumento das células caliciformes que compõem o epitélio intestinal e estão envolvidas na produção de peptídeos – chave na defesa, reparo epitelial, síntese de glicoproteínas e secreção de mucinas (MUC – 2) e mucinas ligadas a membrana epitelial (MUC – 1 e MUC – 3) (KIM et al., 2010).

O efeito da ingestão combinada de proteína do soro de leite e probióticos já foi avaliada em alguns estudos.

Ghasemi-Niri et al. (2011) estudaram o efeito de *Lactocaseibacillus casei* (antes *Lactobacillus casei*) cultivado em soro de leite na redução do risco

e auxílio do tratamento de colite induzida por TNBS em modelo animal. Os resultados mostraram que a ingestão do probiótico após a indução da colite resultou em melhora dos escores histopatológicos e bioquímicos de TNF- α , MPO e peroxidação lipídica (LPO). Porém, a administração do mesmo probiótico antes da indução não alterou o desenvolvimento da doença.

Gholami et al. (2016) estudaram o efeito da ingestão regular de proteína do soro do leite fermentada com *Lactocaseibacillus casei* (antes *Lactobacillus casei* - 10^8 UFC) no tratamento e prevenção da colite induzida por DNBS em ratos. Os resultados evidenciaram que o tratamento teve efeitos positivos em marcadores inflamatórios como MPO, peroxidação lipídica e TNF- α , e nos achados histológicos, porém a abordagem não preveniu a doença.

Chaves et al. (2018) conduziram um estudo para averiguar o efeito do consumo diário de um leite suplementado com proteína do soro de leite e suco de romã, com adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB12, no desempenho físico, motilidade intestinal, estrutura das vilosidades, marcadores inflamatórios e microbiota intestinal de ratos submetidos a exercícios físicos agudos de alta intensidade. O grupo de animais que recebeu o suplemento exibiu aumento da motilidade intestinal, manutenção da composição da microbiota e aumento na expressão de proteínas estruturais, com consequente fortalecimento da barreira intestinal.

Considerando o exposto, a hipótese desse estudo é que a ingestão de soro de leite e da cepa probiótica *L. rhamnosus* GG atuará de forma positiva na redução de risco e atenuação dos sintomas da colite induzida em modelo

animal e expandirá os conhecimentos em relação a participação da microbiota na patogênese da doença.

4 Materiais e métodos

4.1 Materiais

Proteína do soro de leite concentrada em pó, contendo 80% de proteína, da marca comercial Sooro (WPC 80%), gentilmente doada pela empresa Sooro Renner Nutrição S.A. (Paraná, Brasil) e a cepa comercial *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG® - antes *Lactobacillus rhamnosus*), da marca Culturelle®, adquirida no mercado nacional.

4.2 Animais e dietas

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6J, livres de patógenos específicos (*SPF – Specific Pathogen Free*), procedentes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com quatro semanas de idade. Os animais foram alojados em caixas de polietileno, dispostas em estante ventilada (Alesco E-520, Brasil) com ciclo claro e escuro de 12 horas e temperatura controlada de 22°C ± 4°C.

Imediatamente antes da administração, o soro de leite comercial foi dissolvido em água esterilizada (0,1042g/5mL) e, a seguir, a cepa *L. rhamnosus* GG (LGG®) foi incorporada à temperatura ambiente, em quantidade suficiente para atingir 10⁸ UFC/mL.

4.3 Protocolo experimental

O protocolo experimental foi conduzido no Departamento de Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCF – UNESP, Araraquara (Protocolo CEUA/FCF/CAr: 29/2020).

A colite foi induzida quimicamente, pela administração diária de DSS 3% (PM= 36.000 – 50.000), dissolvido na água oferecida aos animais, por um período de sete dias. A ingestão de água e ração comercial padrão (Neovia Nutrição e Saúde Animal Ltda) esterilizada foi realizada *ad libitum*, durante todo o experimento.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos (n=10): Controle (C) = sem indução da colite.

Colite (CL) = com colite quimicamente induzida e sem tratamento.

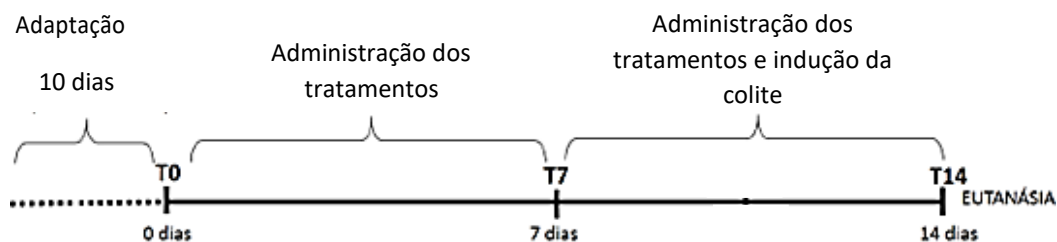
Colite soro de leite (CS): com colite quimicamente induzida e que receberam proteína do soro de leite.

Colite soro de leite e probiótico (CSP): com colite quimicamente induzida e que receberam proteína do soro de leite e a cepa probiótica.

O volume administrado de cada tratamento (soro de leite ou soro de leite com adição de probiótico) respeitou a capacidade gástrica dos animais (0,3 mL) e garantiu a ingestão de 0,2g/kg de peso de proteína e 8 log UFC da cepa probiótica. Os animais dos grupos C e CL receberam, diariamente, o mesmo volume de água esterilizada para simular o estresse da gavagem.

O protocolo experimental teve duração de 14 dias (Figura 1), sendo precedido por um período de adaptação de 10 dias (CELIBERTO et. al, 2018).

Figura 1 - Esquema do protocolo experimental para estudo da colite.



Fonte: autoria própria.

Amostras de fezes frescas para a análise de composição da microbiota foram coletadas nos tempos T0, T7 e T14. No final do período experimental, os animais foram anestesiados usando 16 mg/kg de xilazina e 90 mg/kg de quetamina, administrados pela via intraperitoneal e eutanasiados por exsanguinação, seguida de deslocamento cervical.

Após a eutanásia, o cólon dos animais foi retirado, lavado com solução salina 0,9% e submetido à avaliação macroscópica. A seguir foi aliquotado e adequadamente armazenado para a avaliação histológica e de citocinas.

4.4 Determinação do índice de atividade da doença (IAD)

A evolução da colite foi avaliada durante o período de indução, seguindo metodologia proposta por Murthy et al. (1993). Esse método leva em consideração os seguintes parâmetros: perda de peso corporal, consistência das fezes e presença de sangramento retal oculto ou aparente. A presença de sangue oculto foi avaliada usando um kit comercial (kit Hemoplus - Newprov).

4.5 Análise macroscópica e histológica do cólon

A análise macroscópica foi realizada pela avaliação da relação peso/comprimento do cólon (mg/mm), aferidos em balança analítica e com paquímetro analógico (precisão de 0,05 mm), respectivamente (WHITTEM; WILLIAMS; WILLIAMS, 2010).

Para a análise histológica, amostras do cólon foram abertas longitudinalmente, fixadas em formaldeído 10% e rotineiramente processadas. Cortes de aproximadamente 5µm foram montados em lâminas de vidro, corados com hematoxilina/eosina (HE) e analisados em microscópio óptico para identificação de lesões características da inflamação (ERBEN et al., 2014).

Os escores histológicos foram calculados de acordo com metodologia de Erben et al. (2014), com adaptações. Os parâmetros avaliados foram: inflamação (escores do 1 ao 4); hiperplasia (escores do 1 ao 5); perda de células caliciformes (escores do 1 ao 4); criptas irregulares e perda de criptas, atribuindo-se 0 para nenhuma alteração ou scores entre 4 e 5, de acordo com a intensidade da alteração. A pontuação máxima que poderia ser obtida com este sistema era de 22 pontos.

4.6 Determinação de citocinas

Os níveis de IL-10, IL-12-p40, IL-6 e TNF- α foram medidos em sobrenadantes de homogenato de cólon. Amostras de cólon, previamente pesadas, foram armazenadas em tampão fosfato com inibidor de protease, à -80°C, até o momento da análise. A concentração das citocinas foi

determinada por ELISA, utilizando kits comerciais, de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Para a quantificação das citocinas, uma curva padrão foi construída nas seguintes faixas de concentração: 15,6 a 1000 pg/mL para IL-6, IL-12-p40 e TNF- α e 31,3 a 3000 pg/ mL para IL-10 (OSMAN et al., 2006).

4.7 Análise da composição da microbiota fecal

Amostras das fezes dos animais foram coletadas durante o período experimental (T0, T7 e T14) e armazenadas -80°C até o momento das análises. A extração do DNA foi feita com a utilização do kit comercial QIAampFast DNA Stool (Qiagen, EUA) e o sequenciamento do material genético foi realizado no equipamento Illumina MiSeq® System (Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica para sequenciamento de DNA, UNESP, FCAV, Jaboticabal) com MiSeq Reagent Kit v3, de acordo com as instruções do fabricante. A região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA bacteriano foi amplificada usando 2 × KAPA HiFiHotStart Ready mix DNA polimerase (Kapa Biosystems Ltd.) e os seguintes primers V3-V4F: 5'; TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG 3'; V3-V4R: 5'; GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC 3'. Os dados do sequenciamento das amostras foram previamente analisados e agrupados segundo a taxonomia, usando o aplicativo BaseSpace 16S Metagenomics da Illumina (<https://basespace.illumina.com/>).

O conjunto de dados do sequenciamento (reads) foi classificado utilizando a base de dados Greengenes (McDonald et al., 2012), alcançando sensibilidade em nível de espécie. A abundância relativa (%) de táxons foi estimada por comparação com o número total de sequências obtidas para a amostra.

4.8 Análise estatística dos resultados

Os dados da variação dos pesos e IAD não apresentaram distribuição normal e foram avaliados por ANOVA mista com ajuste de Greenhouse-Geisser, ($p < 0,05$) e pós-teste de Sidak ($p < 0,05$). Para a análise da relação peso/comprimento do cólon (dados paramétricos e homocedásticos) utilizou-se ANOVA one - way, e pós-teste de Ryan Einot-Gabriel-Welsch Range, ($p < 0,05$). Para os dados de concentração de citocinas foi utilizado o teste não – paramétrico de Kruskal - Wallis e pós teste de Dunn ($p < 0,05$). Os escores histopatológicos não apresentaram distribuição normal e homogeneidade por essa razão, os dados foram convertidos em ranks. Foi realizado o teste de ANOVA one-way e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Todos os dados foram avaliados nos programas estatísticos Bioestat e *Statistical Package for the Social Science (SPSS)*.

5 Resultados e discussão

5.1 Variação ponderal e IAD

Os pesos dos animais dos quatro grupos estudados foram avaliados durante os sete dias de indução da colite (Tabela 1 e Apêndice 1).

Tabela 1. Variação ponderal dos animais (%) dos diferentes grupos experimentais.

TEMPO	GRUPO			
	C	CL	CS	CSP
T0	100,00±0,00 ^{aA}	100,00±0,00 ^{aA}	100,00±0,00 ^{aA}	100,00±0,00 ^{aA}
T1	100,51±0,76 ^{aA}	99,07±0,18 ^{aA}	97,12±3,08 ^{aB}	99,00±0,71 ^{aAB}
T2	100,47±1,06 ^{aA}	97,93±0,52 ^{aB}	100,26±2,58 ^{aA}	99,51±0,99 ^{aA}
T3	100,42±1,00 ^{aA}	97,32±0,53 ^{aBC}	100,12±3,85 ^{aA}	99,55±1,82 ^{aA}
T4	100,53±0,99 ^{aA}	95,64±2,50 ^{bC}	101,24±4,18 ^{abA}	99,14±1,92 ^{abA}
T5	100,28±1,22 ^{aA}	94,96±3,40 ^{bC}	97,70±4,69 ^{abAB}	96,51±3,18 ^{abBC}
T6	100,78±1,34 ^{aA}	93,50±3,69 ^{bC}	93,79±2,90 ^{bC}	95,84±2,10 ^{bC}
T7	100,88±1,27 ^{aA}	90,94±5,90 ^{bD}	92,30±3,23 ^{bC}	94,76±2,24 ^{bC}

Nota: letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos no tempo avaliado. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos avaliados. Dados avaliados por ANOVA mista e pós-teste de Sidak ($p < 0,05$). Valores apresentados pela média $\pm$ desvio-padrão. **Grupo C:** animais saudáveis e sem tratamento. **Grupo CL:** animais com colite induzida e sem tratamento. **Grupo CS:** animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite. **Grupo CSP:** animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite e a cepa probiótica. Fonte: Autoria própria, 2021.

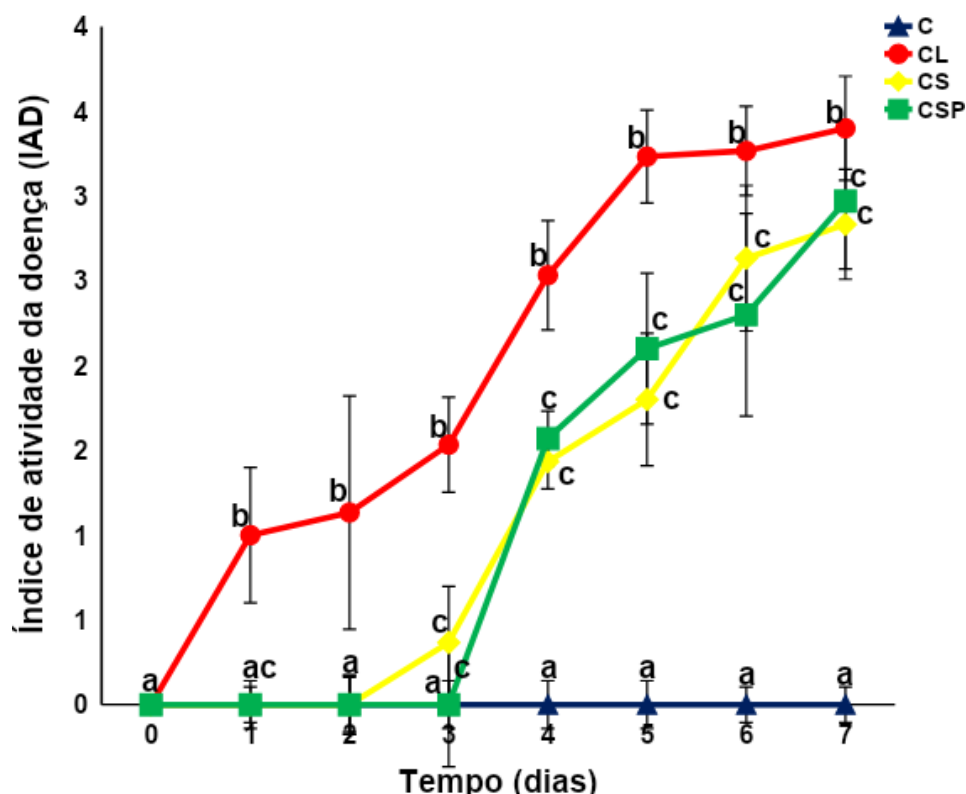
A ANOVA mista mostrou que há efeito do tempo, da interação tempo e grupos e dos grupos sobre o peso dos camundongos. De acordo com Murthy et al. (1997) a perda de peso durante a indução da colite é indicativa da gravidade da doença e quando esse parâmetro está entre 5 e 10%, é considerado um sintoma moderado.

O peso dos animais sadios (C), como esperado, apresentou pequena elevação durante os sete dias de indução, enquanto os grupos com colite induzida apresentaram redução de peso em função do agravamento da doença. O grupo que não recebeu tratamento (CL) apresentou a maior perda de peso no final do protocolo experimental (média de 9,1%). Por outro lado, a perda de peso durante a indução da colite foi minimizada pela ingestão de

proteína do soro de leite (CS 7,7%) ou de proteína do soro de leite e probióticos (CSP – 5,4%). Além disso, é importante destacar que até o quinto dia de indução, a variação ponderal dos grupos CS e CSP foi semelhante ao do grupo C, sem diferir do grupo CL ($p>0,05$), indicando que a proteína do soro de leite, sozinha ou em associação à cepa probiótica, reduz a perda de peso associada à colite.

IAD é utilizado para avaliar a evolução da colite e baseia-se na perda de peso corporal, consistência das fezes e presença de sangramento retal oculto ou aparente (MURTHY et al. 1993). Diante disso, a redução de peso influenciou o IAD dos quatro grupos experimentais (Figura 2) e (Apêndice 2).

Figura 2. Escores de IAD dos diferentes grupos experimentais ao longo do experimento.



Dados avaliados por ANOVA mista não paramétrica e pós-teste de Sidak ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa no tempo avaliado. **Grupo C:** animais saudáveis e sem tratamento. **Grupo CL:** animais com colite induzida e sem tratamento. **Grupo CS:** animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite. **Grupo CSP:** animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite e a cepa probiótica. Fonte: Autoria própria, 2021.

A ANOVA mista para dados não paramétricos mostrou que há efeito do tempo, da interação tempo e grupos e dos grupos sobre o IAD. Os animais do grupo controle mantiveram-se saudáveis durante o experimento, sem apresentarem alterações na consistência ou constatação de sangramento oculto/aparente nas fezes. Já os animais dos grupos que receberam o DSS (CL, CS e CSP) exibiram os sinais característicos de colite, fato evidenciado pelo aumento do IAD. Os animais dos grupos CL apresentaram presença de sangue oculto nas fezes a partir do segundo dia de indução da colite e sangue

aparente do quarto ao sétimo dia. A consistência das fezes foi alterada no primeiro dia para pastosa, acompanhada por uma redução no peso (1%) e a partir do quinto dia os animais apresentaram diarreia, resultando em um IAD superior ao do grupo C já no final do primeiro dia de indução.

A ingestão de proteína do soro do leite com adição de probiótico (CSP) resultou em redução nos sintomas da colite durante o período experimental, refletindo no IAD, que se manteve sem diferença do controle saudável até o terceiro dia de indução ($p < 0,05$). Os animais dos grupos CS e CSP apresentaram diarreia somente no sétimo dia e o sangue aparente foi identificado no CS a partir do sexto dia e no grupo CSP apenas no último dia do protocolo. Um ponto a ser destacado é que os IAD dos grupos CS e CSP foram significativamente diferentes comparados ao grupo CL durante todo o período experimental ($p < 0,05$), indicando seu efeito positivo no controle dos sintomas da colite. Porém, a associação proteína do soro de leite e cepa probiótica *L. rhamnosus* GG não potencializou os efeitos benéficos observados em relação ao IAD no final do protocolo.

Kaur et al. (2021) também constataram o efeito protetor da proteína do soro do leite fermentada com o probiótico *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG MTCC – 5897 na colite induzida por DSS em modelo animal. A ingestão da bebida, antes da indução da colite, reduziu significativamente o IAD ($p < 0,01$) em comparação com o grupo induzido à colite e sem tratamento. Além disso, verificou-se melhora em parâmetros hematológicos e escores histológicos associados à progressão da doença.

A necessidade de proteína é maior na fase ativa da colite, devido à resposta proteolítica e catabólica, e, por isso, recomenda-se um aumento na ingestão desse macronutriente (acréscimo de 0,2 a 0,5g/ kg de peso corpóreo) em relação à quantidade recomendada para a população em geral (1 g/kg de peso corpóreo) (BISCHOFF et al., 2023).

Nesse estudo optamos por suplementar a dieta dos animais com 0,2g de proteína de soro de leite por kg de peso corpóreo e os resultados foram promissores. No entanto, alguns estudos optaram por administrar dietas contendo diferentes proteínas *ad libitum*. Em estudo conduzido por MA et al. (2021) avaliou-se o efeito da ingestão de dieta contendo proteína à base de leite (soro de leite e caseína), proteína da batata e proteína mista (proteína do leite e da batata) na evolução da colite induzida por DSS em modelo animal.

Os resultados mostraram que a ingestão diária das proteínas, independentemente da fonte, resultou em redução do encurtamento do cólon e da inflamação, com sintomas menos graves e leves danos aos tecidos, além de promover a regulação das respostas imunológicas e a preservação da barreira intestinal.

Além do aumento no aporte proteico e fornecimento de aminoácidos importantes para a manutenção da saúde, a proteína do soro do leite pode controlar a inflamação associada à colite e seus sintomas pelo efeito imunomodulatório, anti-inflamatório e pela modulação da produção e secreção de mucinas, proteínas envolvidas na manutenção da integridade da mucosa intestinal (ADAMS; BROUGHTON, 2016, ARAÚJO et al., 2017; HERRERA-PONCE et al., 2019).

O efeito de probióticos na evolução de colite é cepa dependente e os efeitos são variados, requerendo estudos específicos. Zocco et al. (2006) constataram que a ingestão regular de *Lactobacillus rhamnosus* GG ($1,8 \cdot 10^8$) preveniu episódios de recorrência em pacientes portadores de colite, durante o período de um ano. Son et al. (2019) avaliaram o efeito da cepa probiótica cepa *L. rhamnosus* GG, de um prebiótico (tagatose) e de um simbiótico (associação de *L. rhamnosus* GG e tagatose), na colite induzida por DSS em modelo animal. Os grupos que receberam o probiótico, o prebiótico e o simbiótico exibiram redução nos episódios de diarreia, menor perda de peso e preservação na estrutura do epitélio intestinal, em comparação ao grupo com colite induzida e sem tratamento.

5.2 Análise de peso/comprimento do cólon

A análise da relação peso/comprimento cólon é importante, pois o processo de inflamação intestinal causa encurtamento do cólon, espessamento e edema nas paredes do intestino (ARAÚJO et al., 2017). Dessa forma, espera-se que os grupos mais acometidos pela colite apresentem maior média para esse parâmetro.

A análise dos dados mostrou que o grupo induzido à colite e sem tratamento (CL) apresentou a maior média para a relação peso/comprimento do cólon, diferindo significativamente dos demais grupos, que foram semelhantes entre si (Tabela 2). Novamente, a ingestão de proteína do soro de leite e da combinação proteína do soro de leite e probióticos protegeram os animais durante o protocolo de indução à colite.

Tabela 2. Relação média do peso/comprimento do cólon dos grupos experimentais.

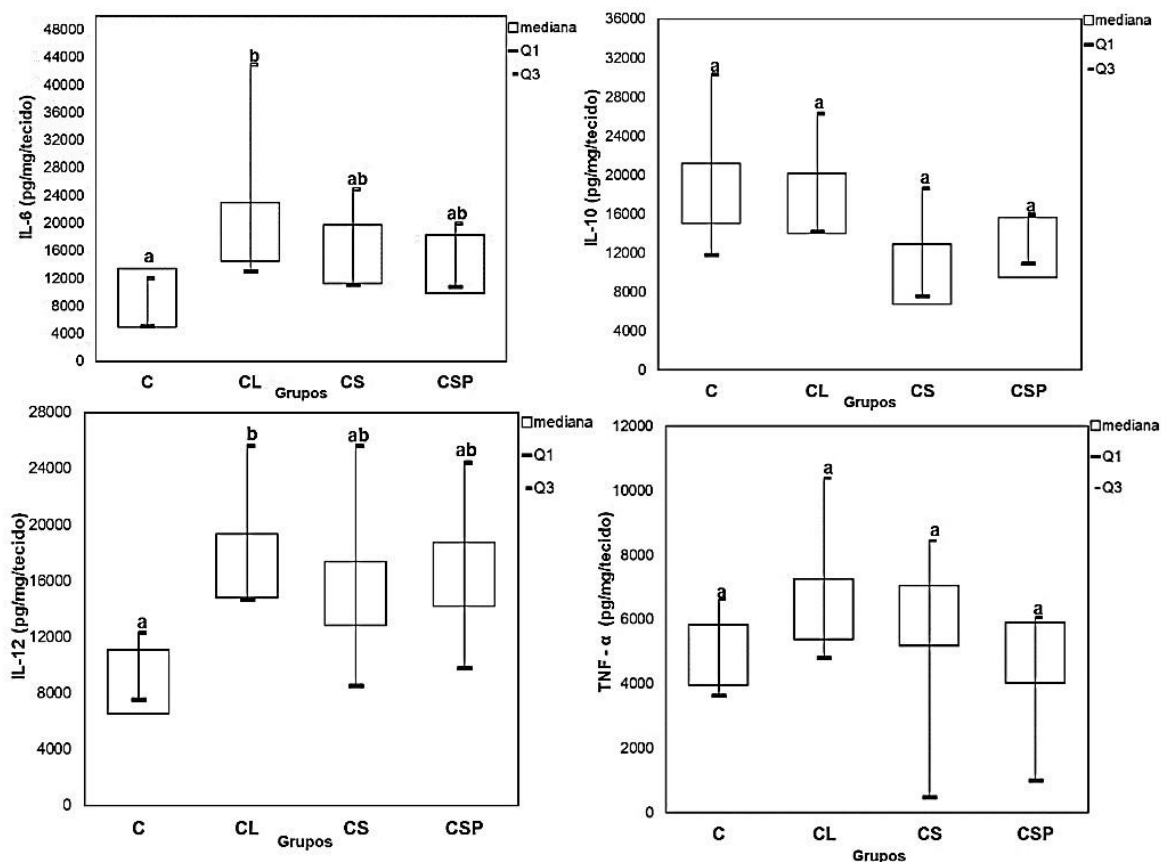
Grupo	Peso/comprimento cólon (mg/mm)
C	3,53 ^A
CL	4,24 ^B
CS	3,60 ^A
CSP	3,32 ^A

Nota: letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos segundo teste de médias ANOVA one – way e pós Teste Ryan Einot-Gabriel-Welsch Range, ($\alpha=0,05$). **Grupo C:** animais saudáveis e sem tratamento. **Grupo CL:** animais com colite induzida e sem tratamento. **Grupo CS:** animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite. **Grupo CSP:** animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite e a cepa probiótica. Fonte: Autoria própria, 2021.

5.3 Determinação de citocinas

Neste estudo foram avaliadas as concentrações das seguintes citocinas: IL-10, IL-6, IL-12 e TNF- α em amostras de cólon (Figura 3).

Figura 3. Efeito dos diferentes tratamentos sobre os níveis de citocinas no cólon.



Valores expressos em pg/mL/proteína. Teste de Kruskal-Wallis, Pós Teste de Dunn ($\alpha = 0,05$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos. Representação em diagrama de caixas das medianas das citocinas. **Grupo C:** animais saudáveis e sem tratamento. **Grupo CL:** animais com colite induzida e sem tratamento. **Grupo CS:** animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite. **Grupo CSP:** animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite e a cepa probiótica. Fonte: Autoria própria, 2021.

As concentrações de IL – 10 (citocina anti-inflamatória) e TNF – α (citocina pró-inflamatória) foram semelhantes entre os grupos estudados ($p > 0,05$), não sendo possível avaliar os efeitos dos tratamentos na resposta imune associada à colite e relacioná-la ao IAD.

O grupo controle (C), apresentou níveis de citocinas inflamatórias (IL-6 e IL-12) numericamente inferiores aos dos demais grupos, sendo

estatisticamente diferente dos grupos CL e semelhantes aos grupos tratados (CS e CSP), com grande variação nas respostas individuais dos animais.

As citocinas têm um papel importante no desenvolvimento das DII, pois controlam diferentes aspectos da resposta inflamatória. O equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na mucosa intestinal regula o desenvolvimento e a perpetuação potencial da inflamação da mucosa, em pacientes acometidos por DII (NEURACH et al, 2014).

A IL - 10 é uma citocina anti-inflamatória produzida pelos leucócitos em resposta à estímulos, podendo assim atuar na modulação inflamatória gastrointestinal. (SANDY et al., 2021). O aumento das concentrações de IL – 10 pode auxiliar na diminuição da gravidade da inflamação (aguda e crônica) característica da colite (DA CUNHA et al., 2020).

A participação do TNF – α na promoção do processo inflamatório associado à colite é bem descrita na literatura, atuando na proliferação, diferenciação e morte celular, além de estar associado à regulação das vias inflamatórias da ciclooxigenase-2 (COX-2) e do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (SAINI et al., 2016; WEINBERG et al., 2000).

Concentrações elevadas de IL-6 têm sido encontradas no sangue e epitélio intestinal de pacientes acometidos por DII (MITSUYAMA et al., 1991, NIKOLAUS et al., 2018) e de animais induzidos à colite por DSS (XIAO et al., 2016). Entretanto, estudos *in vitro* e em modelo animal indicam que a IL-6 também pode ter um efeito anti-inflamatório por inibir a produção de TNF- α (FIERS, 1991; MIZUHARA et al., 1994) e induzir a expressão do antagonista do receptor de IL-1 (ra) (TILG et al., 1994). Dessa forma, parece que o papel

da IL-6 em um determinado processo inflamatório é determinado pelo equilíbrio entre suas ações pró e anti-inflamatórias em diferentes tipos de células.

A família de IL-12 inclui as citocinas IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35, sendo que as duas primeiras compartilham o mesmo domínio (p40) e têm um papel importante na patogênese de DII. Estudos *in vivo* e *ex vivo* mostram que a IL-12 é produzida em altas concentrações na mucosa gástrica, lâmina própria e macrófagos em pacientes portadores de DC (PARRONCHI et al., 1997, PELUSO et al., 2006). Yen et al. (2006) concluíram que a administração de IL-23 acelera o início da colite e Yasuda et al. (2021) constataram que pacientes na fase aguda da colite exibem aumento na expressão de IL-12 e IL-23. Em nosso estudo foi utilizado o kit Elisa IL-12 p40, que pode incluir a determinação das duas citocinas.

Estudo conduzido por Stofilová et al. (2017) avaliou o efeito da cepa *Lactobacillus plantarum* LS/07 na colite induzida por DSS em ratos e os resultados mostraram efeito positivo na evolução da doença e modulação de citocinas. A ingestão da cepa probiótica reduziu a perda de peso, a diarreia,

limitou a diminuição da relação peso/comprimento do cólon e inibiu a destruição da mucosa intestinal. Tais efeitos benéficos foram atribuídos ao aumento da concentração da citocina anti-inflamatória IL-10 no cólon e à restauração de células caliciformes. Resultados diferentes podem ser explicados pela especificidade da cepa probiótica na modulação de citocinas.

É importante destacar, que em nosso estudo a quantificação de citocinas foi realizada somente no tempo final do protocolo (T14), quando o

IAD dos grupos CS e CSP já havia aumentado, indicando progressão do processo inflamatório. Como a determinação de citocinas não foi realizada nos períodos intermediários do protocolo experimental, quando os sintomas da colite dos grupos tratados ainda eram inferiores aos do grupo sem tratamento, não foi possível acompanhar a evolução da resposta imune durante todo o período de indução.

5.4 Análise histológica

Os cólons dos camundongos foram analisados histologicamente utilizando coloração H&E, sendo pontuados os seguintes parâmetros: inflamação, hiperplasia, perda de células caliciformes, criptas irregulares e perda de criptas. Os resultados das pontuações histológicas e as imagens representativas das alterações histológicas dos cólons dos animais são apresentados nas Figuras 4 e 5 respectivamente.

Os escores histopatológicos apresentaram diferenças significativas entre os grupos. O pós teste de Tukey revelou que todos os grupos foram diferentes entre si ($p < 0,05$).

Os cortes histopatológicos dos cólons dos camundongos saudáveis exibiram mucosa e submucosa com variabilidade de incidência do corte devido à dificuldade de inclusão das peças. Entretanto, foi possível observar na maioria dos cortes, ausência de modificações superficiais, ausência de pregas e presença de criptas e vilosidades, indicando dessa forma que os cortes não eram nem de estômago nem do intestino delgado.

No grupo saudável (C), as análises histológicas mostraram que a mucosa do cólon apresentou revestimento epitelial dentro da normalidade, com presença de criptas dispostas em formas retas e paralelas. O epitélio que revestia a luz do cólon era cilíndrico e estava associado à numerosas células caliciformes. Foi possível observar glândulas tubulares retas que eram sugestivas às chamadas de criptas de Lieberküm que se prolongavam até a muscular da mucosa. As túnicas circulares internas e longitudinais externas que constituem essa região da mucosa eram bem evidentes, mas delgadas. A submucosa era vascularizada com eventuais células adiposas.

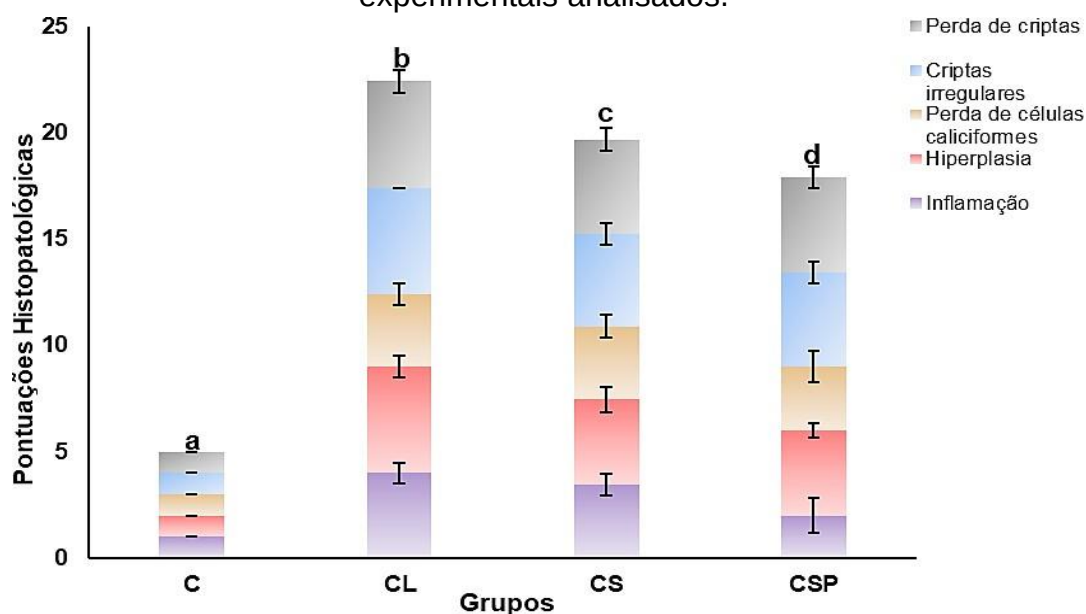
No grupo de camundongos expostos ao DSS, observou-se características de colite com nítidas áreas de destruição epitelial e ausência de criptas no colón. Foi possível observar alteração tecidual que se traduzia por destruição de parte do epitélio incluindo células caliciformes e criptas de Lieberküm. Não se observou alteração muscular da mucosa. O epitélio superficial apresentou-se achatado e com diminuição do número de células caliciformes. A mucosa teve intenso aumento do infiltrado inflamatório principalmente na lâmina própria. As células do infiltrado inflamatório foram predominantemente mononucleadas entremeadas por células polimorfonucleares e que, muitas vezes, se estendiam até a submucosa. Era possível observar delicados vasos sanguíneos congestionados por hemácias.

O grupo de animais que recebeu DSS e foram tratados com proteína do soro do leite (CS) ou proteína do soro do leite acrescido com probióticos (CSP), não exibiram melhora na arquitetura intestinal, que continuava mostrando áreas com ausência de criptas, intercaladas com áreas de mucosa

pobremamente preservadas e diminuição de células caliciformes. Contudo, foi possível diagnosticar que a ingestão de proteína do soro do leite com probióticos induziu à queda da quantidade de células inflamatórias tanto polimorfo quanto mononucleares que, muitas vezes, continuavam a se estender até a região submucosa, refletindo em menores pontuações histopatológicas (Figura 4).

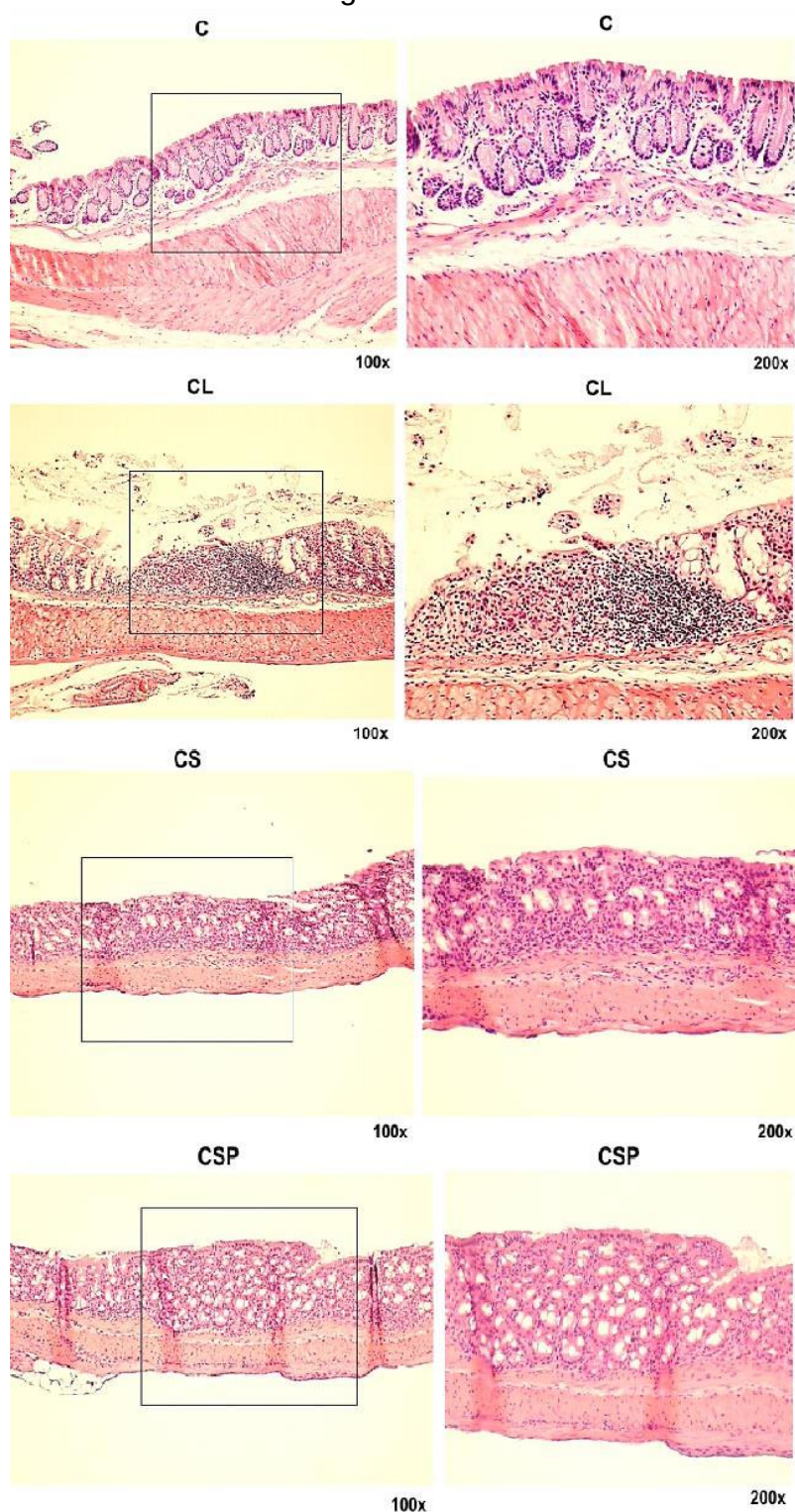
Portanto, pode afirmar que o tratamento com proteína do soro do leite associado com probióticos (CSP) foi capaz de reduzir significativamente a intensidade do infiltrado inflamatório, mas não recuperou as características morfológicas do epitélio intestinal, quando comparados ao grupo de camundongos saudáveis.

Figura 4. Escores das pontuações histopatológicas dos cólons dos grupos experimentais analisados.



Dados avaliados por ANOVA one-way não paramétrica e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos avaliados. **Grupo C:** animais saudáveis e sem tratamento. **Grupo CL:** animais com colite induzida e sem tratamento. **Grupo CS:** animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite. **Grupo CSP:** animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite e a cepa probiótica. Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 5. Fotomicrografias representativas de seções distais do cólon de camundongos coradas com H&E.



Grupo C: animais saudáveis e sem tratamento. **Grupo CL:** animais com colite induzida e sem tratamento. **Grupo CS:** animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite. **Grupo CSP:** animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite e a cepa probiótica. Fonte: Autoria própria, 2022.

Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Wan et al. (2022), onde foi avaliado o efeito de um exopolissacarídeo (EPS) produzido por *Lactocaseibacillus rhamnosus* ZFM231 (100, 300 e 600 mg) na colite induzida em modelo animal por DSS. Os animais do grupo saudável não tiveram alterações histológicas. Por outro lado, o grupo doente e sem tratamento, apresentou rompimento da mucosa do cólon, significativa infiltração de células inflamatórias e redução de células caliciformes. Os grupos que receberam 100 e 300 mg de EPS apresentaram sinais de inflamação e infiltração celular, contudo, foi observado melhora significativa quando comparado ao grupo com colite induzida e sem tratamento. Já, o grupo que recebeu o EPS na dose de 600mg apresentou criptas e estruturas da mucosa preservadas com pouca evidência de inflamação e infiltração celular, evidenciando o efeito anti-inflamatório do EPS produzido por *L. rhamnosus* ZFM231.

Outro estudo analisou o efeito da ingestão de *Lactocaseibacillus rhamnosus* Hao9 e curcumina em modelo animal de colite induzida por DSS. Os animais que receberam DSS e nenhum tratamento, apresentaram significativa destruição da mucosa colônica e das criptas. Em contraste, os grupos tratados com *Lactocaseibacillus rhamnosus* Hao9 e curcumina apresentaram melhora na arquitetura da cripta colônica e menores danos epiteliais superficiais (HAN et al., 2022).

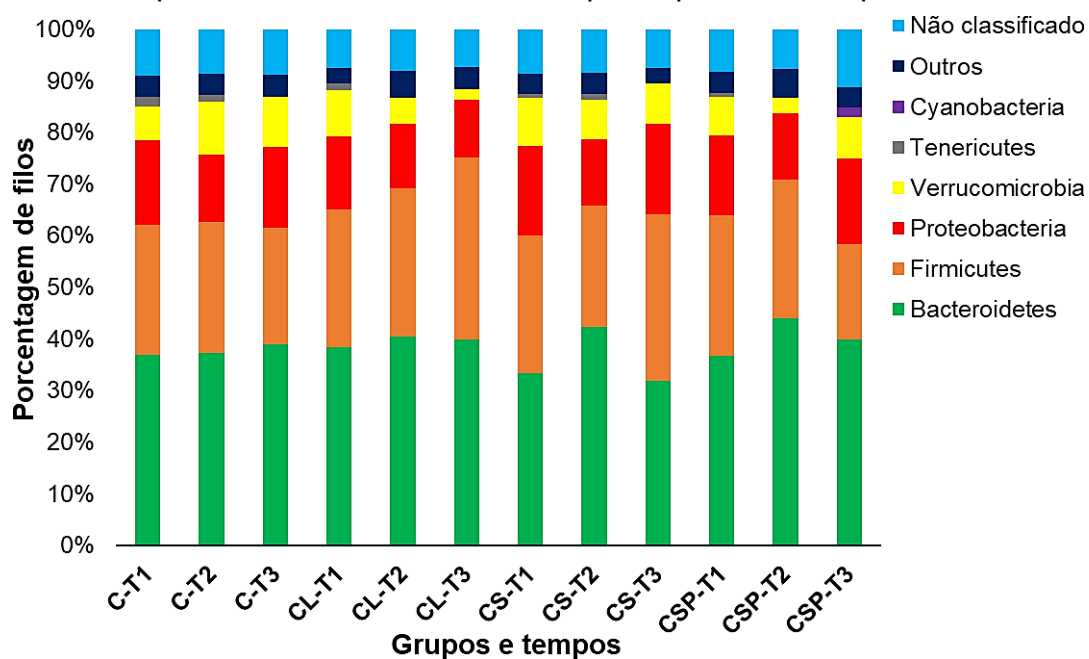
Kaur et al. (2021) avaliaram o efeito protetor de uma bebida à base de soro de leite fermentado com *Lactocaseibacillus rhamnosus* MTCC-5897 na colite induzida em camundongos por DSS. Os animais tratados com o produto

fermentado apresentaram menor pontuação histológica devido à redução da inflamação e da extensão da lesão do cólon.

5.5 Determinação da composição da microbiota fecal

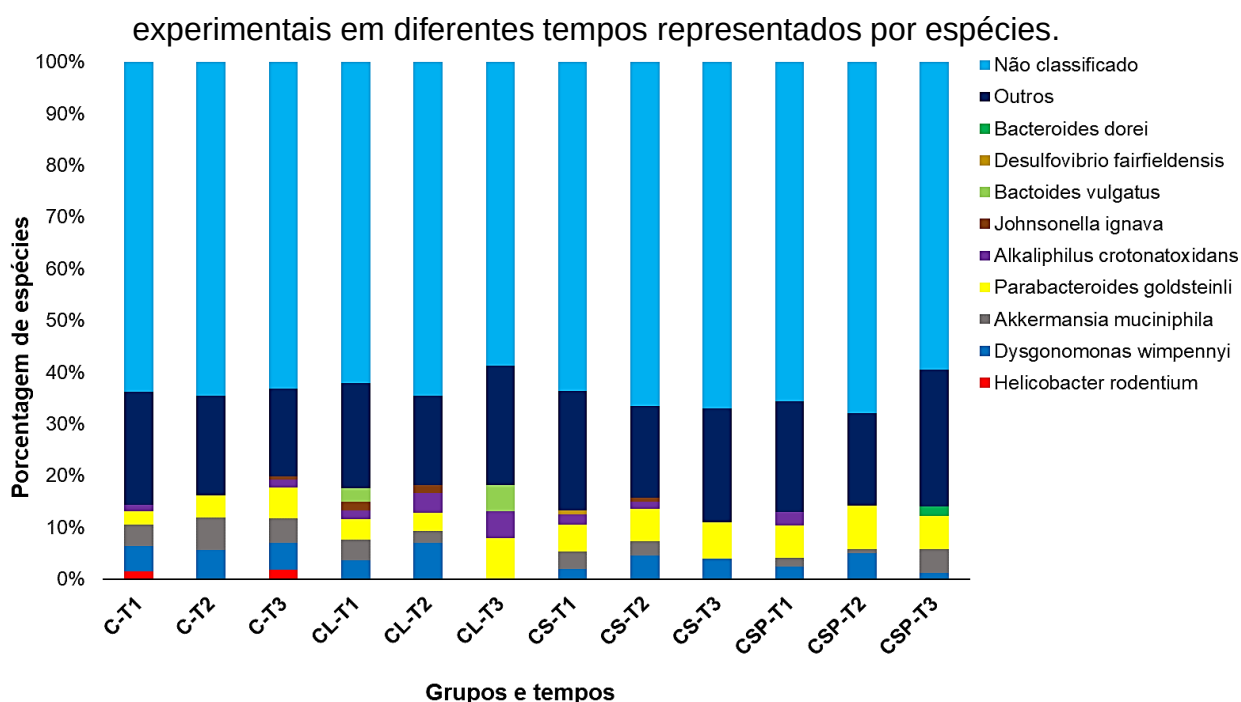
As Figuras 6 e 7 mostram os resultados preliminares da avaliação da composição da microbiota fecal dos animais dos diferentes grupos experimentais em três diferentes tempos, representados por filos e espécies respectivamente.

Figura 6. Composição da microbiota fecal dos animais dos grupos experimentais em diferentes tempos representados por filos.



Valores representados pela média de filos presentes nos animais dos diferentes grupos nos tempos T0, T7 e T14 (T1, T2 e T3 respectivamente). **Grupo C:** animais saudáveis e sem tratamento. **Grupo CL:** animais com colite induzida e sem tratamento. **Grupo CS:** animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite. **Grupo CSP:** animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite e a cepa probiótica. Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 7. Composição da microbiota fecal dos animais dos grupos



A análise preliminar dos dados do sequenciamento das fezes dos animais evidencia uma predominância dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* em todos os grupos experimentais. Isso já era esperado, pois esses filos são os dominantes na microbiota fecal de camundongos e humanos (MAIA; FIORIO; SILVA, 2018).

A depleção de *Bacteroidetes* e um aumento em *Proteobacteria* tem sido verificada em pacientes portadores de DII (FRANK et al., 2007; MANICHANH et al., 2006). Nesse estudo foi possível constatar o crescimento de *Proteobacteria* nos grupos de colite induzida, entretanto, não foi verificado modificação no filo *Bacteroidetes*.

Uma característica interessante é a redução no filo *Verrucomicrobia* no grupo induzido à colite e sem tratamento (CL) no final do experimento (T3). Outros estudos mostram que em locais inflamados da mucosa colônica de pacientes com doença de Crohn e colite ulcerativa existe uma redução na abundância de *Verrucomicrobia* (*Akkermansia* spp.) e *Fusobacteria* (*Leptotrichia* spp.) (PAPA et al., 2012; VIGSNAES et al., 2012).

Observa-se ainda na Figura 7 ausência de *Akkermansia muciniphila* e aumento na abundância de *Bacteróides vulgatus* no grupo CL. Estudo conduzido por Mills et al. (2022) constatou que as proteases produzidas por *B. vulgatus* contribuem para a atividade da CU e que o transplante de fezes de pacientes portadores de CU e com alta abundância de proteases de *B. vulgatus*, para camundongos livres de germes, induziu o aparecimento da doença.

A análise inicial da composição da microbiota fecal sugere que a ingestão conjunta da proteína do soro de leite e do probiótico modulou benéficamente a microbiota dos animais, levando a um aumento de *Akkermansia muciniphila* no final do experimento (T3). Essa modulação positiva da microbiota pode ser um dos mecanismos associados aos efeitos benéficos observados nos grupos tratados com proteína de soro de leite e probióticos, pois a *Akkermansia muciniphila* utiliza a mucina como substrato e está presente, predominantemente, em cólons saudáveis (ZHANG et al., 2021).

6 Conclusão

A ingestão de proteína do soro de leite e da combinação de proteína do soro de leite e *L. rhamnosus* GG minimizou a perda de peso e os demais sintomas característicos da fase ativa da colite (presença de sangue nas fezes e diarreia) e aumentou a população de *Akkermansia muciniphila* na microbiota fecal. Os animais o grupo CSP ainda apresentaram menor média da relação peso/comprimento do cólon e menores escores histopatológicos (com ênfase na inflamação e hiperplasia) comparado aos demais grupos induzidos à colite. Tais resultados indicam que a ingestão da proteína do soro do leite e de probióticos pode ser uma alternativa para controlar os sintomas da colite, auxiliando nos tratamentos farmacológicos.

Referências

ADAMS, R. L.; BROUGHTON, K. S. Insulinotropic effects of whey: mechanisms of action, recent clinical trials, and clinical applications. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 69, n. 1, p. 56-63, 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada no 18, de 30 de abril de 1999, que aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, no 231, de 03 de dezembro de 1999a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada no 19, de 30 de abril de 1999, que aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, no 236-E, de 10 de dezembro de 1999b.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada - RDC n.18/1999, n.19/1999, n.2/2002. Disponível em:< www.anvisa.gov.br/legis> Acessado em: 21 de janeiro 2022.

ARAB, H. H. et al. Camel's milk ameliorates TNBS-induced colitis in rats via downregulation of inflammatory cytokines and oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 294-302, 2014.

ARAUJO, D. F. S. et al. Intestinal anti-inflammatory effects of goat whey on DNBS-induced colitis in mice. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0185382, 2017.

AUESTAD, N.; LAYMAN, D.K. Dairy bioactive proteins and peptides: A narrative review. **Nutr Rev.** 2021, 79, 36–47

BAUMGART, D. C.; CARDING, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. **The Lancet**, v. 369, n. 9573, p. 1627-1640, 2007.

BENDTSEN, L. Q. et al. Effect of dairy proteins on appetite, energy expenditure, body weight, and composition: a review of the evidence from controlled clinical trials. **Advances in nutrition**, v. 4, n. 4, p. 418-438, 2013.

BISCHOFF, S. C. et al. ESPEN guideline on Clinical Nutrition in Inflammatory Bowel Disease. **Clinical Nutrition**, 2023.

CELIBERTO, L. S. et al. Inflammatory bowel disease and immunonutrition: novel therapeutic approaches through modulation of diet and the gut microbiome. **Immunology**, v. 155, n. 1, p. 36-52, 2018.

CELIBERTO, L. S. et al. Isolation and characterization of potentially probiotic bacterial strains from mice: proof of concept for personalized probiotics. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1684, 2018.

CHAVES, F. M. et al. High-intensity-exercise-induced intestinal damage is protected by fermented milk supplemented with whey protein, probiotic and pomegranate (*Punica granatum L.*). **British Journal of Nutrition**, v. 119, n. 8, p. 896-909, 2018.

CORRÊA, I. S. et al. Interações medicamentosas no tratamento de doenças inflamatórias intestinais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 14, n. 2, 2017.

COSTA, F. R. et al. Proteínas do soro do leite: propriedades funcionais e benefícios para a saúde humana. **Lecturas: Educación Física y Deportes**, v. 25, n. 272, 2021.

CZUBER-DOCHAN, W. et al. Perceptions and psychosocial impact of food, nutrition, eating and drinking in people with inflammatory bowel disease: A qualitative investigation of food-related quality of life. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 33, n. 1, p. 115-127, 2020.

DA CUNHA, V. P. et al. Efeitos imunomoduladores de uma linhagem de *Lactococcus lactis* invasiva e produtora do antígeno Hsp65 de *Mycobacterium*

leprae em modelos murinos de colite aguda e crônica induzidas pelo ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). 2020.

DERWA, Y. et al. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 46, n. 4, p. 389-400, 2017.

DILLY, R. S. et al. Nutritional status and consumption of inflammatory and anti-inflammatory foods by patients with inflammatory bowel diseases. **Journal of Coloproctology**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 2, p. 99-104, 2020.

ERBEN, U. et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 8, p. 4557, 2014.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. (2002). Report of a Joint FAO/WHO...; Ontario, Canada. April 30, May 1. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>

FERRAZ, F. B. Panorama geral sobre doenças inflamatórias intestinais: Imunidade e suscetibilidade da doença de crohn e colite ulcerativa. **Journal of Health Sciences**, v. 18, n. 2, p. 139-143, 2016

FIERS, W. Tumor necrosis factor characterization at the molecular, cellular and in vivo level. **FEBS letters**, v. 285, n. 2, p. 199-212, 1991.

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 115, n. 1, p. 182-205, 1998.

FLACH, J. et al. Probiotic research priorities for the healthy adult population: A review on the health benefits of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subspecies lactis BB-12. **Cogent Food & Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 1452839, 2018.

FORD, A. C. et al. Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. **Am J Gastroenterol** 2011; 106:590–9.

FRANK, D. N. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 104, n. 34, p. 13780-13785, 2007.

GHASEMI-NIRI, S. F. et al. On the benefit of whey-cultured *Lactobacillus casei* in murine colitis. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 62, n. 3, p. 341, 2011.

GHOLAMI, M. et al. Experimental and Pathological study of *Pistacia atlantica*, butyrate, *Lactobacillus casei* and their combination on rat ulcerative colitis model. **Pathology-Research and Practice**, v. 212, n. 6, p. 500-508, 2016.

GU, P.; FEAGINS, L. A. Dining with inflammatory bowel disease: a review of the literature on diet in the pathogenesis and management of IBD. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 26, n. 2, p. 181-191, 2020

HAN, M. et al. Protective effects of *Lacticaseibacillus rhamnosus* Hao9 on dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 3, p. 2039-2049, 2022.

HANAUER, S. B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflammatory bowel diseases**, v. 12, n. suppl_1, p. S3-S9, 2006.

HERRERA-PONCE, A. L. et al. Physiological health effects of whey protein-derived bioactive peptides: A review. **Revista Chilena de Nutricion**, v. 46, n. 2, p. 205-214, 2019.

HILL, C. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014.

JOOSSENS, M. et al. Dysbiosis of the fecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. **Gut**, v. 60, n. 5, p. 631-637, 2011.

KATO, K. et al. Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 20, n. 10, p. 1133-1141, 2004.

KAUR, H. et al. *Lactobacillus fermentum* (MTCC-5898) based fermented whey renders prophylactic action against colitis by strengthening the gut barrier function and maintaining immune homeostasis. **Microbial Pathogenesis**, p. 105887, 2022.

KAUR, H. et al. Protective effects of potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (MTCC-5897) fermented whey on reinforcement of intestinal epithelial barrier function in colitis induced murine model. **Food & Function**, 2021.

KIM, H. W. et al. Role of myeloperoxidase in abdominal aortic aneurysm formation: mitigation by taurine. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 313, n. 6, p. H1168-H1179, 2017.

KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. **Current gastroenterology reports**, v. 12, n. 5, p. 319-330, 2010.

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

LEE, B. et al. Attenuation of colitis by *Lactobacillus casei* BL23 is dependent on the dairy delivery matrix. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 18, p. 6425-6435, 2015.

LICHTENSTEIN, G. R. et al. Management of Crohn's disease in adults. **Official journal of the American College of Gastroenterology ACG**, v. 104, n. 2, p. 465-483, 2009.

LIMKETKAI, B. N. et al. Dietary interventions for induction and maintenance of remission in inflammatory bowel disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2019.

LINDSAY, J. O. et al. Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. **Gut**, v. 55, n. 3, p. 348-355, 2006.

MA, S. et al. Protein diets with the role of immune and gut microbial regulation alleviate DSS-induced chronic ulcerative colitis. **Food Science & Nutrition**, v. 9, n. 3, p. 1259-1270, 2021.

MADUREIRA, A. R. et al. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 2, p. 437-455, 2010.

MAIA, P. L.; DE CERQUEIRA FIORIO, B.; DA SILVA, F. R. A influência da microbiota intestinal na prevenção do câncer de cólon. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 47, n. 1, p. 182-197, 2018.

MANICHANH, C. et al. Reduced diversity of fecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. **Gut**, v. 55, n. 2, p. 205-211, 2006.

MANZEL, A. et al. Role of "Western diet" in inflammatory autoimmune diseases. **Current allergy and asthma reports**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2014.

MARTINEZ-MAQUEDA, D. et al. Food-derived peptides stimulate mucin secretion and gene expression in intestinal cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 35, p. 8600-8605, 2012.

MARTIROSYAN, D.; KANYA, H.; NADALET, C. Can functional foods reduce the risk of disease? Advancement of functional food definition and steps to create functional food products. **Functional Foods in Health and Disease**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 213, 2021.

MCDONALD, D. et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **The ISME journal**, v. 6, n. 3, p. 610-618, 2012.

MEDINA-REMÓN, A. et al. Polyphenol intake from a Mediterranean diet decreases inflammatory biomarkers related to atherosclerosis: a substudy of the PREDIMED trial. **British journal of clinical pharmacology**, v. 83, n. 1, p. 114-128, 2017.

MILLS, R. H. et al. Multi-omics analyses of the ulcerative colitis gut microbiome link *Bacteroides vulgatus* proteases with disease severity. **Nature Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 262-276, 2022.

MITSUYAMA, K.; SATA, M.; TANIKAWA, K. Significance of interleukin-6 in patients with inflammatory bowel disease. **Gastroenterologia Japonica**, v. 26, n. 1, p. 20-28, 1991.

MIZUHARA, H. et al. T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 5, p. 1529-1537, 1994.

MURTHY, S. et al. The efficacy of BAY y 1015 in dextran sulfate model of mouse colitis. **Inflammation research**, v. 46, n. 6, p. 224-233, 1997.

NAVIS, M. et al. Beneficial effect of mildly pasteurized whey protein on intestinal integrity and innate defense in preterm and near-term piglets. **Nutrients**, v. 12, n. 4, 2020.

NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 329-342, 2014.

NG, S. C. et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **The Lancet**, v. 390, n. 10114, p. 2769-2778, 2017.

NIKOLAUS, S. et al. Evaluation of interleukin-6 and its soluble receptor components sIL-6R and sgp130 as markers of inflammation in inflammatory bowel diseases. **International journal of colorectal disease**, v. 33, n. 7, p. 927-936, 2018.

ÖHMAN, L.; SIMRÉN, M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 7, n. 3, p. 163-173, 2010.

OSADCHIY, V.; MARTIN, C. R.; MAYER, E. A. The gut–brain axis and the microbiome: mechanisms and clinical implications. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 2, p. 322-332, 2019.

OSMAN, N. et al. *Bifidobacterium infantis* strains with and without a combination of Oligofructose and Inulin (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats. **BMC gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2006.

PAPA, E. et al. Non-invasive mapping of the gastrointestinal microbiota identifies children with inflammatory bowel disease. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e39242, 2012.

PARRONCHI, P. et al. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. **The American journal of pathology**, v. 150, n. 3, p. 823, 1997.

PELUSO, I.; PALLONE, F.; MONTELEONE, G. Interleukin-12 and Th1 immune response in Crohn's disease: Pathogenetic relevance and therapeutic implication. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 12, n. 35, p. 5606, 2006.

PIERDOMENICO, M. et al. NOD2 is regulated by Mir-320 in physiological conditions but this control is altered in inflamed tissues of patients with inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 22, n. 2, p. 315-326, 2016.

PLAZA-DIAZ, J. et al. Mechanisms of action of probiotics. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. suppl_1, p. S49-S66, 2019.

PUGAZHENDHI, S. et al. Association of ATG16L1 gene haplotype with inflammatory bowel disease in Indians. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0178291, 2017.

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

REID, G.; BURTON, J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. **Microbes and infection**, v. 4, n. 3, p. 319-324, 2002.

ROSELLI, M. et al. Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. **British Journal of Nutrition**, v. 95, n. 6, p. 1177-1184, 2006.

SAINI, S.; LIU, T.; YOO, J. TNF- α stimulates colonic myofibroblast migration via COX-2 and Hsp27. **Journal of Surgical Research**, v. 204, n. 1, p. 145-152, 2016.

SANDY, N. S. et al. Elevated IgA and IL-10 levels in very-early-onset inflammatory bowel disease secondary to IL-10 receptor deficiency. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 40, 2021.

SCHULTZ, M. et al. Immunomodulatory consequences of oral administration of *Lactocaseibacillus rhamnosus* strain GG in healthy volunteers. **The Journal of dairy research**, v. 70, n. 2, p. 165, 2003.

SEGRS, M. E.; LEBEER, S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 1-16, 2014.

SHEN, Z. H. et al. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. **World journal of gastroenterology**, v. 24, n. 1, p. 5, 2018.

SOKOL, H. et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 105, 16731–16736 (2008).

SON, S. J. et al. Effect of the *Lactocaseibacillus rhamnosus* strain GG and tagatose as a synbiotic combination in a dextran sulfate sodium-induced colitis murine model. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 4, p. 2844-2853, 2019.

SOUSA, G. T. D. et al. Dietary whey protein lessens several risk factors for metabolic diseases: a review. **Lipids in health and disease**, v. 11, n. 1, p. 67, 2012.

STATOVCI, D. et al. The impact of western diet and nutrients on the microbiota and immune response at mucosal interfaces. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 838, 2017.

STEED, H. et al. Clinical trial: the microbiological and immunological effects of symbiotic consumption—a randomized double-blind placebo-controlled study in active Crohn's disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 32, n. 7, p. 872-883, 2010.

ŠTOFILOVÁ, J. et al. Cytokine production in vitro and in rat model of colitis in response to *Lactobacillus plantarum* LS/07. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 1176-1185, 2017.

SZAJEWSKA, H. et al. Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG for treating acute gastroenteritis in children—a 2019 update. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 49, n. 11, p. 1376-1384, 2019.

TILG, H. et al. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. 1994.

VIGSNAES, L. K. et al. Gram-negative bacteria account for main differences between fecal microbiota from patients with ulcerative colitis and healthy controls. **Beneficial microbes**, v. 3, n. 4, p. 287-297, 2012.

WAN, C. et al. Exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* ZFM231 alleviates DSS-induced colitis in mice by regulating gut microbiota. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2022.

WEINBERG, J. B. Nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase 2 interactions in inflammation. **Immunologic research**, v. 22, n. 2, p. 319-341, 2000.

WENDLING, L. K.; WESCHENFER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados-uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 395, p. 49-57, 2013.

WHITTEM, C. G.; WILLIAMS, A. D.; WILLIAMS, C. S. Murine colitis modeling using dextran sulfate sodium (DSS). **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 35, 2010.

WILLIAMS, L. et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 1, p. 567-576, 2004.

XIAO, Y. T. et al. Neutralization of IL-6 and TNF- α ameliorates intestinal permeability in DSS-induced colitis. **Cytokine**, v. 83, p. 189-192, 2016.

YAN, S. et al. *Bifidobacterium longum subsp. longum* YS108R fermented milk alleviates DSS induced colitis via anti-inflammation, mucosal barrier maintenance and gut microbiota modulation. **Journal of Functional Foods**, v. 73, p. 104153, 2020.

YASMINE B.; TIMOTHY W. H. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. **Cell** 157, March 27, 2014.

YASUDA, T. et al. Multiple Cerebral Infarction Associated with Cerebral Vasculitis in a Patient with Ulcerative Colitis. **Internal Medicine**, v. 60, n. 1, p. 59-66, 2021.

YEN, D. C. J. et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. **J Clin Invest**, v. 116, p. 1310-1316, 2006.

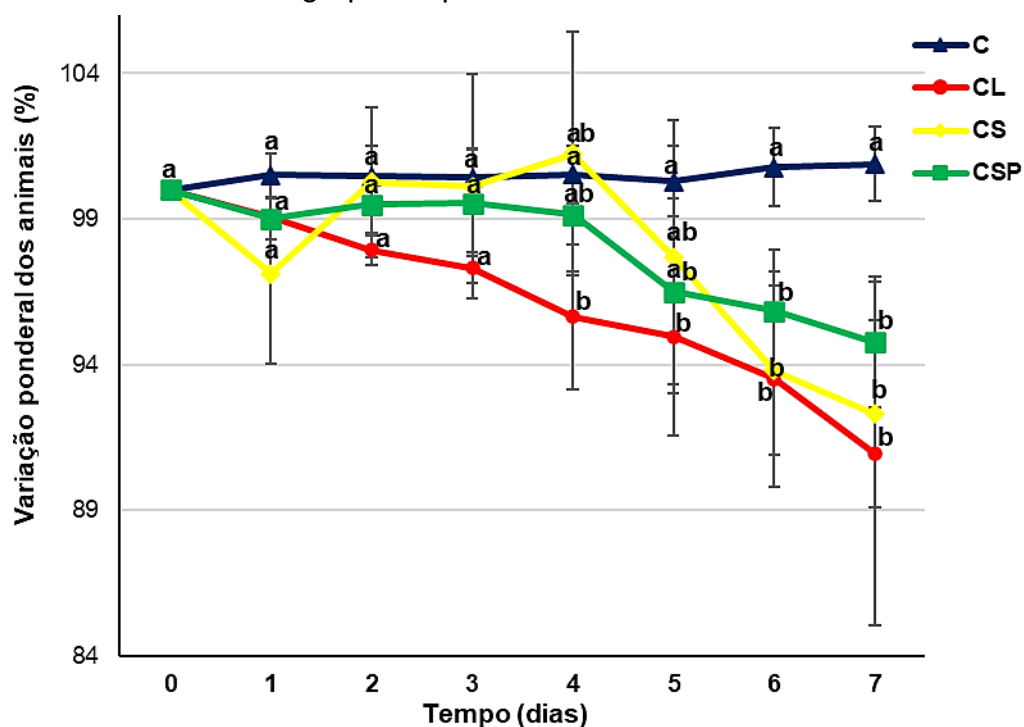
YOON, J. W. et al. Antioxidant activity of yogurt fermented at low temperature and its anti-inflammatory effect on DSS-induced colitis in mice. **Food Science of Animal Resources**, v. 39, n. 1, p. 162-176, 2019.

ZHANG, T. et al. The potential of *Akkermansia muciniphila* in inflammatory bowel disease. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 105, n. 14, p. 5785-5794, 2021.

ZOCCO, M. A. et al. Efficacy of *Lactocaseibacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 23, n. 11, p. 1567-1574, 2006.

Apêndice 1

Figura Suplementar 1. Variação ponderal dos animais (%) dos diferentes grupos experimentais.



Dados avaliados por ANOVA mista não paramétrica e pós-teste de Sidak ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa no tempo avaliado. Grupo C: animais saudáveis e sem tratamento. Grupo CL: animais com colite induzida e sem tratamento. Grupo CS: animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite. Grupo CSP: animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite e a cepa probiótica. Fonte: Autoria própria, 2021.

Apêndice 2

Tabela Suplementar 1. Escores de IAD dos diferentes grupos experimentais ao longo do experimento.

GRUPO	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
C	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,10 ± 0,16 ^a	0,07 ± 0,14 ^a	0,07 ± 0,14 ^a	0,07 ± 0,14 ^a	0,03 ± 0,11 ^a	0,03 ± 0,11 ^a
CL	0,00 ± 0,00 ^a	0,70 ± 0,40 ^b	1,13 ± 0,69 ^b	1,53 ± 0,28 ^b	2,53 ± 0,32 ^b	3,23 ± 0,27 ^b	3,27 ± 0,26 ^b	3,40 ± 0,31 ^b
CS	0,00 ± 0,00 ^a	0,30 ± 0,11 ^c	0,13 ± 0,17 ^a	0,37 ± 0,33 ^c	1,43 ± 0,16 ^c	1,80 ± 0,39 ^c	2,63 ± 0,43 ^c	2,83 ± 0,32 ^c
CSP	0,00 ± 0,00 ^a	0,27 ± 0,14 ^c	0,17 ± 0,18 ^a	0,37 ± 0,37 ^c	1,57 ± 0,16 ^c	2,10 ± 0,45 ^c	2,30 ± 0,60 ^c	2,97 ± 0,40 ^c

Nota: letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa no tempo avaliado. Dados avaliados por ANOVA mista não paramétrica e pós-teste de Sidak ($p < 0,05$). Valores apresentados pela média ± desvio-padrão. Grupo C: animais saudáveis e sem tratamento.

Grupo CL: animais com colite induzida e sem tratamento. Grupo CS: animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite. Grupo CSP: animais com colite induzida e que receberam proteína do soro do leite e a cepa probiótica. Fonte: Autoria própria, 2021.