

AVALIAÇÃO DE ENEMAS COM SUCRALFATO NO CONTEÚDO TECIDUAL DA PROTEÍNA MUC-2 EM COLITE DE EXCLUSÃO EXPERIMENTAL

Evaluation of enemas containing sucralfate in tissue content of MUC-2 protein in experimental model of diversion colitis

Oscar Orlando Araya **FERNANDEZ**¹, José Aires **PEREIRA**¹, Fábio Guilherme **CAMPOS**¹, Carolina Mardegan **ARAYA**¹, Gabriele Escocia **MARINHO**¹, Rafaela de Souza **NOVO**¹, Thais Silva de **OLIVEIRA**¹, Yara Tinoco **FRANCESCHI**¹, Carlos Augusto Real **MARTINEZ**¹

Trabalho realizado no ¹Laboratório de Investigação Médica do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP, Brasil.

RESUMO - Racional: Os efeitos da aplicação tópica de sucralfato (SCF) no conteúdo tecidual da proteína mucina-2 (MUC-2) ainda não foram avaliados em modelos experimentais de colite de exclusão. **Objetivo:** Mensurar o conteúdo tecidual da proteína MUC-2 na mucosa cólica sem trânsito intestinal submetida à intervenção com SCF. **Método:** Trinta e seis ratos foram submetidos à derivação intestinal por colostomia proximal terminal e fistula mucosa distal. Foram divididos em três grupos segundo recebessem clisteres contendo solução fisiológica (SF), SCF 1 g/kg/dia e SCF 2 g/kg/dia. Cada grupo foi dividido em dois subgrupos, segundo a eutanásia ser realizada após duas ou quatro semanas. O diagnóstico de colite foi estabelecido por estudo histopatológico e a intensidade inflamatória foi avaliada por escala validada. A expressão tecidual da MUC-2 foi identificada por imunistoquímica e seu conteúdo mensurado por morfometria computadorizada. **Resultados:** A aplicação de clisteres com SCF na concentração de 2 g/kg/dia reduziu a intensidade inflamatória no cólon sem trânsito fecal. O conteúdo tecidual de MUC-2 no cólon sem trânsito dos animais submetidos à intervenção com SCF, independente do tempo de intervenção e da concentração utilizada, foi maior quando comparado aos animais tratados com SF ($p < 0,01$). O conteúdo de MUC-2 após a intervenção com SCF na concentração de 2 g/kg/dia foi maior quando comparado aos animais submetidos à intervenção com concentração menor ($p < 0,01$). O conteúdo de MUC-2 foi maior após intervenção com SCF na concentração de 2 g/kg/dia por quatro semanas ($p < 0,01$). **Conclusão:** A aplicação preventiva de clisteres com SCF reduz o grau de inflamação e preserva o conteúdo tecidual de MUC-2, em segmentos desprovidos de trânsito intestinal, mostrando-se uma estratégia terapêutica válida para preservar a camada de muco que recobre o epitélio intestinal.

DESCRITORES - Cólon. Colite. Sucralfato. Mucina-2. Ácidos graxos voláteis.

Correspondência:

Carlos Augusto Real Martinez
 E-mail: carmartinez@uol.com.br

Fonte de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Projeto N.º. 2010/12492-7)
 Conflito de interesse: não há

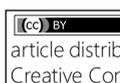
Recebido para publicação: 30/12/2016
 Aceito para publicação: 28/03/2017

HEADINGS - Colon. Colitis. Sucralfate. Mucin-2. Fatty acids volatile.

ABSTRACT - Background: The effects of topical application of sucralfate (SCF) on the tissue content of MUC-2 protein have not yet been evaluated in experimental models of diversion colitis. **Aim:** To measure the tissue content of MUC-2 protein in the colonic mucosa diverted from fecal stream submitted to the SCF intervention. **Methods:** Thirty-six rats underwent derivation of intestinal transit through proximal colostomy and distal mucous fistula. The animals were divided into three groups which were submitted application of enemas with saline, SCF 1 g/kg/day and SCF 2 g/kg/day. Each group was divided into two subgroups, according to euthanasia was done after two or four weeks. The colitis diagnosis was established by histopathological study and the inflammatory intensity was evaluated by previously validated scale. The MUC-2 protein was identified by immunohistochemistry and the tissue content was measured computerized morphometry). **Results:** The application of enemas with SCF in the concentration of 2 g/kg/day reduced inflammatory score of the segments that were diverted from fecal stream. The content of MUC-2 in diverted colon of the animals submitted to the intervention with SCF, independently of intervention period and the used concentration, was significantly greater than animals submitted to the application of enemas containing saline ($p < 0.01$). The content of MUC-2 after the intervention with SCF in the concentration of 2 g/kg/day was significantly higher when compared to the animals submitted to the application containing SCF at concentration of 1.0 g/kg/day ($p < 0.01$). The tissue content of MUC-2 reached the highest values after intervention with SCF in the concentration of 2 g/kg/day for four weeks ($p < 0.01$). **Conclusion:** The preventive application of enemas containing SCF reduces the inflammatory score and avoids the reduction of tissue content of MUC-2, suggesting that the substance is a valid therapeutic strategy to preserve the mucus layer that covers the intestinal epithelium.

INTRODUÇÃO

O epitélio do intestino grosso constitui-se na mais perfeita barreira morfofuncional do corpo humano, impedindo a penetração de antígenos, toxinas e bactérias presentes na luz do cólon para o meio interno^{3,5,27}. Essa barreira é composta por diferentes linhas de defesa, principalmente representadas pela camada de muco que recobre a mucosa cólica; por uma única camada de células justapostas firmemente aderidas umas às outras que formam a superfície epitelial; pelos eficientes mecanismos de junções intercelulares que conectam uma célula à sua vizinha, pela membrana basal; e por um complexo sistema de defesa imunológica^{9,28}. Esse sistema imunológico, considerado o mais eficiente do organismo humano, protege o hospedeiro dificultando a translocação

 This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

de patógenos e toxinas a partir do lume intestinal. Portanto, a proteção conferida pelos diferentes mecanismos de defesa da barreira epitelial cólica é imprescindível para a preservação da vida humana.

As células do epitélio cólico são recobertas por uma camada gelatinosa de muco que atua como a primeira linha de defesa da barreira epitelial. O muco, além de funcionar como agente lubrificante facilitando a progressão do conteúdo fecal possui propriedades antibacterianas conferindo ainda, uma permeabilidade seletiva à parede intestinal^{9,11,33}. A camada de muco é formada predominantemente por mucinas, uma classe de glicoproteínas principais constituintes da sua composição química e por sua função de barreira mecânica^{7,8}. As mucinas são produzidas pelas células caliciformes presentes em grande quantidade nas glândulas cólicas. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) constituem o substrato mais importante para que as células caliciformes obtenham energia suficiente para produzirem continuamente mucinas^{1,10,11,36}.

A estrutura molecular das moléculas de mucinas é composta por uma fração glicídica e outra proteica. Quando se considera sua fração glicídica subdividem-se em mucinas neutras mais abundantes no sistema digestivo superior e as ácidas, principalmente encontradas no intestino grosso²⁶. As mucinas ácidas, por sua vez, se subdividem em sulfomucinas quando há predomínio de radicais sulfatados na sua estrutura molecular ou sialomucinas quando existe maior teor de ácido siálico^{7,21,26}. Com relação à fração proteica, da molécula existem mais de 20 subtipos de mucinas descritas, mas as do subtipo MUC-2 são as mais abundantes no epitélio cólico. Os subtipos MUC-1, MUC-3, MUC-4 e MUC-5, também podem ser encontrados na mucosa cólica, porém em menor quantidade. De forma semelhante ao que acontece com a fração glicídica da molécula, o suprimento adequado de AGCC possui papel importante na síntese das frações proteicas da glicoproteína^{2,4,8}. Demonstrou-se que os AGCC são capazes de aumentar em 20 vezes a expressão do gene MUC-2 e, conseqüentemente, a transcrição do mRNA responsável pela tradução da proteína homóloga¹¹. Esses achados confirmam a importância que o suprimento regular de AGCC possui para a adequada síntese de mucinas pelas células caliciformes presentes no epitélio intestinal²⁴. Estudos mostraram que podem ocorrer alterações no tipo e conteúdo das mucinas que recobrem o epitélio cólico em diferentes doenças inflamatórias intestinais. Foram descritas modificações na espessura e constituição da camada de muco nas colites bacterianas, colite ulcerativa, colite de exclusão (CE), pólipos adenomatosos e no câncer colorretal^{3,5,7,8,21,26}. Assim, o estudo da expressão das frações glicídicas e proteicas das mucinas é considerado importante indicador da integridade funcional da barreira epitelial da mucosa cólica.

Estudos experimentais em modelos de CE mostraram que nos segmentos cólicos desprovidos de trânsito intestinal, onde não existe o suprimento adequado de AGCC, há redução no conteúdo e modificações no padrão de expressão das frações glicídicas das mucinas nas glândulas da mucosa cólica inflamada^{21,26}. Essas alterações se agravam com o tempo de derivação intestinal reforçando a importância do suprimento regular de AGCC para a síntese da glicoproteína^{17,21,26}. De modo distinto, a aplicação de soluções ricas em AGCC ou de substâncias que protejam a mucosa cólica da ação de antígenos e bactéria presentes na luz intestinal e estimulem a produção de muco, são consideradas estratégias terapêuticas válidas para o tratamento da CE^{3,5,19}.

O sucralfato (SCF) é molécula composta por octassulfato de sacarose e hidróxido de polialumínio. Devido à sua composição poliônica, se liga fortemente com proteínas de cargas positivas dos tecidos inflamados formando um complexo aderente que protege a mucosa da ação nociva das secreções digestivas e bactérias patogênicas presentes nas fezes. Esse complexo aderido à superfície epitelial inflamada dificulta a penetração de agentes nocivos externos para o meio interno²⁷. O SCF apresenta ainda outras propriedades farmacológicas merecendo destaque sua ação antioxidante e estimuladora da produção do fator de

crescimento epitelial, importante nos processos de renovação celular³⁰. Estudos mostraram que um dos principais mecanismos de ação do SCF encontra-se relacionado à sua capacidade de aumentar a síntese e liberação de prostaglandina E2 estimulando a produção de muco a partir das células caliciformes^{16,18}. Os efeitos da aplicação de clisteres com SCF na quantidade e padrão de expressão das porções glicídicas das mucinas nas glândulas da mucosa cólica desprovida de trânsito fecal já foram estudados em modelos experimentais de CE. Todavia, o conteúdo tecidual da fração proteica das mucinas ainda não foi avaliada em estudos experimentais ou em portadores de CE^{3,5}.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar experimentalmente, os efeitos da aplicação de clisteres contendo SCF no conteúdo tecidual da proteína MUC-2 nas glândulas da mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal.

MÉTODOS

Este trabalho obedeceu à Lei Federal 11.794 e às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa da Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP. O Projeto foi aprovado com o parecer Nº. 002.04.10.

Utilizou-se 36 ratos, machos, da linhagem Wistar, provenientes do Biotério da Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP, Brasil. O peso variava entre 300-320 g e tinham em média quatro meses de idade.

Foram constituídos, aleatoriamente, três grupos de estudo com 12 animais cada, divididos segundo terem sido submetidos à aplicação diária de clisteres contendo, solução fisiológica (SF 0,9%), solução de SCF na concentração de 1 g/kg/dia (SCF-1) e na concentração de 2 g/kg/dia (SCF-2), respectivamente. Seis animais de cada um desses grupos sofreram eutanásia após duas semanas de intervenção, enquanto os 18 remanescentes, seis de cada grupo experimental, após quatro semanas (Figura 1).

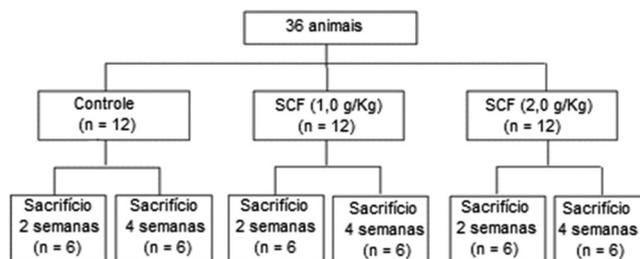


FIGURA 1 - Algoritmo da divisão dos grupos experimentais

Durante o período pré-operatório (sete dias), eles foram isolados em gaiolas individuais, mantidos em estantes climatizadas, com controle de temperatura, luminosidade, umidade e ruídos. Permaneceram em jejum por 12 h, exceto para água, antes da intervenção cirúrgica. Cada gaiola foi marcada com o número do animal, o grupo e o subgrupo experimental a que pertencia. Esses mesmos dados foram tatuados com tinta nanquim na cauda de cada animal.

No dia da intervenção, eles foram pesados para cálculo da dose anestésica a ser utilizada. A anestesia foi administrada utilizando-se o cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de quetamina na dose de 0,1 ml/100 g, administrados por via intramuscular na pata traseira esquerda.

Técnica operatória

Depois de anestesiados foram colocados na prancha cirúrgica, em decúbito dorsal horizontal, sendo realizada tricotomia de toda a região abdominal. A antisepsia cutânea foi feita com aplicação de polivinilpirolidona-iodo sobre área depilada, posteriormente isolada por campo cirúrgico fenestrado estéril. A laparotomia foi realizada por meio de incisão longitudinal mediana infra-umbilical

com 3 cm de extensão. Aberta a cavidade abdominal, o ceco foi identificado e com o auxílio de um paquímetro mediu-se no intestino grosso o local escolhido para a secção do cólon direito, localizado a 4 cm após a papila ileocecal. Após ligadura dos vasos da arcada cólica marginal, seccionou-se o cólon no ponto pré-determinado e exteriorizou-se o intestino grosso proximal, como colostomia terminal, através de incisão circular, com 3 mm de diâmetro, localizada na fossa ilíaca direita. A colostomia foi fixada à pele com pontos separados de fio absorvível monofilamentar 4-0 nos quatro pontos cardinais, e depois entre eles, amarrando com três nós. Terminada a confecção do estoma proximal, o segmento caudal do intestino grosso seccionado foi cateterizado com sonda de polivinil (12 F). Após, o cólon cateterizado foi irrigado com 60 ml de solução fisiológica aquecida a 37° C, até que o efluente drenado pelo ânus não apresentasse a saída de cíbalos fecais. Terminada a limpeza do intestino grosso, o cateter foi removido e segmento caudal do cólon exteriorizado como uma fístula mucosa localizada no hipocôndrio direito. Fixou-se a boca do estoma caudal com a mesma técnica utilizada na colostomia proximal. A síntese da parede abdominal foi feita em dois planos de sutura: peritônio e aponeurose com pontos contínuos de fio de ácido poliglicólico 4-0 e a pele com pontos separados de nylon 4-0.

Pós-operatório

Concluída a operação, os animais foram mantidos por 10 min sob aquecimento por meio de lâmpada incandescente. Ao recobrem a vigília, foram alojados nas gaiolas individuais previamente identificadas sendo liberada a ingestão de água e ração padronizada para roedores (Nuvilab CR1®). Eles permaneceram em gaiolas individuais até a data da eutanásia (duas ou quatro semanas), nas mesmas condições ambientais de umidade, luminosidade e temperatura do período pré-operatório. Após a operação de desvio do fluxo fecal, não foi tomado qualquer cuidado adicional com relação à ferida operatória ou aos estomas. Nos três primeiros dias após a intervenção cirúrgica para a analgesia utilizou-se o paracetamol na dosagem de 200 mg/kg dissolvido na água do bebedouro e administrado duas vezes ao dia.

Intervenção com as soluções propostas e coleta do material

Os animais foram submetidos à aplicação diária de clisteres com as soluções de intervenção padronizadas. A aplicação foi sempre realizada com o uso de cateter de polietileno graduado em centímetros, com diâmetro interno de 14 F. O cateter foi introduzido, cuidadosamente, pelo ânus na profundidade padronizada em 3 cm a partir da borda anal. A seguir, aplicava-se lentamente o clister contendo a solução de intervenção proposta para cada grupo experimental, à temperatura ambiente, até que ela drenasse pela fístula mucosa distal (colostomia exclusiva de trânsito fecal) localizada no hipocôndrio direito.

Na véspera da eutanásia (sete ou 14 dias), os animais foram novamente pesados e mantidos em jejum por 12 h, exceto para água. Todos receberam a aplicação do clister com a solução de intervenção na manhã da data programada para a eutanásia realizada sempre no período da tarde. Para a remoção do segmento do intestino grosso a ser estudado, os animais foram anestesiados com a mesma técnica anteriormente descrita, realizando-se uma abertura mais ampla da cavidade abdominal. Após liberação das aderências, caso presentes, removeu-se todo o cólon desprovido de trânsito fecal. Ainda anestesiados os animais foram sacrificados com dose letal intracardiaca de tiopental.

Depois de removidos os segmentos cólicos foram abertos cuidadosamente pela borda contramesentérica. Depois de abertos foram lavados com soro fisiológico a 0,9 % (SF) a 37° C, para remoção de resíduos fecais remanescentes. Removeu-se um fragmento longitudinal medindo 30 mm de comprimento interessando toda a parede intestinal. Esse fragmento foi sempre removido do segmento cólico derivado, submetido às soluções de intervenção. Foram desprezados um segmento de 10 mm

do cólon a partir da fixação do estoma a pele, bem como outro situado 2 cm acima do ânus, que incluía o canal anal. O fragmento colhido foi encaminhado para estudo histológico, através das técnicas padronizadas de coloração H&E e imunoistoquímica (anticorpo primário Anti-MUC2, Dako do Brasil; clone: NCH-38) na diluição de 1:100 e com controle positivo da expressão de MUC-2 feito a partir da aplicação da mesma técnica descrita em tecido obtido de cólon humano, enquanto o negativo foi realizado no mesmo tecido, contudo sem a adição do anticorpo primário durante a reação.

Avaliação histológica da presença de colite

Para confirmar o diagnóstico histopatológico de colite, consideraram-se os seguintes parâmetros: presença e número de ulcerações no epitélio e intensidade do infiltrado inflamatório, segundo escala previamente utilizada e modificada³⁵. Nessa escala, o grau de inflamação tecidual foi avaliado segundo a intensidade da infiltração neutrofílica na mucosa e o grau de perda epitelial. Os valores encontrados foram estratificados em quatro graus: 0 quando não havia infiltração neutrofílica nem perda epitelial; 1 quando havia infiltração de neutrófilos <50% das glândulas cólicas sem perda epitelial; 2 quando havia infiltração de neutrófilos <50% das glândulas cólicas e formação de até duas úlceras epiteliais; 3 quando havia infiltração de neutrófilos ≥50% das glândulas cólicas e formação de até duas úlceras epiteliais; 4 quando havia infiltração neutrofílica em ≥50% das glândulas cólicas e formação de mais de três úlceras epiteliais.

Medida do conteúdo tecidual de MUC-2

Para cada animal foram analisadas duas lâminas. A expressão da proteína MUC-2 foi estudada segundo o local e o conteúdo da imunocoloração nas glândulas cólicas. A imagem selecionada, após adequadamente focada, foi capturada por videocâmara acoplada ao microscópio óptico. O conteúdo tecidual da proteína foi mensurado por análise de imagem assistida por computador (morfometria computadorizada). A imagem capturada foi processada e analisada pelo programa NIS-Elements® (Nikon do Brasil Ltda., São Paulo) instalado em um microcomputador com boa capacidade de processamento de imagens. Quantificou-se o conteúdo de MUC-2 em cada uma das duas lâminas confeccionadas, em três criptas cólicas íntegras e contíguas presentes em três campos histológicos distintos. Assim, para cada animal o conteúdo tecidual de MUC-2 foi quantificado em 18 glândulas cólicas (nove em cada lâmina confeccionada).

A quantificação da proteína foi sempre realizada após a calibração do programa para o aumento selecionado no microscópio, sempre refeita após a leitura de cada lâmina. Para a quantificação da densidade de cor encontrada em cada campo selecionado, utilizou-se filtro RGB adotando-se todo comprimento de onda que continha todo o espectro da cor marrom (cor que identificava a imunexpressão tecidual da proteína MUC-2). Com o programa transformou-se a coloração onde havia a imunexpressão na cor branca e o restante do campo de visão capturado, sem imunocoloração, em preto compondo assim uma imagem binária. Os valores encontrados para o conteúdo tecidual da MUC-2 foi sempre expresso em porcentagem por campo analisado (%/campo). O valor final adotado para os animais dos grupos controle e experimento (intervenção com SF, SCF-1 e SCF-2) foi sempre representado pelo valor médio da leitura das duas lâminas (18 glândulas cólicas), com o respectivo erro-padrão. Todas as imagens selecionadas foram arquivadas para posterior documentação científica.

Análise estatística

Os resultados obtidos após a leitura foram sempre descritos pela média com respectivo erro-padrão. Adotou-se para todos os testes, nível de significância de 5% (p<0,05). Utilizou-se o teste de Mann-Whitney para analisar o grau de inflamação e o conteúdo tecidual da proteína MUC-2, comparando os animais

do grupo controle e experimento. Empregou-se o teste ANOVA para análise de variância do conteúdo tecidual da proteína MUC-2 com relação ao tempo de intervenção. Para o estudo estatístico utilizou-se o programa BioStat (versão 5.1). Os valores significantes quando se comparou os segmentos irrigados com SF e SCF (1 g/kg/dia ou 2 g/kg/dia) foram marcados com um asterisco (*) quando o nível de significância encontrado foi menor que 5%, e com dois asteriscos (**) quando esse nível foi menor que 1%. Da mesma forma, os valores significantes encontrados quando se comparou os animais submetidos à intervenção com SCF na concentração menor (1 g/kg/dia) com os submetidos à irrigação com concentração maior (2 g/kg/dia) foram marcados com um bolete (•) quando o nível de significância foi menor que 5% ou dois (••) quando menor que 1%.

RESULTADOS

A Figura 2A mostra segmento obtido do cólon irrigado com SF por quatro semanas, enquanto a Figura 2B o cólon irrigado com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia pelo mesmo período de tempo. Verifica-se que nos animais do grupo controle existe nítida perda epitelial, desarranjo na arquitetura e no alinhamento das glândulas cólicas, enquanto nos submetidos à intervenção com SCF 2 g/kg/dia, a superfície epitelial encontra-se preservada, as criptas intestinais apresentam-se alinhadas, com padrão de distribuição normal e preservação da integridade das células caliciformes. É possível observar uma fina película eosinofílica de SCF recobrendo a superfície epitelial da mucosa cólica.

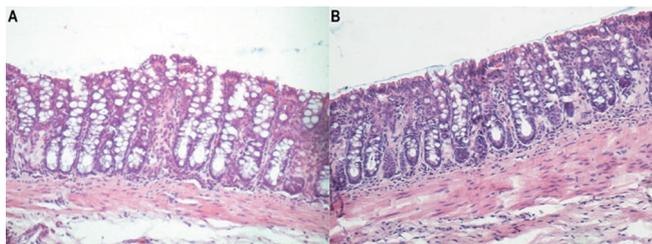


FIGURA 2 – A) Corte histológico da mucosa do segmento cólico derivado após irrigação com SF por quatro semanas (HE-100x); B) Corte histológico da mucosa do segmento cólico derivado após irrigação com SCF na concentração de 2 g/kg/dia por quatro semanas. Observa-se fina película de SCF recobrendo a superfície da mucosa (HE-200 x).

A Tabela 1 mostra grau de inflamação encontrado nos segmentos desprovidos de trânsito fecal após a intervenção com SF, SCF 1 g/kg/dia e 2 g/kg/dia, por duas e quatro semanas. Os resultados mostram que a intervenção com SCF na concentração de 2 g/kg/dia no segmento cólico derivado reduziu o grau de inflamação após quatro semanas de irrigação quando comparado aos animais do grupo controle (p=0,03).

TABELA 1 - Escore inflamatório no segmento cólico derivado dos animais submetidos à intervenção com SF, SCF-1 (SCF 1 g/kg/dia) e SCF-2 (2 g/kg/dia) submetidos à intervenção por duas e quatro semanas.

	Média ± E.P.			
	S.F. 0,9%	SCF 1 g/kg/dia	SCF 2 g/kg/dia	p
2 semanas	3,5±0,25	3,3±0,32	3,1±0,29	NS
4 semanas	3,1±0,20	2,8±0,25	2,4±0,31*	0,03

E.P.=erro-padrão; * = p < 0,05 (SCF 2,0 g/kg/dia x S.F. 0,9%). Teste de Mann-Whitney.

A Figura 3A mostra a expressão tecidual de MUC-2 no cólon irrigado com SF por quatro semanas e a 3B o cólon irrigado com SCF na concentração de 1 g/kg/dia pelo mesmo período de tempo. A Figura 3C mostra o cólon submetido à intervenção

com SCF na concentração de 2 g/kg/dia por quatro semanas. Verifica-se que nos animais submetidos à intervenção com SF existe redução no conteúdo de MUC-2 nas células caliciformes, desarranjo na arquitetura e alinhamento das glândulas cólicas. Nos submetidos à intervenção com SCF com 1 e 2 g/kg/dia o conteúdo de MUC-2 é significativamente mais evidente nas células caliciformes. Nos animais tratados com concentração de SCF de 2 g/kg/dia identifica-se aumento maior no conteúdo de MUC-2 nas células caliciformes principalmente localizadas na superfície luminal das glândulas cólicas

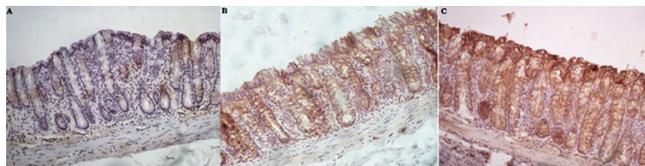


FIGURA 3 – A) Secção histológica de segmento cólico derivado onde observa-se redução da expressão de MUC-2 após irrigação com SF por quatro semanas (100x); B) segmento cólico derivado onde se observa aumento maior expressão de MUC-2 após irrigação com SCF na concentração de 1 g/kg/dia por quatro semanas quando comparada a irrigação com SF (100x); C) segmento cólico derivado onde se observa aumento da expressão MUC-2 na superfície epitelial após irrigação com SCF na concentração de 2 g/kg/dia por quatro semanas quando comparado aos animais irrigados com SF e SCF 1 g/kg/dia (100x).

A Figura 5 compara o conteúdo de MUC-2 encontrado nos segmentos desprovidos de trânsito fecal após a intervenção com SF, SCF 1 g/kg/dia e 2 g/kg/dia, por duas e quatro semanas. Os resultados mostram que a intervenção com SCF, na concentração de 1 g/kg/dia e 2 g/kg/dia no segmento cólico derivado, permitiu conteúdo significativamente maior de MUC-2 após duas e quatro semanas de irrigação quando comparado aos animais do grupo controle. O maior conteúdo das MUC-2 encontrado é relacionado à dose de SCF administrada (p < 0,01).

A Tabela 2 mostra a variação no conteúdo de MUC-2 segundo a concentração de SCF utilizada e ao tempo de uso do SCF, em relação ao grupo controle. O conteúdo das mucinas neutras e ácidas nos grupos experimentais mostrou-se superior ao grupo controle, nas concentrações de 1 g/kg/d e 2 g/kg/d de SCF, e em ambos os períodos de intervenção avaliados (p < 0,01).

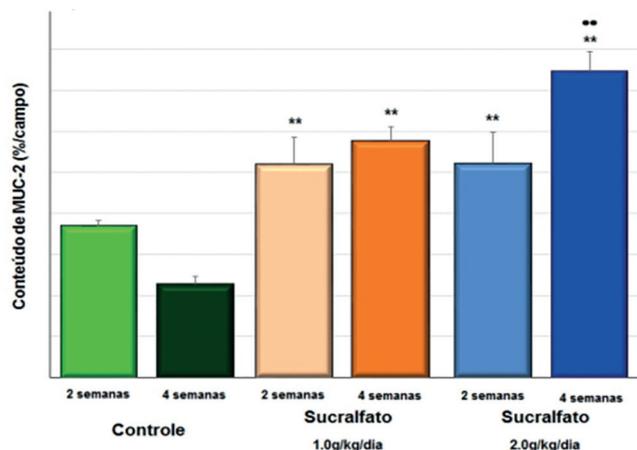


FIGURA 4 - Conteúdo tecidual de MUC-2 nos animais dos grupos controle, SCF-1 e SCF-2 submetidos à intervenção diária com SCF por duas e quatro semanas.

** = p < 0,01 (SCF-1 x Controle; SCF-2 x Controle); •• = p < 0,01 (SCF-1 x SCF-2). Teste de Mann-Whitney.

TABELA 2 – Variação no conteúdo tecidual médio de MUC-2 segundo o tempo de intervenção nos animais submetidos à intervenção com SF, SCF 1 g/kg/dia e 2 g/kg/dia por duas e quatro semanas de intervenção

SF		Média ± E.P.			
		SCF 1 g/kg/dia		SCF 2 g/kg/dia	
2 semanas	4 semanas	2 semanas	4 semanas	2 semanas	4 semanas
3,68±0,14	2,27±0,20	5,20±0,65	5,76±0,35	5,22±0,75	7,45±0,49**

E.P.=erro-padrão; SF=solução fisiológica 0,9%; SCF=sucralfato; **=significante $p < 0,01$; teste ANOVA

DISCUSSÃO

Os AGCC são formados no cólon a partir da fermentação bacteriana de carboidratos ingeridos na dieta que escaparam da hidrólise no intestino delgado. O acetato, propionato e o butirato são os subtipos mais comumente produzidos no interior do intestino grosso. Os AGCC apresentam diversas funções no intestino grosso, pois além de reduzirem o pH intestinal, estimularem a proliferação celular, aumentam o fluxo sanguíneo à mucosa cólica. Os ACGG representam ainda, o principal substrato energético necessário para as diferentes etapas do metabolismo celular⁴. A proporção entre os diferentes tipos de AGCC no intestino grosso é determinada pelo tipo de alimentação, assim como pela composição da microbiota intestinal que, por sua vez, também sofre influência da dieta ingerida. Os prebióticos estimulam a proliferação e a atividade de bifidobactérias no interior do cólon que interferem sobremaneira, na composição e no conteúdo luminal dos AGCC¹². O butirato representa a principal fonte de energia para as células do epitélio cólico. A substância possui destacado efeito antitumorigênico em muitas linhagens de células tumorais, desempenha papel significativo na manutenção da homeostase da mucosa cólica, além de regular a expressão de genes responsáveis pelos processos de proliferação, diferenciação e apoptose⁶. Dessa forma, o butirato apresenta fundamental importância para manutenção da saúde na mucosa cólica. Quaisquer modificações na sua produção intraluminal ou no seu suprimento encontram-se associadas ao desenvolvimento de uma série de doenças do intestino grosso³⁵.

A CE caracteriza-se pelo desenvolvimento de processo inflamatório na mucosa de segmentos do intestino grosso excluídos de trânsito fecal¹³. A maioria dos autores atribui sua ocorrência à deficiência na produção de AGCC na luz intestinal, ocasionada pela ausência do fornecimento de substrato e redução da microbiota responsáveis pela sua síntese³⁷. Essa possibilidade é reforçada quando se constata que a reconstituição do trânsito, ou a irrigação dos segmentos excluídos com soluções nutricionais ricas em AGCC, restabelecendo o fornecimento do principal substrato energético, são capazes de reverter às alterações clínicas e histopatológicas encontradas nos portadores da CE^{25,37}.

Os mecanismos moleculares pelos quais a deficiência no suprimento normal de AGCC leva ao aparecimento da CE parecem estar relacionados ao aumento na produção de radicais livres de oxigênio (RLO), pelas próprias células epiteliais desprovidas de sua principal fonte de energia²². Sem o principal combustível energético as células epiteliais sofrem alterações no seu metabolismo energético celular ocasionando produção aumentada de RLO. O estresse oxidativo resultante ocasiona quebra dos mecanismos de defesa que formam a mucosa cólica, permitindo a infiltração de bactérias e antígenos nas camadas esterais da parede cólica, possibilitando o desenvolvimento da CE. Estudos mostraram que os RLO danificam os diferentes sistemas de defesa que formam a barreira mucosa cólica^{19,21,26,28}.

A camada de muco que recobre o epitélio cólico é um componente crítico desses mecanismos de defesa, pois além de conferir proteção mecânica, criando interface entre as bactérias intestinais e o epitélio cólico apresenta efeito

antimicrobiano conferido pelos peptídios existentes nas moléculas das mucinas. Estudos experimentais mostraram que a falta no suprimento de AGCC e o conseqüente estresse oxidativo tecidual provoca alterações significativas no conteúdo e padrão de distribuição das mucinas na mucosa intestinal^{17,21,26}. Esses estudos quando avaliaram o conteúdo tecidual das frações glicídicas da molécula das mucinas encontraram acentuada redução do conteúdo tecidual das mucinas neutras e ácidas nas glândulas do cólon excluído quando comparado a cólon com o trânsito fecal preservado^{17,26}. Mostraram ainda, que a redução no conteúdo tecidual de mucinas ácidas se dava principalmente em conseqüência da menor produção de sialomucinas²¹. É provável que a diminuição no conteúdo tecidual das mucinas na mucosa cólica sem trânsito fecal possa estar relacionada à duas razões distintas. Em primeiro, pela diminuição da transcrição de genes relacionados à produção da fração proteica da molécula da glicoproteína, em conseqüência da deficiência no fornecimento dos AGCC^{4,10,11}. Em segundo, pela destruição da camada de muco que forma o primeiro sistema de defesa da barreira epitelial devido ao aumento da produção de RLO pelas células epiteliais com alterações de seu metabolismo energético habitual^{19,22}. Reforçam essas possibilidades estudos mostrando que o acréscimo de AGCC, em particular o butirato, em cultura de células ou modelos experimentais de CE induz a expressão do gene MUC-2 aumentando a produção de glicoproteína, além de reduzir os níveis teciduais de RLO e conseqüentemente, o dano ao epitélio mucoso cólico^{4,10,11,15,19,29}. Os AGCC apresentam ainda benefícios adicionais para preservar a integridade epitelial. Os AGCC inibem a formação de citocinas pró-inflamatórias indutoras da ativação do fator nuclear κ B. Atuam também, como antioxidantes aumentando a produção de catalase uma importante enzima na neutralização de RLO produzidos em excesso. Os AGCC apresentam ainda, ação anti-inflamatória por modularem a produção de ciclooxigenase-2²⁹. Esses efeitos fazem da administração de clisteres contendo AGCC estratégia complementar eficaz para o tratamento de diferentes formas de colite^{14,34}.

Quando se consideram os diferentes mecanismos envolvidos na etiopatogenia da CE, a substância ideal para o tratamento da doença deveria ter como propriedades a capacidade de aderir-se vigorosamente ao epitélio inflamado dificultando a infiltração bacteriana; estimular a produção de mucinas pelas células caliciformes; induzir a expressão de genes relacionados à transcrição da fração proteica da molécula e ter ação antioxidante e anti-inflamatória²⁷. Quando se consideram essas propriedades o SCF mostra-se uma molécula interessante a ser testada no tratamento da CE. Recentemente, estudos experimentais mostraram que a aplicação de clisteres com SCF além de formar uma película protetora, firmemente aderida à mucosa cólica reduziu a intensidade do processo inflamatório na mucosa desprovida de trânsito fecal²⁷. A melhora do processo inflamatório mostrou-se relacionada à ação anti-inflamatória, antioxidante e estimulante da produção de muco que o SCF possui^{3,5,23}. A aplicação do SCF reduziu também, os níveis teciduais de RLO, aumentando a espessura da camada de muco e o conteúdo tecidual das frações glicídicas da molécula de mucina nas glândulas cólicas. Entretanto, apesar de já ter sido demonstrado que a utilização de SCF aumenta os constituintes da fração glicídica da molécula de mucina no cólon desprovido de trânsito intestinal, nenhum estudo avaliou o efeito da substância no conteúdo tecidual da fração proteica da molécula, particularmente da mucina mais encontrada na mucosa cólica, a MUC-2.

Os resultados encontrados no presente estudo parecem confirmar os benefícios da administração de clisteres contendo SCF para o tratamento da CE. Demonstrou-se que a administração diária de clisteres com SCF reduziu o grau de inflamação tecidual, principalmente quando utilizado em maior concentração e por período de intervenção mais prolongado. Os animais submetidos à intervenção com SCF apresentavam menor infiltrado neutrofílico, bem como melhor alinhamento das

CONCLUSÃO

A aplicação preventiva de clisteres com SCF reduz o grau de inflamação e preserva o conteúdo tecidual de MUC-2, em segmentos desprovidos de trânsito fecal.

REFERÊNCIAS

células da superfície mucosa e menor formação de úlceras epiteliais. Em alguns animais submetidos à intervenção com SCF, independente da concentração usada ou do tempo de aplicação foi possível identificar a formação de uma película eosinofílica sobre superfície epitelial voltada para a luz do órgão confirmando a capacidade da substância em aderir-se firmemente ao epitélio lesado. Todos esses achados estão de acordo com os encontrados em estudos previamente publicados^{3,5}.

Com relação ao conteúdo da proteína MUC-2 na mucosa excluída de trânsito fecal, o presente estudo mostrou que a aplicação diária de clisteres contendo SCF, independente da dose utilizada aumentou significativamente a quantidade tecidual de MUC-2 quando comparado aos animais submetidos à intervenção com SF. O aumento no conteúdo tecidual da MUC-2 foi mais evidente quando se utilizou clisteres com maior concentração de SCF por maior período de tempo. Os animais submetidos à intervenção com SCF apresentavam maior expressão da proteína MUC-2 nas células caliciformes presentes em toda extensão das glândulas cólicas e, principalmente nas localizadas na superfície epitelial quando comparada aos animais do grupo controle. Estes resultados vão de encontro aos de estudos anteriores mostrando que à intervenção com SCF na mucosa excluída de trânsito fecal submetida aumentava o conteúdo das frações glicídicas da molécula^{3,5}. Estudos mostraram que a administração de SCF aumentava em 8% a espessura da camada de muco que recobria o trato gastrointestinal, aumentando em 63% o conteúdo tecidual de sulfomucinas e em 81% o de sialomucinas, justamente o subtipo de mucina mais reduzido no epitélio sem trânsito fecal³¹. Portanto, com os achados encontrados no presente estudo é lícito supor que a intervenção com SCF é capaz de aumentar ambas as frações da molécula das mucinas.

Os motivos pelos quais a aplicação de SCF aumenta o conteúdo tecidual das mucinas ainda são pouco conhecidos. É possível que os efeitos do SCF sobre a produção de MUC-2 esteja relacionada às várias propriedades farmacológicas da droga. Estudo demonstrou que o SCF estimula a produção de muco nas células caliciformes por aumentar a produção de prostaglandina E₂^{16,30}. Também se demonstrou que atividade antioxidante do SCF, removendo RLO produzidos em excesso pelas células da mucosa intestinal desprovida de trânsito intestinal, preserva a integridade dos diferentes sistemas de defesa da mucosa cólica, particularmente a camada de muco^{20,23}. Estudo experimental referiu que a atividade antioxidante do SCF reduz os níveis de oxidação de fosfolípidios presentes nas membranas das células da mucosa cólica, diminuindo a apoptose e, consequentemente, preservando a integridade da barreira epitelial²³. É possível que o SCF aumente ainda, a transcrição do gene MUC-2 relacionado à produção da proteína homônima no epitélio do cólon sem trânsito fecal. Os resultados do presente estudo, mostrando aumento do conteúdo tecidual da proteína MUC-2, sugere que esse fenômeno possa estar ocorrendo. Contudo, essa possibilidade só poderá ser confirmada após a realização de estudos que avaliem a expressão do gene MUC-2 no epitélio excluído de trânsito submetido à intervenção com SCF.

Os resultados encontrados no presente estudo mostraram que a aplicação de clisteres com SCF foi capaz de manter o conteúdo tecidual de MUC-2 nas células caliciformes presentes nas glândulas cólicas. Confirmou-se ainda resultados de estudos prévios demonstrando que a aplicação de clisteres com SCF preserva a integridade e reduz o grau de inflamação no epitélio cólico excluído de trânsito. Essas propriedades, aliadas a biodisponibilidade da substância, seu baixo custo e pequena incidência de efeitos colaterais, talvez possam tornar a droga uma nova opção medicamentosa para o tratamento da CE, bem como de outras doenças inflamatórias intestinais³².

1. Augenlicht L, Shi L, Mariadason J, Laboisse C, Velcich A. Repression of MUC-2 gene expression by butyrate, a physiological regulator of intestinal cell maturation. *Oncogene*. 2003 Aug 7;22(32):4983-92. PMID:12902981.
2. Awad AB, Kamei A, Horvath PJ, Fink CS. Prostaglandin synthesis in human cancer cells: influence of fatty acids and butyrate. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1995 Aug;53(2):87-93. PMID:7480078.
3. Bonassa CEG, Pereira JA, Campos FGCM, Rodrigues MR, Sato DT, Chaim FDM, Martinez CAR. Tissue content of sulfomucins and sialomucins in the colonic mucosa, without fecal stream, undergoing daily intervention with sucralfate. *Acta Cir Bras*. 2015 May;30(5):328-38. PMID: 26016932. doi: 1590/S0102-86502015005000004.
4. Burger-van Paassen N, Vincent A, Puiman PJ, van der Sluis M, Bouma J, Boehm G, van Goudoever JB, van Seuningh I, Renes IB. The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem J*. 2009 May 13;420(2); 211-9. PMID: 19228118. doi: 10.1042/BJ20082222.
5. Chaim FDM, Sato DT, Rodrigues MR, Dias AM, Silveira Júnior PP, Pereira JA, Martinez CAR. Evaluation of the application of enemas containing sucralfate in tissue content of neutral and acid mucins in experimental model of diversion colitis. *Acta Cir Bras*. 2014 Sep;29(9):544-52. PMID: 25252200. doi: 10.1590/S0102-8650201400150001.
6. Daly K, Shirazi-Beechey SP. Microarray analysis of butyrate regulated gene in colonic epithelial cells. *DNA Cell Biol*. 2006 Jan; 25(1); 49-62. PMID:16405400. doi:10.1089/dna.2006.25.49.
7. Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet-cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr*. 2001 Jun;73(6):1131S-1141S. PMID: 11393191.
8. Finnie IA, Dwarakanath AS, Taylor BA, Rhodes JM. Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut*. 1995 Jan;36(1):93-9. PMID:7890244.
9. Gaudier E, Hoebler C. Physiological role of mucins in the colonic barrier integrity. *Gastroenterol Clin Biol*. 2006 Aug-Sep;30(8-9):965-74. PMID: 17075443.
10. Gaudier E, Jarry A, Blottière HM, De Coppet P, Buisine MP, Aubert JP, Laboisse C, Cherbut C, Hoebler C. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Dec;287(6):G1168-74. PMID: 15308471. doi: 10.1152/ajpgi.00219.2004.
11. Gaudier E, Rival M, Buisine MP, Robineau I, Hoebler C. Butyrate enemas upregulate MUC gene expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. *Physiol Res*. 2009;58(1):111-19. PMID: 18198997.
12. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 1995 Jun;125(6):1401-12. PMID: 7782892.
13. Glotzer DJ, Glick ME, Goldman H. Proctitis and colitis following diversion of fecal stream. *Gastroenterology*. 1981 Mar;80(3):438-41. PMID: 7450438.
14. Hamer HM, Jonkers DM, Vanhoutvin SA, Troost FJ, Rijkers G, de Bruine A, Bast A, Venema K, Brummer RJ. Effect of butyrate enemas on inflammation and antioxidant status in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis in remission. *Clin Nutr*. 2010 Dec;29(6):738-44. PMID: 20471725. doi: 10.1016/j.clnu.2010.04.002.
15. Hatayama H, Iwashita J, Kuwajima A, Abe T. The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 May 11; 356(3):599-603. PMID: 17374366. doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.025
16. Hollander D, Tarnawski A, Gergely H, Zipser RD. Sucralfate protection of the gastric mucosa against ethanol-induced injury: a prostaglandin-mediated process? *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1984; 101: 97-102. PMID: 6599542.
17. Keli E, Bouchoucha M, Devroede G, Carnot F, Ohrant T, Cugnenc PH. Diversion related experimental colitis in rats. *Dis Colon Rectum*. 1997 Feb;40(2): 222-8. PMID: 9075761.
18. Konturek SJ, Kwicien N, Obtulowicz W, Kopp B, Oleksy J. Double blind controlled study on the effect of sucralfate on gastric prostaglandin formation and microbleeding in normal and aspirin treated man. *Gut*. 1986 Dec; 27(12):1450-6. PMID: 3492413.
19. Lameiro TMM, da Silva CMG, Marques LHS, Cunha FL, Almeida MG, Pereira JA, Martinez CAR. Effects of butyrate on levels of lipid peroxidation in cells of the colonic mucosa without fecal stream: experimental study in rats. *Rev bras. colo-proctol*. 2011 Apr-Jun;31(2):155-64. doi: 10.1590/S0101-98802011000200007.
20. Laudanno OM, Bedini OA, Cesolari JA, San Miguel P. Evidence of antioxidant role of sucralfate in gastric mucosal protection. *Ital J Gastroenterol*. 1990 Feb;22(1):19-21. PMID: 2131922.

21. Martinez CAR, Nonose R, Spadari APP, Máximo FR, Priolli DG, Pereira JA, Margarido NF. Quantification by computerized morphometry of tissue levels of sulfomucins and sialomucins in diversion colitis in rats. *Acta Cir Bras*. 2010 Jun; 25(3):231-40. PMID: 20498935. doi: 10.1590/S0102-86502010000300004.
22. Martinez CAR, Ribeiro ML, Gambero A, Miranda DDC, Pereira JA, Nadal SR. The importance of oxygen free radicals in the etiopathogenesis of diversion colitis in rats. *Acta Cir Bras*. 2010 Oct;25(5):387-95. PMID: 20877947. doi: 10.1590/S0102-86502010000500002.
23. Martinez CAR, Rodrigues MR, Sato DT, daSilva CMG, Kanno DT, Mendonça RL, Pereira JA. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant effects of the sucralfate in diversion colitis. *J. Coloproctol. (Rio J)*. 2015 Apr-Jun;35(2):90-99. doi: 10.1016/j.jcol.2015.02.007.
24. Mello RO, Silva, CM, Fonte FP, Silva DL, Pereira JA, Margarido NF, Martinez CA. Evaluation of the number of goblet cells in crypts of the colonic mucosa with and without fecal transit. *Rev Col Bras Cir*. 2012 Apr;39(2):139-45. PMID: 22664521. doi: 10.1590/S0100-69912012000200010.
25. Nassri CGG, Nassri AB, Favero E, Rotta CM, Martinez CAR, Margarido NF. Influence of irrigation of nutritional solutions in the colon excluded of fecal stream. Experimental study in rats. *Rev bras colo-proctol*. 2008 Jul-Sep;28(3):306-14. doi: 10.1590/S0101-98802008000300006.
26. Nonose R, Spadari APP, Priolli DG, Máximo FR, Pereira JA, Martinez CAR. Tissue quantification of neutral and acid mucins in the mucosa of the colon with and without fecal stream in rats. *Acta Cir Bras*. 2009 Jul-Aug;24(4):267-75. PMID: 19705025. doi: 10.1590/S0102-86502009000400005.
27. Pereira JA, Rodrigues MR, Sato DT, Silveira Júnior PP, Dias AM, Silva CG, Martinez CAR. Evaluation of sucralfate enema in experimental diversion colitis. *J. Coloproctol (Rio J)*. 2013 Nov-Dec; 33(4): 182-90. doi: 10.1016/j.jcol.2013.08.005
28. Pravda J. Radical induction theory of ulcerative colitis. *World J Gastroenterology*. 2005 Apr 28;11(16):2371-84. PMID: 15832404. doi: 10.3748/WJG.v11.i16.2371.
29. Sauer J, Richter KK, Pool-Zobel BL. Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *J Nutr Biochem*. 2007 Nov;18(11):736-45. PMID: 17434725. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.12.012
30. Scheiman JM, Kraus ER, Yoshimura K, Boland CR. Effect of sucralfate on components of mucosal barrier produced by cultured canine epithelial cells in vitro. *Dig Dis Sci*. 1992 Dec;37(12):1853-9. PMID: 1473434.
31. Slomiany BL, Piotrowski J, Tamura S, Slomiany A. Enhancement of the protective qualities of gastric mucus by sucralfate: role of phosphoinositides. *Am J Med*. 1991 Aug 8;91(2A):30S-36S. PMID: 1715671.
32. Sobrado, CW, Sobrado, LF. Management of acute severe ulcerative colitis: a clinical update. *Arq Bras Cir Dig*. 2016 Jul-Sep; 29(3):201-5. PMID: 27759787. doi: 10.1590/0102-6720201600030017.
33. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, Engelhardt H, Bengmark S, Koch S, Lochs H, Dörfel Y. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut*. 2007 Mar;56(3):343-50. PMID: 16908512. doi: 10.1136/gut.2006.098160.
34. Tong LC, Wang Y, Wang ZB, Liu WY, Sun S, Li L, Su DF, Zhang LC. Propionate ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis by improving intestinal barrier function and reducing inflammation and oxidative stress. *Front Pharmacol*. 2016 Aug;7:253. PMID: 27574508. doi: 10.3389/fphar.2016.00253.
35. Wachtershauser A, Stein J. Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases. *Eur J Nutr*. 2000 Aug;39(4):164-71. PMID: 11079736.
36. Willemsen LE, Koetsier MA, Van Deventer SJ, Van Tol EA. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E1 and E2 production by intestinal myofibroblasts. *Gut*. 2003 Oct; 52(10):1442-7. PMID: 12970137.
37. Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*. 2006 Mar;40(3):235-43. PMID: 16633129.