

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:FISIOLOGIA

Larissa Aguiar Santos

**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DA CEPA PROBIÓTICA DE  
*ENTEROCOCCUS FAECIUM* M7AN10 EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
RETocolite INDUZIDA POR DSS**

Porto Alegre

2023

Larissa Aguiar Santos

**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DA CEPA PROBIÓTICA DE  
*ENTEROCOCCUS FAECIUM* M7AN10 EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
RETocolite INDUZIDA POR DSS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Fisiologia.

**Orientador:** Profa. Dra. Ana Helena da Rosa Paz

**Coorientadora:** Profa. Dra. Amanda de Souza da Motta

## CIP - Catalogação na Publicação

Santos, Larissa Aguiar  
AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DA CEPA PROBIÓTICA DE  
ENTEROCOCCUS FAECIUM M7AN10 EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
RETocolite INDUZIDA POR DSS / Larissa Aguiar Santos.  
-- 2023.  
61 f.  
Orientador: Ana Helena da Rosa Paz.

Coorientador: Amanda de Souza da Motta.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Retocolite Ulcerativa. 2. DSS. 3. Probiótico. 4.  
Microbiota. I. Paz, Ana Helena da Rosa, orient. II.  
da Motta, Amanda de Souza, coorient. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, Rosana, ao meu pai, Cléber, e aos meus irmãos, Letícia e Ismael, por todo apoio, compreensão e incentivo de vocês. Sem vocês, eu não seria o que sou hoje. A bravura e honestidade de vocês é inspirador.

Ao meu noivo, César, que sempre está ao meu lado, me apoiando, me escutando e me ajudando a me tornar cada vez melhor. És o único capaz de me fazer sorrir independente das circunstâncias, tornando a vida mais simples e leve.

À minha vó, Geneci, por ter me acolhido e me apoiado, sem o teu carinho, o mestrado não teria sido o mesmo.

À prof. Ana por ter confiado em mim e ter me aceitado no seu grupo, sem nem me conhecer. Por todos os ensinamentos, conselhos e conversas. Teu incentivo e entusiasmo com a pesquisa foram essenciais.

À prof. Amanda por ser atenciosa e estar sempre disponível para me ajudar e me ensinar.

Ao grupo de pesquisa da Prof. Ana, não só pela ajuda nos experimentos, mas pelo companheirismo e amizade, tornando o trabalho mais leve e divertido.

Aos meus colegas do laboratório “Células, Tecidos e Genes”, que sempre estavam à disposição para tirar minhas dúvidas e me ajudar em experimentos.

Aos meus colegas da turma de mestrado, por compartilhar experiências, conquistas, conhecimentos e desabafos. Dividir essa etapa com vocês foi fundamental.

Agradeço ao HCPA e ao CNPq pelo suporte financeiro, permitindo minha dedicação exclusiva a este trabalho.

## RESUMO

A retocolite ulcerativa (RCU) é uma doença caracterizada por episódios recorrentes de inflamação que atinge predominantemente a mucosa do cólon e que ainda não possui etiologia e patogênese bem definidas. Fatores genéticos, ambientais, dietéticos e a inflamação crônica contribuem para sua fisiopatologia. Vários estudos já identificaram a presença da disbiose na RCU, por isso, o uso de probióticos surge como uma alternativa terapêutica, pois estes podem apresentar potencial anti-inflamatório e de recomposição da microbiota. Neste trabalho, foram avaliados os efeitos da administração do probiótico *Enterococcus faecium* M7AN10, isolado do leite de búfala, em modelo animal de retocolite ulcerativa induzida pela administração oral de 1,5% DSS (Dextran Sulfato de Sódio). O DSS foi administrado em água de beber por 7 dias. Os camundongos machos C57BL/6 receberam  $3,5 \times 10^8$  UFC/mL de *E. faecium* M7AN10, por gavagem, durante 11 dias, 1 vez ao dia, antes e durante a indução da RCU. Durante o protocolo os animais foram avaliados e o índice de atividade da doença (IAD) foi atribuído. Após a eutanásia, o intestino, o soro e as fezes foram coletados. A administração da cepa probiótica *E. faecium* M7AN10 mostrou atenuar o IAD da RCU, nos dias 8 ( $p=0,0018$ ) e 11 ( $p=0,0239$ ), e promoveu uma redução no conteúdo de água nas fezes. Além disso, *E. faecium* M7AN10 foi capaz de reduzir a perda de produção de muco ( $p=0,041$ ), os danos na mucosa e a inflamação no cólon, avaliados tanto por análise histológica ( $p=0,0058$ ), quanto por análise da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) ( $p=0,0012$ ). O tratamento probiótico reduziu os níveis colônicos de TNF- $\alpha$  ( $p=0,0139$ ) e aumentou os níveis de IL-17A ( $p=0,0405$ ), mas não alterou significativamente os níveis de IL-6 e IL-1 $\beta$ . Com base nos resultados, pode-se concluir que a cepa de *E. faecium* M7AN10 apresentou um efeito benéfico para os animais com RCU induzida por 1,5% DSS. Estudos adicionais são necessários para demonstrar se a suplementação promoveu alteração na composição da microbiota dos animais.

**Palavras-chave:** Retocolite ulcerativa. DSS. Probiótico. Microbiota.

## ABSTRACT

Ulcerative colitis (UC) is a disease characterized by recurrent episodes of inflammation that predominantly affects colonic mucosa. The disease still lacks well-defined etiology and pathogenesis. Genetic, environmental, dietary factors, and chronic inflammation contribute to its pathophysiology. Several studies have already identified the presence of dysbiosis in UC, therefore, the use of probiotics appears as a therapeutic alternative, as they may have anti-inflammatory potential and contribute to microbiota restoration. In this study, the effects of *Enterococcus faecium* M7AN10 probiotic administration, isolated from buffalo milk, were evaluated in an animal model of UC induced by oral administration of 1.5% DSS (Dextran Sulfate Sodium). DSS was administered in drinking water for 7 days. Male C57BL/6 mice received  $3.5 \times 10^8$  CFU/mL of *E. faecium* M7AN10 by gavage for 11 days, once a day, before and during UC induction. Throughout the protocol, the animals were evaluated, and the Disease Activity Index (DAI) was assigned. After euthanasia, the intestine, serum, and feces were collected. The administration of the probiotic strain *E. faecium* M7AN10 was shown to attenuate the DAI, in days 8 ( $p=0,0018$ ) and 11 ( $p=0,0239$ ) of UC and promote a reduction in fecal water content. Moreover, *E. faecium* M7AN10 reduced mucin production loss, mucosal damage, and inflammation in the colon, both through histological analysis ( $p=0,0058$ ) and myeloperoxidase (MPO) enzyme activity analysis ( $p=0,0012$ ). Probiotic treatment reduced colonic levels of TNF- $\alpha$  ( $p=0,0139$ ) and increased IL-17A levels ( $p=0,0405$ ), but did not significantly alter IL-6 and IL-1 $\beta$  levels. Based on these results, it can be concluded that the *E. faecium* M7AN10 strain had a beneficial effect on animals with DSS-induced UC at 1.5%. Additional studies are needed to demonstrate whether supplementation induced changes in the animals' microbiota composition.

**Keywords:** Ulcerative colitis. DSS. Probiotics. Microbiota.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Características das doenças inflamatórias intestinais.....	15
Figura 2 - Influência da microbiota na barreira intestinal.....	21
Figura 3 - Desenho experimental.....	31
Figura 4 - Recipiente de armazenamento das fezes para análise de conteúdo de água nas fezes.....	33
Figura 5- Índice de atividade da doença (IAD) e variação de peso.....	39
Figura 6 - Conteúdo de água nas fezes.....	40
Figura 7 - Análise macroscópica do cólon.....	41
Figura 8 - Escore histológico.....	42
Figura 9 - Imagens representativas das lâminas histológicas H&E de cada grupo...	42
Figura 10 - Área de tecido alcian blue +.....	43
Figura 11 - Imagens representativas das lâminas histológicas com coloração alcian blue de cada grupo.....	43
Figura 12 - Atividade de Mieloperoxidase.....	44
Figura 13 - Quantificação sérica de TNF- $\alpha$ .....	45
Figura 14 - Dosagem colônica de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A, TNF- $\alpha$ .....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação do Índice de Atividade da Doença.....	32
Tabela 2 – Graduação histológica da colite.....	35



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C2 - Acetato

C3 - Propionato

C4 - Butirato

CD4+ - Linfócitos T auxiliares

CEUA - Comitê de Ética de Uso de Animais

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DC - Doença de Crohn

DII - Doença inflamatória intestinal

DSS - Dextran Sulfato de Sódio

EROS - Espécies reativas de oxigênio

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

H&E - Hematoxilina e Eosina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

IFN- $\gamma$  - Interferon gama

IgA - Imunoglobulina A

IL-10 - Interleucina 10

IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6

IL-17A - Interleucina 17A

m<sup>2</sup> - Metros quadrados

MPO - Mieloperoxidase

RCU - Colite ulcerativa

SCFA - do inglês "short-chain fatty acids" - ácidos graxos de cadeia curta

TGF- $\beta$  - Fator de crescimento transformador beta

TGI - Trato gastrointestinal

Th - Linfócito T auxiliar

Th1 - Linfócito T auxiliar 1

Th2 - Linfócito T auxiliar 2

Th17 - Linfócito T auxiliar 17

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

Treg - Linfócito T regulatório

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	13
2.1.	Barreira intestinal .....	13
2.2.	Doenças inflamatórias intestinais .....	13
2.3.	Retocolite Ulcerativa .....	15
2.4.	Fisiopatologia da colite ulcerativa .....	16
2.5.	Tratamento .....	20
2.6.	Microbiota .....	20
2.7.	Disbiose e doenças inflamatórias intestinais .....	22
2.8.	Probióticos .....	23
2.9.	Cepa probiótica <i>Enterococcus faecium</i> M7AN10 .....	24
3	JUSTIFICATIVA .....	26
4	HIPÓTESE .....	27
5	OBJETIVOS .....	28
5.1.	Objetivo geral .....	28
5.2.	Objetivos específicos .....	28
6	MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
6.1.	Preparo do probiótico .....	29
6.2.	Procedimentos experimentais <i>in vivo</i> .....	29
6.2.1.	Animais .....	29
6.2.2.	Grupos experimentais .....	30
6.2.3.	Desenho experimental .....	30
6.2.1.	Indução da colite ulcerativa .....	30
6.2.2.	Administração do probiótico .....	31
6.2.3.	Avaliação do índice de atividade da doença .....	32
6.2.4.	Coleta de fezes .....	32
6.2.5.	Eutanásia .....	33
6.2.6.	Coleta de soro .....	34
6.2.7.	Análise da presença de água nas fezes .....	34
6.2.8.	Análise macroscópica dos intestinos .....	34
6.2.9.	Análise histológica dos intestinos .....	34
6.2.10.	Análise de mieloperoxidase .....	36
6.2.11.	Análise de citocinas .....	37
6.3.	Aspectos éticos .....	37

6.4. Análise estatística .....	37
7 RESULTADOS .....	39
7.1. Índice de Atividade da Doença.....	39
7.2. Conteúdo de água nas fezes .....	39
7.3. Parâmetros Macroscópicos.....	40
7.4. Análise histológica .....	41
7.5. Análise da produção de muco.....	43
7.6. Atividade de Mieloperoxidase .....	44
7.7. Inflamação Sistêmica .....	44
7.8. Avaliação da inflamação no cólon por quantificação de citocinas...45	
8 DISCUSSÃO .....	47
9 CONCLUSÃO .....	53
10PERSPECTIVAS .....	54
11 REFERÊNCIAS .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI) está em contato constante com microrganismos e toxinas que podem causar doenças, tendo a complexa tarefa de identificar quais são prejudiciais à saúde. Para isso possui múltiplos mecanismos de defesa para evitar uma hiper-reatividade imunológica e uma alteração da permeabilidade intestinal (BISCHOFF *et al.*, 2014).

Quando há algum distúrbio desta homeostase, algumas doenças podem se desenvolver, como é o caso das doenças inflamatórias intestinais (DII). A retocolite ulcerativa (RCU) é uma DII, que não possui etiologia e patogênese ainda bem definidas, porém já se sabe que a inflamação crônica e a disbiose são fatores presentes, havendo também uma predisposição genética envolvida. Além disso, fatores ambientais e hábitos de vida podem favorecer seu surgimento (MATIJAŠIĆ *et al.*, 2016).

Estudos recentes vêm elucidando a importância da microbiota para a fisiopatologia dessas doenças, demonstrando uma correlação significativa entre a disbiose e o desenvolvimento de DII (KESHTELI *et al.*, 2019; MENTELLA *et al.*, 2020; NI *et al.*, 2017; NIU *et al.*, 2022; SEISHIMA *et al.*, 2019; TONG *et al.*, 2021). Assim, o uso de probióticos como uma alternativa terapêutica está sendo proposto, já que estes podem apresentar potencial anti-inflamatório e capacidade de recompor a microbiota (CELIBERTO *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2019; WIEËRS *et al.*, 2020).

Neste trabalho, foram avaliados os efeitos da administração de um probiótico em modelo animal de retocolite ulcerativa induzida a partir da administração oral de 1,5% DSS (Dextran Sulfato de Sódio). A cepa de probiótico utilizada foi *Enterococcus faecium* M7AN10, descrita por (Kurtz, 2021a). Além de um artigo experimental demonstrando os efeitos do probiótico na colite ulcerativa, um artigo de revisão avaliando protocolos experimentais foi produzido.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Barreira intestinal**

As barreiras epiteliais conferem uma proteção mecânica contra agentes externos. A maior dessas barreiras está presente no TGI, separando o conteúdo do lúmen do meio interno do hospedeiro, com uma superfície de aproximadamente 400m<sup>2</sup>. Apesar de esta imensa área ser importante para o TGI desempenhar suas funções de digestão, absorção e excreção de maneira otimizada, esta superfície também fica sujeita ao contato com patógenos e toxinas (PETERSON; ARTIS, 2014).

O intestino tem a complexa tarefa de diferenciar antígenos potencialmente prejudiciais à saúde e antígenos que fazem parte da microbiota comensal ou de alimentos, os quais não devem causar reação imunológica em homeostase. Para isso, a barreira intestinal é composta de diversos componentes que mantêm esse equilíbrio, entre eles elementos mecânicos, como o muco e camada epitelial; elementos humorais, como defensinas e imunoglobulina A (IgA); e elementos imunológicos, como células da imunidade inata e adaptativa (BISCHOFF *et al.*, 2014).

A permeabilidade intestinal depende dessas características e, em estado de homeostase intestinal, não ocorre a entrada de patógenos, pois uma microbiota estável e a camada de muco evitam que bactérias patogênicas entrem em contato com o epitélio intestinal (BISCHOFF *et al.*, 2014; TAKIISHI *et al.*, 2017).

Muitos fatores podem alterar a permeabilidade intestinal, como modificações na microbiota intestinal, na camada de muco, na dieta e dano epitelial, resultando na movimentação do conteúdo luminal para as camadas internas da parede intestinal (BISCHOFF *et al.*, 2014). Essa modificação tem sido associada ao desenvolvimento de doenças inflamatórias no trato gastrointestinal, como doença celíaca, as doenças inflamatórias intestinais e síndrome do intestino irritável, bem como condições extradigestivas, como esquizofrenia, diabetes e sepse (SALVO-ROMERO *et al.*, 2015).

### **2.2. Doenças inflamatórias intestinais**

As DII consistem em uma inflamação crônica no intestino, resultando em destruição da mucosa e alteração da arquitetura histológica. Apresentam períodos de crise e remissão imprevisíveis e origem multifatorial, sendo que a etiologia e a patogênese ainda não estão bem estabelecidas. Acredita-se que a associação de

fatores genéticos, ambientais, inflamatórios e disbiose possam ser componentes importantes para o desenvolvimento dessas doenças (Figura 1) (MATIJAŠIĆ *et al.*, 2016).

As DII podem ser divididas em dois fenótipos clínicos: doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU), as quais se diferenciam em alguns aspectos nos sintomas apresentados e na fisiopatologia. A DC pode afetar toda a extensão do tubo digestório, promovendo uma inflamação transmural, enquanto a RCU afeta principalmente a mucosa colônica. A intensidade dos sintomas - para ambas - pode variar de leve a severa (KUCHARZIK *et al.*, 2020; BERNSTEIN *et al.*, 2015).

A inflamação crônica das DII, se não tratada ou tratada inadequadamente, pode resultar em danos intestinais contínuos, prejudicando a barreira epitelial. Com isso há risco aumentado de hospitalizações, cirurgias e de câncer colorretal. Ademais, a doença pode promover manifestações extraintestinais, como artrite, psoríase, pancreatite, entre outras (DU; HA, 2020; YU; RODRIGUEZ, 2017).

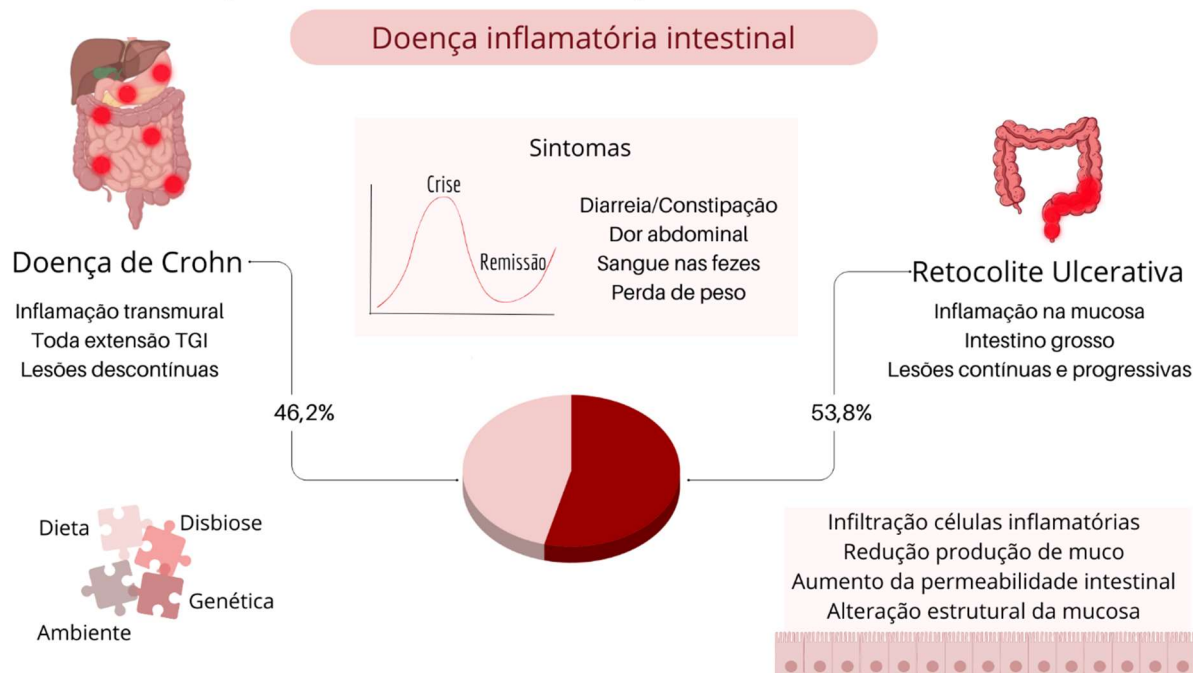
Para evitar possíveis complicações, o ideal é que se tenha um diagnóstico precoce, que pode favorecer a qualidade de vida do paciente. O diagnóstico das DII é feito com base nos sintomas clínicos, podendo ser realizados exames de imagem e laboratoriais para confirmar a doença. Entretanto, os sintomas inespecíficos dificultam o diagnóstico e até mesmo a classificação em DC ou RCU. Sendo assim, ressalta-se que o conhecimento da fisiopatologia destas pode facilitar esse processo (YU; RODRIGUEZ, 2017).

Nas últimas décadas houve um aumento mundial nos índices das DII, fato que pode ser demonstrado pelo aumento da incidência das DII em locais que antes tinham poucos casos documentados, como na África, América do Sul e Ásia. Esta mudança epidemiológica pode estar associada ao crescimento da industrialização, urbanização e da presença de alimentos ultraprocessados na dieta de países emergentes. Esta alteração alimentar influencia diretamente a qualidade da microbiota intestinal, fator importante na patogênese das DII (DU; HA, 2020; NG *et al.*, 2017).

Há poucos dados brasileiros sobre a epidemiologia das DII, já que estas doenças não são de notificação compulsória. Portanto, os dados do perfil das DII são provenientes, principalmente, de estudos epidemiológicos (QUARESMA *et al.*, 2019). O estudo de Gasparini *et al.* (2018), incluiu 22.638 pacientes do estado de São Paulo, sendo que 53,8% deles possuía a RCU e o restante (46,2%), a DC. Nesse estudo, a

incidência de DII foi de 13,3 novos casos/100.000 habitantes por ano, enquanto a prevalência foi de 52,6 casos/100.000 habitantes. Além disso, percebeu-se a predominância em pacientes acima de 40 anos, com média de 45,5 anos e maior ocorrência no sexo feminino (59,7%).

**Figura 1- Características das doenças inflamatórias intestinais**



Fonte: Elaborado pela autora. As doenças inflamatórias intestinais apresentam dois principais fenótipos: a doença de Crohn, que corresponde a 46,2% dos casos das DII, no Brasil, e pode afetar todo trato gastrointestinal, apresentando lesões descontínuas e inflamação transmural; e a retocolite ulcerativa, que representa 53,8% dos casos brasileiros de DII. Na RCU, a inflamação se limita à mucosa do intestino grosso e as lesões são contínuas e progressivas. Os sintomas para ambas as doenças são diarreia/constipação, sangue nas fezes e perda de peso, os quais ocorrem, normalmente, em períodos de crise e remissão. Fatores como dieta, disbiose, ambientais e genéticos favorecem o desenvolvimento das DII, nas quais há aumento de infiltrado inflamatório na mucosa intestinal, redução da produção de muco, aumento da permeabilidade intestinal e alteração estrutural da mucosa intestinal.

### 2.3. Retocolite Ulcerativa

O intestino grosso, o órgão afetado pela retocolite ulcerativa, realiza a absorção de nutrientes, principalmente eletrólitos e água, e a formação das fezes. Ele pode ser dividido anatômica e fisiologicamente em ceco, cólon, reto e ânus e é revestido por uma camada simples de células epiteliais, composta por enterócitos, que realizam a

absorção; células caliciformes, que produzem muco; células enteroendócrinas, que secretam hormônios locais; e células imunológicas (GARTNER, 2022).

Estas características e funções fisiológicas são alteradas quando há o aumento da permeabilidade intestinal resultante da redução da função das proteínas de junção oclusiva, o que torna a conexão entre as células epiteliais fraca e falha. Isso permite contato do conteúdo luminal com as camadas teciduais adjacentes ao epitélio, o que, por sua vez, pode causar infecções e propagar a inflamação (MIEHLKE *et al.*, 2019).

As lesões colíticas são contínuas e normalmente restritas à mucosa. Comumente, a RCU se inicia no reto e se difunde para as porções mais proximais do órgão, de acordo com a evolução da doença, havendo alterações na arquitetura das criptas. Destas alterações teciduais procedem os sinais e sintomas, como diarreia com sangue, dor abdominal, urgência fecal e tenesmo. Como consequência, a qualidade de vida fica prejudicada, uma vez que pacientes com RCU não tratada apresentam deficiência nutricional - devido à perda de funcionalidade intestinal (MIEHLKE *et al.*, 2019; KAENKUMCHORN; WAHBEH, 2020).

#### **2.4. Fisiopatologia da colite ulcerativa**

Apesar de a fisiopatologia da RCU ainda ser obscura, sabe-se que há a participação de fatores genéticos, ambientais, disbiose e um desequilíbrio imunológico. Já há descrição de vários genes envolvidos na patogênese das DII, sendo que há polimorfismos específicos para RCU, outros específicos à DC, além de polimorfismos associados tanto com a RCU quanto com a DC. A diversidade de polimorfismos envolvidos indica que a DII é um processo poligênico (FLYNN; EISENSTEIN, 2019).

Além dos fatores genéticos, os ambientais, como a dieta, a exposição a poluentes e hábitos de vida também influenciam na patogênese. Isso foi demonstrado por Pedersen *et al.* (2017), em que a retirada de alimentos fermentáveis da dieta, provocou a melhora dos sintomas intestinais, evidenciando a influência que a qualidade da dieta pode exercer nas DII (PEDERSEN *et al.*, 2017).

Na RCU observa-se dano epitelial, com produção anormal de muco e reparo defeituoso; expansão da inflamação; aumento do infiltrado de células T, células B, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos na lâmina própria; e falha na regulação imune para controlar a resposta inflamatória. As células da lâmina própria ativadas



produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias no tecido local, incluindo TNF, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , além de enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (GUAN, 2019).

Os neutrófilos, como componentes da imunidade inata, são recrutados para o tecido lesionado, onde estimulam o recrutamento de outras células imunes, que realizam a fagocitose de microrganismos além de liberar conteúdo intracelular com função antimicrobiana. As espécies reativas de oxigênio (EROS) são um produto dessas atividades protetivas, sendo que a enzima mieloperoxidase (MPO) é uma participante importante nesse processo de geração de EROS (CHAMI *et al.*, 2018).

A MPO é uma enzima lisossomal, liberada pelos fagócitos - neutrófilos, monócitos e macrófagos -, através dos grânulos primários, tanto na circulação sistêmica quanto nos tecidos. Esta peroxidase catalisa a conversão de íons haleto em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), contribuindo para o estresse oxidativo local. Sua expressão não é uniforme em todo o intestino grosso, sendo que esta variação se relaciona com a presença de inflamação. Portanto, a MPO pode ser utilizada como um marcador para a inflamação aguda, já que o aumento da concentração de MPO local corresponde ao aumento da presença de neutrófilos no tecido e, conseqüentemente, confirma a presença de inflamação (DAI *et al.*, 2018; MANCINI *et al.*, 2017).

Os linfócitos T auxiliares (CD4+) são células da imunidade adaptativa, que realizam ativação e recrutamento de outras células imunes, a defesa imune celular e produzem citocinas. As células T intestinais não ativadas podem se diferenciar em célula T regulatória (Treg) ou célula T auxiliar (Thelper, Th), de acordo com o estímulo recebido (YAN *et al.*, 2020). As células Treg desempenham um papel imunomodulador negativo, ao suprimirem as respostas imunes anormais contra a microbiota comensal ou antígenos dietéticos, através da produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$ , além do bloqueio da ativação e da ação de células T efetoras que escaparam de outros mecanismos de tolerância. Já as células Th, que podem ser subdivididas em Th1, Th2 e Th17, caracterizam-se pela produção de diferentes citocinas, com diferentes funções. Na homeostase intestinal há um equilíbrio entre células Th/Treg, o que garante que haja reação imunológica quando necessário, mas que seja um processo controlado, evitando sua propagação (HOOPER; MACPHERSON, 2010; YAN *et al.*, 2020).

Enquanto a função das células Th1 relaciona-se com infecção por bactérias intracelulares e protozoários, as células Th2 estão envolvidas na imunidade a helmintos e parasitas. As células Th17, por sua vez, estão ligadas às respostas dos neutrófilos e também são induzidas no contexto do reconhecimento de células apoptóticas infectadas (LEPPKES; NEURATH, 2020). Considerando esses fenótipos, frequentemente relaciona-se a RCU com maior presença de Th2, e a DC, com Th1. No entanto, com novos estudos, percebeu-se que há também uma participação significativa de Th17 e de suas citocinas na mucosa de pacientes com DII (ZHAO *et al.*, 2021).

As citocinas, liberadas por vários tipos celulares, funcionam como moléculas de sinalização celular que conduzem à inflamação e à patogênese da RCU, por meio da produção de mediadores e da ativação de vias inflamatórias. Como consequência, as citocinas são diretamente responsáveis pela lesão epitelial, defeito da barreira intestinal e dano tecidual (TATIYA-APHIRADEE *et al.*, 2018).

O fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), produzido por macrófagos, células dendríticas, células T, adipócitos e fibroblastos, pode exercer várias funções pró-inflamatórias na colite. Além de ser capaz de induzir a hipervascularização e angiogênese, altera a integridade da barreira epitelial intestinal ao aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e células T; promove a apoptose de células epiteliais intestinais e células de Paneth; promove a destruição tecidual; estimula a produção de proteínas de fase aguda e impulsiona a resistência das células T à apoptose (ELHAG *et al.*, 2022; FRIEDRICH *et al.*, 2019; NEURATH, 2014).

A interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), membro da família de citocinas da interleucina 1, possui função pró-inflamatória e é produzida principalmente por macrófagos ativados (COCCIA *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2021). Desempenha papel importante na propagação da resposta inflamatória nas DII, sendo que um aumento de IL-1 $\beta$  está associado ao aumento da gravidade da doença (LIGUMSKY *et al.*, 1990). Porém, o bloqueio da IL-1 $\beta$  não melhora os sintomas da RCU (WU *et al.*, 2022), o que mostra que seus efeitos são decorrentes da ação conjunta com outros mediadores, como IL-6 e TNF- $\alpha$  (MAO *et al.*, 2018).

O receptor 1 da IL-1 (IL-1R1) é expresso por diferentes células, como células epiteliais, células endoteliais e leucócitos, podendo induzir neutrofilia e promover a

migração de neutrófilos; e ativação, diferenciação e a sobrevivência das células T (COCCIA *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2021). Ademais, é capaz de aumentar a permeabilidade das junções oclusivas intestinais, o que pode resultar em uma penetração de bactérias intestinais do lúmen para a lâmina própria (RAWAT *et al.*, 2020).

A interleucina 6 (IL-6), em uma de suas amplas funções, medeia a comunicação entre células imunes e entre células epiteliais intestinais e a microbiota intestinal, com isso, participa da manutenção da homeostase intestinal e da integridade da mucosa (GUO *et al.*, 2021). Além disso, em processo inflamatório, é conhecida por agravá-lo, ao estimular a proliferação e diferenciação de linfócitos e ao recrutar e ativar macrófagos na mucosa intestinal, os quais secretam altas concentrações de moléculas inflamatórias (GUO *et al.*, 2021; LOPETUSO *et al.*, 2020).

As células Th17 são mais abundantes nas superfícies mucosas, principalmente na lâmina própria intestinal, e podem secretar mediadores químicos, como IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e IL-26. Em condições fisiológicas, estas células possuem funções protetivas, como resistir à infecção por bactérias e fungos patogênicos; mediar a proliferação e maturação de linfócitos, macrófagos e neutrófilos; promover a neutrofilia, estimular a remodelação/reparação de tecidos; e produção de peptídeos antimicrobianos, como as defensinas (JIANG *et al.*, 2014; MONTELEONE *et al.*, 2012; TRONCONE *et al.*, 2013).

A ausência de bactérias luminais e o tratamento com antibióticos reduz a presença de células Th17 na lâmina própria, evidenciando que a microbiota é um fator importante para a indução destas células (TANABE, 2013; TRONCONE *et al.*, 2013; YAN *et al.*, 2020). A função da IL-17A nas DII ainda é controversa, pois estudos mostram efeitos positivos, como a melhora da barreira intestinal e o aumento da susceptibilidade a infecções, quando ausente; e efeitos negativos, como o aumento da inflamação e da pontuação do Índice de Atividade da Doença (IAD). Além disso, um aumento na mucosa e no soro de IL-17A de pacientes com DII já foi relatado (CHUNG *et al.*, 2021; JIANG *et al.*, 2014; LUCACIU *et al.*, 2021; TANABE, 2013; TRONCONE *et al.*, 2013).

## 2.5. Tratamento

Os tratamentos não biológicos mais utilizados nas DII, envolvem as classes dos anti-inflamatórios, como os aminossalicilatos, dos imunossupressores, como as tiopurinas, dos glicocorticóides e dos antibióticos. Estas opções requerem uso por longos períodos e, ainda, podem não atingir os efeitos desejados (NA; MOON *et al.*, 2019; TATIYA-APHIRADEE *et al.*, 2018).

Estas opções terapêuticas visam induzir e manter o paciente em remissão, proporcionando uma melhora dos sintomas. Porém, não são capazes de modificar ou reverter o curso geral da doença. Por este motivo, novas alternativas de tratamento são requeridas. O uso de probióticos, prebióticos, transplante de microbiota fecal, transplante de célula tronco mesenquimal e adequação da dieta são algumas das recentes opções para o tratamento coadjuvante da colite (PITHADIA; JAIN, 2011).

## 2.6. Microbiota

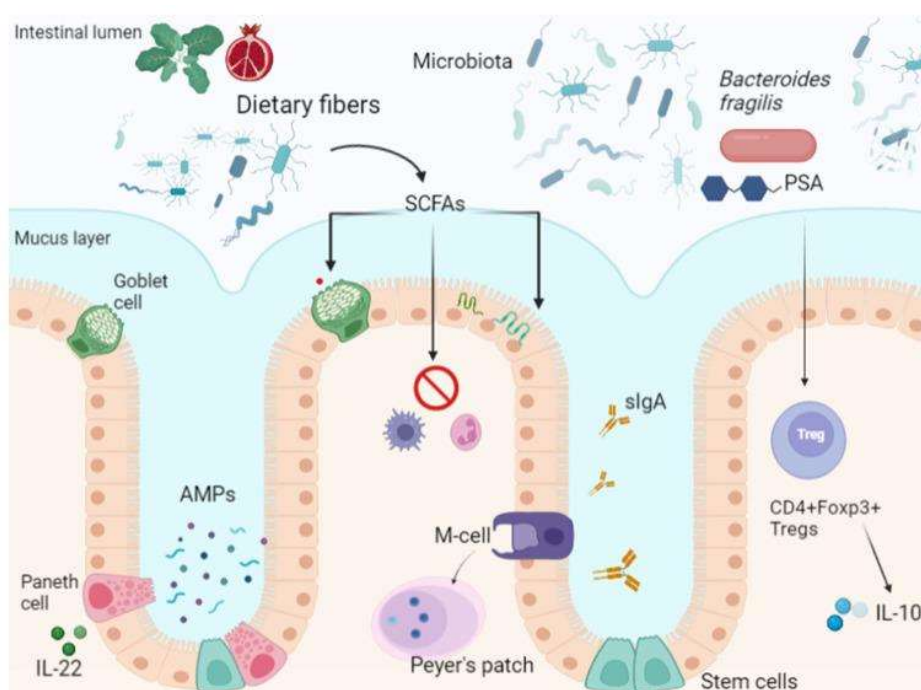
A microbiota intestinal corresponde a um grupo de microrganismos - bactérias, fungos, vírus e protozoários - que convivem em simbiose com o hospedeiro. Apresenta diversidade na qualidade e na quantidade de sua composição interindividual, já que fatores externos, como alimentação, sedentarismo e utilização de medicação contínua; e fatores intrínsecos, como idade, estresse e susceptibilidade genética, influenciam diretamente no seu arranjo (LEE; CHANG, 2021).

Estima-se que trilhões de microrganismos compõem a microbiota intestinal, havendo cerca 500 a 1000 espécies diferentes, e essa composição é dinâmica, variando até mesmo entre diferentes porções do TGI e em diferentes períodos de vida (WIEËRS *et al.*, 2020). Apesar da alta variedade de espécies, há 4 filos mais presentes em um adulto saudável: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, sendo que os dois primeiros representam cerca de 90% da microbiota (GLASSNER *et al.*, 2020; LEE; CHANG, 2021; MENTELLA *et al.*, 2020; NISHIDA *et al.*, 2018).

A microbiota exerce um papel importante na saúde dos indivíduos, já que desempenha funções imunológicas e nutricionais, podendo influenciar, também, em traços neurocomportamentais. Participa da maturação do sistema imunológico, modula a diferenciação das células T, regula o equilíbrio entre células Th1, Th2 e Th17 e Treg e reforça a homeostase da barreira intestinal (NISHIDA *et al.*, 2018; VALDES *et al.*, 2018).

Ainda em relação à defesa imunológica, quando não há presença de doença, os microrganismos comensais impedem a infecção por microrganismos patogênicos. Esta proteção se dá por ativação de respostas imunológicas celulares e químicas e por competitividade, uma vez que as bactérias comensais competem por nutrientes e secretam substâncias inibitórias aos patógenos (Figura 2) (NISHIDA *et al.*, 2018).

**Figura 2 - Influência da microbiota na barreira intestinal**



Fonte: Di Tommaso *et al.* (2021). A microbiota intestinal participa da imunidade ao competir por espaço e nutrientes contra as bactérias patogênicas, impedindo que estas habitem o intestino. Além disso, esses microrganismos comensais secretam metabólitos, como os SCFAs e PSA, modulando a atividade das células imunes. Os SCFAs, resultado do metabolismo das fibras alimentares, podem estimular a produção de muco, reduzir a produção de citocinas inflamatórias pelos neutrófilos e macrófagos e reforçar a barreira epitelial intestinal, ao modular as junções oclusivas. O PSA desempenha um papel anti-inflamatório ao estimular a diferenciação das células T em células T regulatórias, as quais secretam IL-10. A imunoglobulina A, secretada por plasmócitos que foram induzidos nas placas de Peyer, regula as respostas inflamatórias contra bactérias comensais, evitando a disbiose. Os AMPs são secretados pelas células de Paneth e atuam contra microrganismos patogênicos. SCFAs: ácidos graxos de cadeia curta; M-Cell: Células M; PSA: Polissacarídeo A; AMPs: peptídeos antimicrobianos; slgA: IgA.

Considerando-se o papel nutricional, este comensalismo fornece ao hospedeiro energia e nutrientes, aprimorando a eficiência digestiva. Isso é feito através da quebra

de polissacarídeos - as chamadas fibras - pelas bactérias, os quais não são digeridos por enzimas humanas. Assim, sem a quebra destes polímeros em monômeros, não é possível sua absorção pelos enterócitos, portanto, esse substrato é utilizado pelas bactérias intestinais para a fermentação anaeróbia (CRONIN *et al.*, 2021; HOLSCHER, 2017; HOOPER; MACPHERSON, 2010).

Através da fermentação anaeróbia, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, juntamente com bactérias fermentadoras, como *Bifidobacterium*, são capazes de utilizar estes polímeros, gerando ácidos graxos de cadeia curta (SCFA, do inglês “short-chain fatty acids”). Os principais produtos desta reação são o acetato (C2), o propionato (C3) e o butirato (C4) (VALDES *et al.*, 2018). Os SCFAs, especialmente butirato e propionato, provavelmente adentram as células do epitélio colônico por difusão passiva, sendo utilizados como fonte de energia, estimulando a atividade proliferativa e atuando na regulação da homeostase imunológica do intestino (LEE; CHANG, 2021; VENEGAS *et al.*, 2019).

Logo, a microbiota é um componente significativo para a saúde intestinal, de modo que suas alterações fazem parte do desenvolvimento de diversas doenças, como metabólicas, cardiovasculares, intestinais e alérgicas.

## **2.7. Disbiose e doenças inflamatórias intestinais**

A disbiose intestinal refere-se a alterações na composição e na função da microbiota intestinal. Estas mudanças provocam efeitos nocivos na saúde do hospedeiro, já que transformações qualitativas e quantitativas da microbiota resultam em mudanças nas atividades metabólicas e na distribuição local dos microrganismos (YOO *et al.*, 2020).

Um desequilíbrio na sua composição corresponde à redução de microrganismos benéficos e aumento de microrganismos patogênicos, os quais produzem e secretam toxinas. Com isso, a camada de muco e a mucosa intestinal ficam danificadas, o que aumenta a permeabilidade intestinal, facilitando o acesso de patógenos às células epiteliais e ao tecido da mucosa. Isso provoca um desequilíbrio do eixo Treg/Th e um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e, portanto, se desenvolve uma forte resposta inflamatória no hospedeiro (MATIJAŠIĆ *et al.*, 2016).

Deste modo, a disbiose pode desregular as respostas imunes do intestino, causando inflamação, estresse oxidativo e até mesmo resistência à insulina. Com o tempo, a disbiose crônica e a translocação de bactérias - e seus produtos metabólicos - podem aumentar a prevalência de Diabetes Mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias intestinais, doenças autoimunes e uma variedade de cânceres (YOO *et al.*, 2020).

A disbiose também está presente na patogênese da RCU, levando ou agravando a doença. Apesar de ainda não haver uma determinação exata das bactérias que contribuem para a colite, resultados de estudos destinados a caracterizar a microbiota das DII indicam uma diminuição generalizada da biodiversidade. Percebe-se o aumento de Proteobactérias, incluindo *Escherichia coli* e *Shigella* sp.; e a redução do filo Firmicutes, como a espécie *F. prausnitzii* e *Bacteroidetes*, e dos gêneros *Lactobacillus* e *Eubacterium* (KESHTELI *et al.*, 2019; MENTELLA *et al.*, 2020; NI *et al.*, 2017; NIU *et al.*, 2022; SEISHIMA *et al.*, 2019; TONG *et al.*, 2021).

Portanto, alterações na microbiota têm um papel determinante no desenvolvimento da doença. Já os fatores genéticos predis põem os indivíduos, e os fatores ambientais podem influenciar a ocorrência ou não da DII (MENTELLA *et al.*, 2020). Assim, abordagens terapêuticas como uma intervenção dietética de longo prazo, o uso de probióticos e prebióticos, podem restaurar esse fator importante para a saúde intestinal (MATIJAŠIĆ *et al.*, 2016).

## 2.8. Probióticos

Devido à correlação entre a qualidade da microbiota e o desenvolvimento de DII, o uso de probióticos tem sido o foco de muitas publicações, que buscam evidenciar os efeitos do tratamento, o mecanismo de ação e diferentes espécies benéficas. A definição atual de probiótico considera que microrganismos devem ser ingeridos em quantidade suficiente para ter um efeito positivo na saúde e que não se limitem aos efeitos nutricionais, impactando a microbiota residente, células do epitélio intestinal e o sistema imunológico (WIEËRS *et al.*, 2020).

A prevenção da constipação, da diarreia associada a antibióticos, melhora do sistema imunológico, restauração do epitélio intestinal e a modulação da produção de substâncias envolvidas na proliferação e maturação celular, como os SCFA, são

alguns exemplos da consequência da utilização dos probióticos, podendo haver aplicabilidade para tratar e prevenir estes e outros distúrbios intestinais, como as DII (CELIBERTO *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2019).

### **2.9. Cepa probiótica *Enterococcus faecium* M7AN10**

O gênero *Enterococcus* é caracterizado por ser Gram-positivo, catalase-negativo, não formador de esporos e anaeróbio facultativo e faz parte do filo Firmicutes. São bactérias que estão presentes em produtos alimentícios, como no queijo, peixes, carne suína e ultraprocessados - como nas salsichas; no ambiente, como no solo, plantas, água tratada e não tratada; e no TGI humano, desempenhando uma relação simbiótica (HOLZAPFEL *et al.*, 2018; RAMOS *et al.*, 2020).

Essas bactérias comensais mostram efeitos positivos em várias condições gastrointestinais e sistêmicas. Já há mais de 50 espécies diferentes de *Enterococcus* descritas, das quais *E. faecium* e *E. faecalis* são as mais comuns no TGI (HOLZAPFEL *et al.*, 2018).

A cepa *Enterococcus faecium* M7AN10 foi isolada do leite de búfala e identificada pelo grupo de pesquisa da Dra. Profa. Amanda de Souza Motta, do setor de Microbiologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Com base no estudo de Kurtz *et al.* (2021b) esta bactéria manteve a viabilidade celular após resfriamento, congelamento e liofilização, mantendo um número adequado de unidades formadoras de colônia, apresentou susceptibilidade a todos os antibióticos testados, apresentando somente o gene de resistência à eritromicina e não apresentou genes relacionados à virulência. A cepa ainda mostrou estabilidade quando exposta a sais biliares, fluidos gástricos e intestinais, foi capaz de aderir às células de linhagem celular Vero e mostrou eficiência no processo de microencapsulamento.

Os atributos citados acima são importantes considerações quando se trata da formulação de um novo probiótico, já que, segundo Kurtz *et al.* (2021b) para a comercialização alguns produtos necessitam liofilização e refrigeração. Além disso, não podem apresentar características favoráveis ao desenvolvimento de alguma infecção, bem como necessitam sobreviver aos diferentes ambientes do TGI, mantendo-se viáveis até chegar ao seu alvo: o intestino. Além disso, a capacidade de aderência dos probióticos às células intestinais determina a sua competência de



colonização. Ainda, o microencapsulamento auxilia na manutenção da viabilidade dos probióticos frente às variações de temperatura e de pH, que são típicas do TGI. Tendo essas qualidades, o *E. faecium* M7AN10 apresenta-se como possível probiótico, sendo necessária a realização de testes *in vivo* para identificar seus efeitos.

Apesar de o *Enterococcus* relacionar-se a infecções oportunistas, principalmente em situações de imunodepressão e internação hospitalar, muitos estudos já demonstraram que a administração de diferentes cepas de *Enterococcus* foi capaz de promover benefícios e reduzir os efeitos das doenças estudadas (ANANIA *et al.*, 2021; HE *et al.*, 2021; HOLZAPFEL *et al.*, 2018; RAMOS *et al.*, 2020; SCHAEFER; ENCK, 2019).

### 3 JUSTIFICATIVA

A RCU resulta em sintomas gastrointestinais, incluindo dor, diarreia, fezes com muco ou sangue e ulceração e dano tecidual no colón. A microbiota intestinal desempenha um papel crucial no desencadeamento, manutenção e exacerbação das DII, sendo que os probióticos podem ajudar a reequilibrar a microbiota de maneira positiva.

De forma geral, os estudos utilizam diversas cepas probióticas que demonstram capacidade em reduzir os escores endoscópicos e histológicos na RCU, mas existem poucos estudos que utilizam *Enterococcus faecium* como cepa probiótica em experimentos animais ou mesmo em estudos com pacientes com DII. Quando se buscam referências para *Enterococcus faecium* M7AN10 e RCU existem estudos na literatura. Dessa maneira, é importante avaliar qual o comportamento desta nova cepa com potencial probiótico na RCU.

Justifica-se o estudo em questão, através do qual será possível verificar a ação do *E. faecium* M7AN10 no modelo experimental de RCU e assim obter informações que poderão contribuir como uma nova cepa probiótica para auxiliar no tratamento da RCU.

#### **4 HIPÓTESE**

A administração oral de *Enterococcus faecium* M7AN10 é capaz de induzir melhora na atividade clínica, histológica e na microbiota intestinal, em modelo experimental de retocolite ulcertativa induzida por DSS.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da administração de *Enterococcus faecium* M7AN10 em modelo experimental de retocolite ulcerativa (RCU).

### 5.2. Objetivos específicos

Nos grupos experimentais controle, controle com indução de RCU e animais induzidos a RCU com tratamento com probiótico:

- a) Avaliar as características clínicas dos animais e inferir o Índice de Atividade da Doença;
- b) Avaliar os parâmetros macroscópicos do cólon dos animais, incluindo o peso e o comprimento;
- c) Avaliar os parâmetros microscópicos em lâminas histológicas preparadas a partir do cólon de animais em coloração de HE para histopatologia e alcian blue para quantificação de mucinas;
- d) Avaliar a presença de água nas fezes dos animais;
- e) Quantificar a atividade da enzima mieloperoxidase no cólon;
- f) Quantificar a citocina TNF- $\alpha$  no soro, através da técnica de ELISA;
- g) Avaliar os níveis de citocinas pró-inflamatórias no cólon dos animais, utilizando um ensaio multiplex;
- h) Avaliar a microbiota fecal, por sequenciamento de nova geração.

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1. Preparo do probiótico

A Profa. Amanda de Souza da Motta, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFRGS, integrante da equipe e colaboradora deste projeto, forneceu a suspensão do probiótico *Enterococcus faecium* M7AN10, isolado de leite bubalino.

Os isolados foram cultivados em caldo MRS (Man, Rogosa e Sharpe) a 37°C, por 24 h, e uma alíquota de 100 µL foi separada para contagem celular antes da administração aos animais.

Os cultivos foram centrifugados a 7.000 x g por 10 min para obtenção do precipitado de células, e foram feitas duas lavagens com PBS 1X (pH 7,0) para retirada de qualquer resquício do meio de cultura. A concentração administrada foi de aproximadamente  $3,5 \times 10^8$  UFC/mL.

O grupo de pesquisa da Profa. Amanda de Souza da Motta preparou as alíquotas de *Enterococcus faecium* M7AN10 para serem administradas ao grupo probiótico, as quais foram liofilizadas e congeladas a -80°C até o momento da administração. Antes da administração diária aos camundongos, as alíquotas foram descongeladas em geladeira (2 - 8°C). A ressuspensão das alíquotas foi feita somente antes da administração aos animais em 1mL de solução salina 0,9%.

### 6.2. Procedimentos experimentais *in vivo*

#### 6.2.1. Animais

Os camundongos C57BL/6 machos foram obtidos por intermédio da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), sendo aprovado pela CEUA do HCPA (nº 2020-0419). Os animais entre 8-12 semanas passaram por um período de aclimatação de 15 dias antes do início dos procedimentos experimentais seguindo o protocolo da UEA.

Foram alojados entre 2 e 3 camundongos por caixa, nas quais havia ração e água *ad libitum* e materiais de enriquecimento disponibilizados pela UEA, o qual conta com o fornecimento iglu/rolo de papel e papel toalha (itens fixos) + papel picado, algodão, papelão e corda (itens transitórios – trocados semanalmente). Os animais foram mantidos em ambiente climatizado (22°C ± 2°C), com ciclo claro/escuro de 12 horas e em condições padrão de umidade 40-60%. Fez-se necessário a utilização de

camundongos C57BL/6, porque essa linhagem é suscetível ao desenvolvimento da colite ulcerativa experimental através de indução por DSS.

### **6.2.2. Grupos experimentais**

Os animais (N=26) foram divididos em 3 grupos:

- 1) Controle (C): controle, com 6 animais.
- 2) DSS (DSS): controle doente, grupo que recebeu DSS 1,5% na água de beber, com 10 animais.
- 4) Probiótico (DSS+M7AN10): grupo que recebeu DSS 1,5% na água de beber e probiótico via gavagem, com 10 animais.

### **6.2.3. Desenho experimental**

Do dia 0 ao dia 5 todos os camundongos receberam água destilada *ad libitum*. O grupo controle continuou recebendo água destilada até o final do experimento (dia 12). Entre os dias 5 e 12 (7 dias), os grupos DSS e DSS+M7AN10 receberam 1,5% de dextran sulfato de sódio (DSS; peso molecular 36.000 - 50.000, MP Biomedicals, Solon, EUA) em água esterilizada, para induzir a retocolite. Os camundongos do grupo DSS+M7AN10 receberam 150 µL de *E. faecium* M7AN10 ( $3,5 \times 10^8$  UFC/mL) por gavagem, entre os dias 1 e 11, uma vez ao dia, proporcionando administração antes e durante o DSS (Figura 3). Todos os animais foram eutanasiados no dia 12, conforme descrito no item 6.2.8.

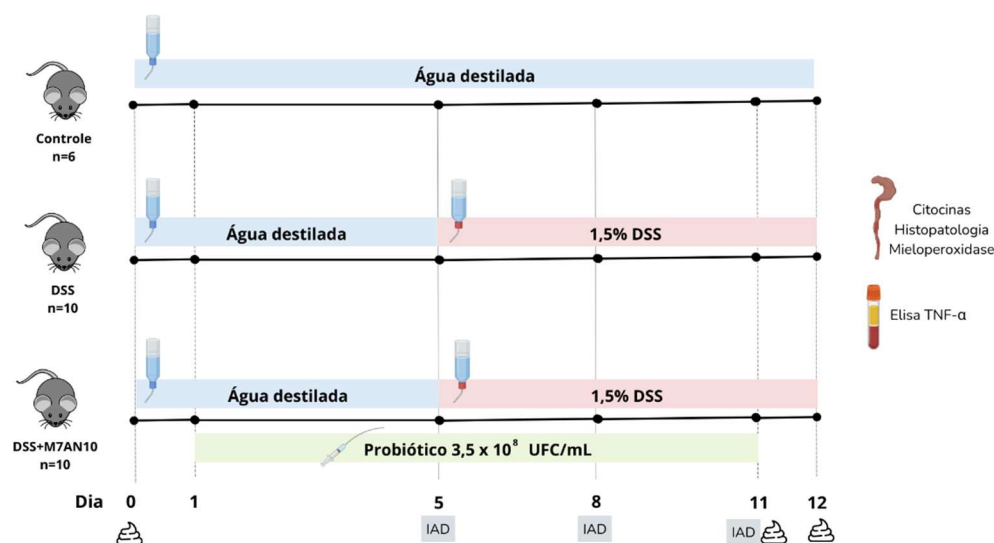
### **6.2.4. Indução da colite ulcerativa**

A retocolite ulcerativa foi induzida nos animais do grupo DSS e DSS+M7AN10 com a administração de Dextran Sulfato de Sódio (DSS, peso molecular 36.000 – 50.000 Da; MP Biomedicals), a uma concentração de 1,5% m/v, por 7 dias consecutivos (do dia 5 ao dia 12 do protocolo experimental), na água de beber. A quantidade de água foi estipulada de acordo com a ingestão média diária por cada animal (5 mL) multiplicado pelo total de dias de administração (7 dias) e pelo número de animais (20 animais). Assim, a quantidade de DSS foi pesada de acordo com este volume de água calculado, resultando em uma solução com concentração de 1,5%.

O DSS em pó foi diluído em água autoclavada um dia antes do início da sua administração, e armazenado em geladeira, durante o protocolo de indução da RCU.

A água com DSS, das caixas dos animais, foi trocada diariamente. O volume de água ingerido, por caixa foi medido, aproximadamente, de acordo com o volume de solução restante no falcon. Estes valores foram registrados em uma planilha, a fim de controle interno. O grupo controle recebeu somente água autoclavada.

**Figura 3 - Desenho experimental**



Fonte: elaborada pela autora. Os grupos DSS e DSS+M7AN10 receberam 1,5% DSS na água de beber do dia 5 ao dia 11. Somente o grupo DSS+M7AN10 recebeu probiótico, por meio de gavagem. Nos dias 5, 8, e 11 realizou-se o IAD. Nos dias 0 e 11 coletou-se fezes para o sequenciamento de microbiota. No último dia, coletou-se fezes para análise do conteúdo de água. Na eutanásia foram coletados soro, para dosagem de TNF- $\alpha$ , e o cólon para análise de citocinas, histopatologia e mieloperoxidase.

### 6.2.5. Administração do probiótico

O probiótico liofilizado foi ressuscitado somente antes da administração. Portanto, o preparo foi realizado diariamente. Administrou-se o probiótico por gavagem, utilizando agulha de gavagem para camundongos (de aço, cânula de 1,0 mm de diâmetro com esfera de 1,7 mm e comprimento de 31 mm). A gavagem foi realizada por profissionais treinados, 1 vez por dia, por 11 dias (do dia 1 ao dia 11). O probiótico foi administrado em temperatura ambiente.

Os animais do grupo DSS+M7AN10 receberam 150  $\mu$ L, por dia, da suspensão de probiótico, a uma concentração de  $3,5 \times 10^8$  UFC/mL. Os animais dos outros dois grupos não receberam gavagem.

### 6.2.6. Avaliação do índice de atividade da doença

O índice de atividade da doença (IAD) foi analisado nos dias 5, 8 e 11 do protocolo representando o primeiro dia da administração de DSS (dia 5 do protocolo), a metade do protocolo de DSS (dia 8 do protocolo) e o último dia da indução do DSS (dia 11 do protocolo) (Figura 3). No IAD são analisados três parâmetros: perda de peso, consistência das fezes e presença de sangue nas fezes e/ou no ânus (Tabela 1) (GONÇALVES *et al.*, 2013). Para perda de peso foi atribuído um escore de 0 a 4, enquanto para consistência das fezes e presença de sangue nas fezes/ânus foi atribuída uma pontuação de 0, 2 ou 4, resultando na pontuação total do IAD de 0 (não afetado) a 12 (doença severa). Estes dados foram reunidos por grupo experimental e expressos em gráfico com a variação do IAD em relação aos dias de avaliação.

**Tabela 1 - Avaliação do Índice de Atividade da Doença**

Pontuação	Perda de peso	Consistência das fezes	Sangue nas fezes/ânus
0	Nenhuma	Normal	Ausente
1	1% a 5%	-	-
2	5% a 10%	Fezes moles	Leve
3	10% a 15%	-	-
4	> de 15%	Diarreia aquosa	Bruto

Fonte: GONÇALVES *et al.*, 2013.

### 6.2.7. Coleta de fezes

A fim de analisar o conteúdo de água nas fezes dos animais, esta amostra foi coletada no dia 12 e pesada em balança analítica. As fezes foram armazenadas em recipiente aberto e que não absorvesse a água presente nas fezes, evitando interferência no resultado. Foram elaborados recipientes, para cada amostra, com papel alumínio, os quais foram fixados em uma bandeja de plástico (Figura 4). Assim, as amostras ficaram acondicionadas em recipiente adequado e que permitisse sua identificação. Após 3 dias, foram pesadas novamente e a diferença entre o peso seco e úmido compôs este dado.



Para a avaliação de metagenômica, fezes dos dias 0 e 11 foram coletadas. Após a coleta, foram armazenadas em microtubos estéreis, livres de DNase e RNase, a - 80°C até a realização da extração de DNA.

**Figura 4 - Recipiente de armazenamento das fezes para análise de conteúdo de água nas fezes**



Fonte: elaborada pela autora. Bandeja de plástico com os recipientes elaborados manualmente com papel alumínio. Abaixo de cada recipiente, há uma etiqueta (em rosa) identificando cada amostra.

### **6.2.8. Eutanásia**

Os animais foram eutanasiados no dia 12 do protocolo por sobredose anestésica por isoflurano (isoflurano 5% vaporizado em 100% O<sub>2</sub> 0,5 L/min). A confirmação da morte se deu através da verificação de ausência de movimento respiratório, de batimentos cardíacos e pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal.

Não houve administração de analgésico do tipo anti-inflamatórios esteroidais ou não-esteroidais, pois poderia alterar a permeabilidade do colón (FELDER *et al.*, 2000; GUSLANDI, 2006; OSTERMAN; LICHTENSTEIN, 2016). Ademais, opioides também não puderam ser empregados, pois estes são capazes de resultar em constipação, influenciando na análise da consistência das fezes e da microbiota (MÜLLER-LISSNER *et al.*, 2017; SZIGETHY *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018). Assim evitou-se estes vieses neste trabalho.

Para este procedimento, seguiu-se as normas propostas pela Resolução Normativa nº13 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

(CONCEA) e pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

#### **6.2.9. Coleta de soro**

O sangue foi coletado através da punção cardíaca dos animais após a sobredose de isoflurano. O sangue sedimentou por 20 a 30 min, em temperatura ambiente, e depois foi centrifugado a 1.000 x g, por 10 min, a 20-25°C. Então, separou-se o soro do conteúdo celular sanguíneo com uma micropipeta e transferiu-se para um microtubo, o qual foi armazenado a -80°C, até o momento da análise de citocinas.

#### **6.2.10. Análise da presença de água nas fezes**

Conforme descrito no item 6.2.4, as fezes coletadas foram armazenadas em recipiente que permitiu que a água presente no material biológico evaporasse. As fezes molhadas foram pesadas e, após três dias, foram pesadas novamente, a fim de analisar a diferença entre o peso molhado e seco das fezes. Assim, executou-se uma subtração entre os dois pesos para obter o valor de diferença (RAHMAN *et al.*, 2015).

#### **6.2.11. Análise macroscópica dos intestinos**

No dia da eutanásia, o intestino grosso foi coletado do ceco ao reto. Realizou-se a medida do comprimento e a pesagem do intestino. Logo após a coleta, o intestino foi disposto em superfície plana padronizada para todas as amostras ao lado de uma régua. O comprimento foi anotado em uma planilha e foi tirada uma foto do intestino, sua identificação e da régua.

Então, foram retirados o ceco e o ânus e o intestino foi limpo com solução salina 0,9%, retirando o bolo fecal residual. Após a lavagem, o intestino foi pesado em uma balança analítica e o resultado foi anotado em uma planilha.

#### **6.2.12. Análise histológica dos intestinos**

Após a análise macroscópica, o intestino foi processado utilizando a técnica de *swiss-roll*, que permite a avaliação de todo o seu comprimento de forma longitudinal. O tecido foi cortado longitudinalmente e um pedaço da porção mais distal foi seccionada, de maneira transversal, sendo destinado para análise de atividade de

mieloperoxidase (descrita no item 6.2.10) e para a análise de citocinas (descrita no item 6.2.11).

Em seguida o intestino foi enrolado e acondicionado em formalina tamponada 10%. Após 48h, as amostras foram colocadas em cassetes histológicos, para o processamento e corte do tecido. As seções do cólon foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E) e com alcian blue e foram analisadas em microscópio óptico.

As lâminas com coloração de alcian blue foram preparadas a fim de quantificar a produção de mucina. Utilizando um microscópio óptico, foram capturadas fotos de 5 campos, iniciando pela parte mais distal do órgão. Essas imagens foram analisadas pelo programa Image J, utilizando o *plugin Color Deconvolution*. Os resultados da área positiva a esta coloração formaram uma média para cada amostra, sendo este o valor utilizado na análise.

As amostras com coloração hematoxilina-eosina foram analisadas seguindo os critérios de Dieleman e colaboradores (1998), também utilizando-se um microscópio óptico. Cada parâmetro histológico (descrito na Tabela 2) foi multiplicado pela porcentagem de comprometimento do tecido (1 ponto para 1-25%, 2 pontos para 26-50%, 3 pontos para 51-75%, 4 pontos para 76-100%). Portanto, a severidade e a profundidade da inflamação tiveram uma escala de pontuações de 0 a 12, a regeneração e o dano à cripta de 0 a 16. O índice histológico da doença foi calculado como a soma dos produtos de todos os parâmetros.

**Tabela 2 – Graduação histológica da colite**

<b>Características</b>	<b>Grau</b>	<b>Descrição</b>
Inflamação	0	Nenhum
	1	Leve
	2	Moderado
	3	Severo
Extensão	0	Nenhum
	1	Mucosa
	2	Mucosa e submucosa
	3	Transmural

Regeneração	4	Nenhuma reparação tecidual
	3	Superfície epitelial não intacta
	2	Regeneração com depleção de cripta
	1	Regeneração quase completa
	0	Completa regeneração ou tecido normal
Dano à cripta	0	Nenhum
	1	Basal 1/3 danificado
	2	Basal 2/3 danificado
	3	Apenas a superfície do epitélio intacta
	4	Cripta inteira e epitélio perdido
Percentual de Envolvimento	1	1-25%
	2	26-50%
	3	51-75%
	4	76-100%

Fonte: DIELEMAN *et al.*, 1998.

### 6.2.13. Análise de mieloperoxidase

Foi realizado um teste colorimétrico de atividade da enzima MPO. Esta enzima realiza a redução de peróxido de hidrogênio em um complexo, o qual, ao reagir com o-dianisidina, resulta em um produto de cor amarela. A atividade de MPO pode ser calculada pela medição da densidade óptica em 460nm.

Com a coleta do intestino grosso, após análise macroscópica do tecido e antes do preparo da amostra para o corte histológico, cortou-se um pedaço fresco da porção mais distal, com peso variando entre 0,016 e 0,062 g. A amostra foi armazenada em microtubos estéreis a -80°C até o momento da análise.

Foi preparado um homogenato a 5%, utilizando um homogeneizador de tecidos. Utilizou-se o kit Myeloperoxidase (MPO) Activity Assay Kit, MyBioSource, e seguiu-se as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro SpectraMax M3, Molecular Devices, para leitura de ponto final a 460nm. Este resultado foi utilizado em uma fórmula, de acordo com as orientações do fabricante. O resultado desta fórmula foi expresso em U/g  $10^{-6}$ .

#### **6.2.14. Análise de citocinas**

Para analisar o perfil inflamatório de maneira sistêmica, o soro foi coletado conforme descrito no item 6.2.9. Um ensaio imunoenzimático baseado em proteínas (Elisa) foi utilizado para detectar os níveis de TNF- $\alpha$ , utilizando o Kit Rat TNF alfa Uncoated ELISA, Invitrogen, de acordo com as instruções do fabricante. O nível da citocina foi medido espectrofotometricamente (SpectraMax M3, Molecular Devices) a 450 nm e 570 nm, para medições de fundo.

Para analisar a inflamação no cólon, coletado conforme descrito no item 6.2.10, realizou-se, inicialmente, a homogeneização do tecido e a quantificação de proteínas. As amostras, com peso entre 250 e 350 mg, foram homogeneizadas com inibidor de protease SIGMAFAST™. A quantificação de proteínas foi realizada com o uso do reagente de Bradford e a leitura de ponto final foi feita em espectrofotômetro a 595 nm (SpectraMax M3, Molecular Devices)

Para a dosagem das citocinas do cólon, utilizou-se o kit Mouse ProcartaPlex Mix&Match 4-Plex, Invitrogen, para a dosagem de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17. Este imunoenensaio utiliza a tecnologia de *beads*, o que permite que mais de um analito seja mensurado em uma mesma reação. Com isso, uma pequena quantidade de amostra pode ser usada para dosar vários analitos.

#### **6.3. Aspectos éticos**

Este projeto foi aprovado pela CEUA do HCPA (nº 2020-0419) e registrado no Sistema Pesquisa da UFRGS (nº 42237). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as resoluções normativas vigentes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e de acordo com a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais.

#### **6.4. Análise estatística**

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisados pelo teste de ANOVA de uma via e ANOVA de duas vias, com o teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados não paramétricos foram apresentados como mediana e intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, com

o teste de comparações múltiplas de Dunn. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism, versão 6.1.

## 11 REFERÊNCIAS

ANANIA, Caterina et al. Treatment with a probiotic mixture containing *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* BB12 and *Enterococcus faecium* L3 for the prevention of allergic rhinitis symptoms in children: a randomized controlled trial. *Nutrients*, v. 13, n. 4, p. 1315, 2021.

BERNSTEIN, Charles et al. **World Gastroenterology Organisation Practice Guidelines - Doença inflamatória intestinal**, p. 38, 2015. Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/inflammatory-bowel-disease-ibd/inflammatory-bowel-disease-ibd-portuguese>. Acesso em: 06 out. 2022.

BISCHOFF, Stephan C. et al. Intestinal permeability—a new target for disease prevention and therapy. **BMC gastroenterology**, v. 14, p. 1-25, 2014.

CELIBERTO, Larissa Sbaglia et al. Effect of a probiotic beverage consumption (*Enterococcus faecium* CRL 183 and *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) in rats with chemically induced colitis. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0175935, 2017.

CHAMI, Belal et al. Myeloperoxidase in the inflamed colon: A novel target for treating inflammatory bowel disease. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 645, p. 61-71, 2018.

CHASSAING, Benoit et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Current protocols in immunology**, v. 104, n. 1, p. 15.25. 1-15.25. 14, 2014.

CHUNG, Soo-Hyun; YE, Xiao-Qi; IWAKURA, Yoichiro. Interleukin-17 family members in health and disease. **International immunology**, v. 33, n. 12, p. 723-729, 2021.

COCCIA, Margherita et al. IL-1 $\beta$  mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4+ Th17 cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 9, p. 1595-1609, 2012.

CRONIN, Peter et al. Dietary fibre modulates the gut microbiota. **Nutrients**, v. 13, n. 5, p. 1655, 2021.

DAI, Cong; JIANG, Min; SUN, Ming-Jun. Fecal markers in the management of inflammatory bowel disease. **Postgraduate medicine**, v. 130, n. 7, p. 597-606, 2018.

DAI, Cong et al. VSL# 3 probiotics exerts the anti-inflammatory activity via PI3k/Akt and NF- $\kappa$ B pathway in rat model of DSS-induced colitis. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 374, p. 1-11, 2013.

DI TOMMASO, Natalia; GASBARRINI, Antonio; PONZIANI, Francesca Romana. Intestinal barrier in human health and disease. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 23, p. 12836, 2021.

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

DU, Lillian; HA, Christina. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis. **Gastroenterology Clinics**, v. 49, n. 4, p. 643-654, 2020.

ELHAG, Duaa Ahmed et al. Inflammatory bowel disease treatments and predictive biomarkers of therapeutic response. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 13, p. 6966, 2022.

EICHELE, Derrick D.; KHARBANDA, Kusum K. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 33, p. 6016, 2017.

FELDER, Joseph B. et al. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on inflammatory bowel disease: a case-control study. **The American journal of gastroenterology**, v. 95, n. 8, p. 1949-1954, 2000.

FLYNN, Sean; EISENSTEIN, Samuel. Inflammatory bowel disease presentation and diagnosis. **Surgical Clinics**, v. 99, n. 6, p. 1051-1062, 2019.

FRIEDRICH, Matthias; POHIN, Mathilde; POWRIE, Fiona. Cytokine networks in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 992-1006, 2019.

FORCINA, Laura; FRANCESCHI, Claudio; MUSARÒ, Antonio. The hormetic and hermetic role of IL-6. **Ageing Research Reviews**, p. 101697, 2022.

FIDYA et al. Protective role of estrogen through G-protein coupled receptor 30 in a colitis mouse model. **Histochemistry and Cell Biology**, p. 1-13, 2023.

GAO, Hui et al. Saccharomyces boulardii ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice by regulating NF- $\kappa$ B and Nrf2 signaling pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

GARTNER, Leslie P. **Tratado de Histologia**. E-book, Grupo GEN, 2022, 5ª ed. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#!/books/9788595159003/>. Acesso em: 22 fev. 2023.

GASPARINI, Rodrigo Galhardi; SASSAKI, Ligia Yukie; SAAD-HOSSNE, Rogerio. Inflammatory bowel disease epidemiology in São Paulo state, Brazil. **Clinical and experimental gastroenterology**, p. 423-429, 2018.

GLASSNER, Kerri L.; ABRAHAM, Bincy P.; QUIGLEY, Eamonn MM. The microbiome and inflammatory bowel disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 145, n. 1, p. 16-27, 2020.

GONÇALVES, Fabiany da Costa et al. Characterization of acute murine dextran sodium sulfate (DSS) colitis: severity of Inflammation is dependent on the DSS



molecular weight and concentration. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. 1, p. 1-9, 2013.

GROZA, Yaroslava et al. IL-6 and its role in IgA nephropathy development. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 66, p. 1-14, 2022.

GUAN, Qingdong et al. A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Journal of immunology research**, v. 2019, 2019.

GUO, Yuexin et al. Biological characteristics of IL-6 and related intestinal diseases. **International journal of biological sciences**, v. 17, n. 1, p. 204, 2021.

GUSLANDI, Mario. Exacerbation of inflammatory bowel disease by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors: fact or fiction?. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 12, n. 10, p. 1509, 2006.

HE, Wei et al. Enterococcus faecium alleviates gut barrier injury in c57bl/6 mice with dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2021, 2021.

HOLSCHER, Hannah D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. **Gut microbes**, v. 8, n. 2, p. 172-184, 2017.

HOLZAPFEL, Wilhelm et al. Enterococcus faecium SF68 as a model for efficacy and safety evaluation of pharmaceutical probiotics. **Beneficial microbes**, v. 9, n. 3, p. 375-388, 2018.

HOOPER, Lora V.; MACPHERSON, Andrew J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 159-169, 2010.

HU, Tiantian et al. Preventive effect of Lactobacillus acidophilus XY27 on DSS-induced ulcerative colitis in mice. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 5645-5657, 2020.

HUANG, Zheng et al. Different effects of different Lactobacillus acidophilus strains on DSS-induced colitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, p. 14841, 2022.

JANG, You Jin et al. Lactobacillus fermentum species ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis by regulating the immune response and altering gut microbiota. **Gut microbes**, v. 10, n. 6, p. 696-711, 2019.

JIANG, Wenyu et al. Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease. **Inflammation Research**, v. 63, p. 943-950, 2014.

KAENKUMCHORN, Tanyaporn; WAHBEH, Ghassan. Ulcerative colitis: making the diagnosis. **Gastroenterology Clinics**, v. 49, n. 4, p. 655-669, 2020.

- KATSANDEGWAZA, Brunette; HORSNELL, William; SMITH, Katherine. Inflammatory bowel disease: A review of pre-clinical murine models of human disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9344, 2022.
- KAUR, Sukhvir et al. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 28, n. 5, p. 115327, 2020.
- KESHTELI, Ammar Hassanzadeh; MADSEN, Karen L.; DIELEMAN, Levinus A. Diet in the pathogenesis and management of ulcerative colitis; a review of randomized controlled dietary interventions. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1498, 2019.
- KIM, Seon-Kyun et al. Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 9 p. 1335-1340, 2019.
- KUCHARZIK, Torsten et al. Ulcerative colitis—Diagnostic and therapeutic algorithms. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 117, n. 33-34, p. 564, 2020.
- KURTZ, Jéssica Pires et al. An assessment of the innocuity of *Enterococcus faecium* isolated from buffalo milk in southern Brazil. **Current Research**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2021. a.
- KURTZ, Jéssica Nastácia Pires et al. The probiotic properties of *Enterococcus faecium* strains isolated from buffalo milk: food matrix studies. **Journal of clinical nutrition and food science. Hyderabad, India**, v. 4, n. 1, p. 17-29, 2021. b.
- LEE, Jacob S. et al. Interleukin-23-independent IL-17 production regulates intestinal epithelial permeability. **Immunity**, v. 43, n. 4, p. 727-738, 2015.
- LEE, Mirae; CHANG, Eugene B. Inflammatory bowel diseases (IBD) and the microbiome—searching the crime scene for clues. **Gastroenterology**, v. 160, n. 2, p. 524-537, 2021.
- LEPPKES, M.; NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel diseases—update 2020. **Pharmacological Research**, v. 158, p. 104835, 2020.
- LIGUMSKY, M. P. F. D. et al. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease--enhanced production during active disease. **Gut**, v. 31, n. 6, p. 686-689, 1990.
- LIU, Zhenzhen et al. *Bacillus coagulans* in combination with chitooligosaccharides regulates gut microbiota and ameliorates the Dss-induced colitis in mice. **Microbiology spectrum**, v. 10, n. 4, p. e00641-22, 2022.
- LOPETUSO, Loris Riccardo et al. Characterization of mucosal cytokine profile in ulcerative colitis patients under conventional and anti-TNF- $\alpha$  treatment. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 32, n. 12, p. 1527-1532, 2020.
- LUCACIU, Laura A. et al. Serum interleukin (IL)-23 and IL-17 profile in inflammatory bowel disease (IBD) patients could differentiate between severe and non-severe disease. **Journal of personalized medicine**, v. 11, n. 11, p. 1130, 2021.

LUERCE, Tessalia Diniz et al. Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. **Gut Pathogens**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2014.

MANCINI, Stefano et al. Myeloperoxidase expression in human colonic mucosa is related to systemic oxidative balance in healthy subjects. **Redox Report**, v. 22, n. 6, p. 399-407, 2017.

MAO, Liming et al. The role of NLRP3 and IL-1 $\beta$  in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2566, 2018.

MASOODI, Ibrahim et al. Evaluation of fecal myeloperoxidase as a biomarker of disease activity and severity in ulcerative colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 57, p. 1336-1340, 2012.

MATIJAŠIĆ, Mario et al. Gut microbiota beyond bacteria—mycobiome, virome, archaeome, and eukaryotic parasites in IBD. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 8, p. 2668, 2020.

MENTELLA, Maria Chiara et al. Nutrition, IBD and gut microbiota: a review. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 944, 2020.

MIEHLKE, Stephan et al. Microscopic colitis: pathophysiology and clinical management. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 4, n. 4, p. 305-314, 2019.

MOSCHEN, Alexander R.; TILG, Herbert; RAINE, Tim. IL-12, IL-23 and IL-17 in IBD: immunobiology and therapeutic targeting. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 3, p. 185-196, 2019.

MONTELEONE, I. et al. Th17-related cytokines in inflammatory bowel diseases: friends or foes? **Current molecular medicine**, v. 12, n. 5, p. 592-597, 2012.

MÜLLER-LISSNER, Stefan et al. Opioid-induced constipation and bowel dysfunction: a clinical guideline. **Pain Medicine**, v. 18, n. 10, p. 1837-1863, 2017.

NA, Soo-Young; MOON, Won. Perspectives on current and novel treatments for inflammatory bowel disease. **Gut and Liver**, v. 13, n. 6, p. 604, 2019.

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

NG, Siew 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.

NI, Josephine et al. Gut microbiota and IBD: causation or correlation?. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 14, n. 10, p. 573-584, 2017.

NIU, Meng-Meng et al. Bifidobacterium breve alleviates DSS-induced colitis in mice by maintaining the mucosal and epithelial barriers and modulating gut microbes. **Nutrients**, v. 14, n. 18, p. 3671, 2022.

NISHIDA, Atsushi et al. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Clinical journal of gastroenterology**, v. 11, p. 1-10, 2018.

O'CONNOR JR, William et al. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. **Nature immunology**, v. 10, n. 6, p. 603-609, 2009.

OSTERMAN, M. T.; LICHTENSTEIN, G. R. Sleisenger and Fordtran's. **Gastrointestinal and Liver Disease**. 10 ed. 2016.

PITHADIA, Anand B.; JAIN, Sunita. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). **Pharmacological Reports**, v. 63, n. 3, p. 629-642, 2011.

PEDERSEN, Natalia et al. Low-FODMAP diet reduces irritable bowel symptoms in patients with inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 18, p. 3356, 2017.

PERŠE, Martina et al. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

PETERSON, Lance W.; ARTIS, David. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 141-153, 2014.

QUARESMA, Abel B.; KAPLAN, Gilaad G.; KOTZE, Paulo 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.

RAHMAN, Ahmed A. et al. Alterations in the distal colon innervation in Winnie mouse model of spontaneous chronic colitis. **Cell and tissue research**, v. 362, p. 497-512, 2015.

RAMOS, Sónia et al. Enterococci, from harmless bacteria to a pathogen. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1118, 2020.

RAWAT, Manmeet et al. IL1B increases intestinal tight junction permeability by up-regulation of MIR200C-3p, which degrades occludin mRNA. **Gastroenterology**, v. 159, n. 4, p. 1375-1389, 2020.

RODRÍGUEZ-NOGALES, Alba et al. Intestinal anti-inflammatory effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* in DSS-induced colitis in mice: Impact on microRNAs expression and gut microbiota composition. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 61, p. 129-139, 2018.

SALVO ROMERO, Eloísa et al. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. **Rev Esp Enferm Dig**, v. 107, n. 11, p. 686-96, 2015.

SCHAEFER, Michael; ENCK, Paul. Effects of a probiotic treatment (*Enterococcus faecalis*) and open-label placebo on symptoms of allergic rhinitis: study protocol for a randomised controlled trial. **BMJ open**, v. 9, n. 10, p. e031339, 2019.

SCHIEROVA, Dagmar et al. Fecal microbiome changes and specific anti-bacterial response in patients with IBD during anti-TNF therapy. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 3188, 2021.

SEISHIMA, Jun et al. Gut-derived *Enterococcus faecium* from ulcerative colitis patients promotes colitis in a genetically susceptible mouse host. **Genome Biology**, v. 20, p. 1-18, 2019.

SPALINGER, Marianne R. et al. The JAK inhibitor tofacitinib rescues intestinal barrier defects caused by disrupted epithelial-macrophage interactions. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 15, n. 3, p. 471-484, 2021.

SRUTKOVA, Dagmar et al. *Bifidobacterium longum* CCM 7952 promotes epithelial barrier function and prevents acute DSS-induced colitis in strictly strain-specific manner. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0134050, 2015.

SUN, Siyuan et al. Lactic acid-producing probiotic *Saccharomyces cerevisiae* attenuates ulcerative colitis via suppressing macrophage pyroptosis and modulating gut microbiota. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 777665, 2021.

SZIGETHY, Eva; KNISELY, Mitchell; DROSSMAN, Douglas. Opioid misuse in gastroenterology and non-opioid management of abdominal pain. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 3, p. 168-180, 2018.

TAKIISHI, Tatiana; FENERO, Camila Ideli Morales; CÂMARA, Niels Olsen Saraiva. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. **Tissue barriers**, v. 5, n. 4, p. e1373208, 2017.

TANABE, Soichi. The effect of probiotics and gut microbiota on Th17 cells. **International Reviews of Immunology**, v. 32, n. 5-6, p. 511-525, 2013.

TATIYA-APHIRADEE, Nitima; CHATUPHONPRASERT, Waranya; JARUKAMJORN, Kanokwan. Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 1-10, 2018.

TRONCONE, Edoardo et al. Th17 cytokines in inflammatory bowel diseases: discerning the good from the bad. **International Reviews of Immunology**, v. 32, n. 5-6, p. 526-533, 2013.

TONG, Lingjun et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG derived extracellular vesicles modulate gut microbiota and attenuate inflammatory in DSS-induced colitis mice. **Nutrients**, v. 13, n. 10, p. 3319, 2021.

VALDES, Ana M. et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. **Bmj**, v. 361, p. 36-44, 2018.

VENEGAS, Daniela Parada et al. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1-16, 2019.

WAGNEROVA, Alexandra et al. Sex differences in the effect of resveratrol on DSS-induced colitis in mice. **Gastroenterology research and practice**, v. 2017, 2017.

WANG, Fuyuan et al. Morphine induces changes in the gut microbiome and metabolome in a morphine dependence model. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 3596, 2018.

WIEËRS, Grégoire et al. How probiotics affect the microbiota. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 1-9, 2020.

WU, Wan-Jung H. et al. Interleukin-1 $\beta$  secretion induced by mucosa-associated gut commensal bacteria promotes intestinal barrier repair. **Gut Microbes**, v. 14, n. 1, p. 2014772, 2022.

YAN, Jun-bin et al. The function and role of the Th17/Treg cell balance in inflammatory bowel disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2020, p. 1-8, 2020.

YANGYANG, R. Yu; RODRIGUEZ, J. Ruben. Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. In: **Seminars in pediatric surgery**. WB Saunders, p. 349-355, 2017.

YAO, Dianbo et al. Inflammation and inflammatory cytokine contribute to the initiation and development of ulcerative colitis and its associated cancer. **Inflammatory bowel diseases**, v. 25, n. 10, p. 1595-1602, 2019.

YOO, Ji Youn et al. Gut microbiota and immune system interactions. **Microorganisms**, v. 8, n. 10, p. 1587, 2020.

ZHANG, Wei-Qin et al. The lactobacillus gasseri G098 strain mitigates symptoms of DSS-induced inflammatory bowel disease in mice. **Nutrients**, v. 14, n. 18, p. 1-13, 2022.

ZHAO, Junjun et al. Th17 cells in inflammatory bowel disease: cytokines, plasticity, and therapies. **Journal of Immunology Research**, v. 2021, p. 1-14 2021.

ZHU, Yefei et al. Probiotic cocktail alleviates intestinal inflammation through improving gut microbiota and metabolites in colitis mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1-13, 2022.