

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE
MEDICINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM
GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA

Francine dos Santos

**Avaliação da administração da cepa probiótica de *Enterococcus faecium*
M7AN10 em modelo experimental de colite induzida por DSS: foco na
neuroinflamação**

Porto Alegre

2024

Francine dos Santos

**Avaliação da administração da cepa probiótica de *Enterococcus faecium*
M7AN10 em modelo experimental de colite induzida por DSS: foco na
neuroinflamação**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Helena da Rosa Paz

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Padilha Guedes

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos, Francine

Avaliação da administração da cepa probiótica de *Enterococcus faecium* M7AN10 em modelo experimental de colite induzida por DSS: foco na neuroinflamação / Francine dos Santos. -- 2024.

100 f.

Orientadora: Ana Helena da Rosa Paz.

Coorientadora: Renata Padilha Guedes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Doença inflamatória intestinal. 2. *Enterococcus faecium*. 3. Eixo intestino-cérebro. 4. Neuroinflamação. 5. Probióticos. I. da Rosa Paz, Ana Helena, orient. II. Padilha Guedes, Renata, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à memória de meus pais Ana da Silva Preto e Remes Preto, com todo meu amor e gratidão por todo esforço que sempre fizeram por mim, especialmente quanto à minha formação.

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos:

Aos meus pais, Ana da Silva Preto (*in memorian*) e Remes Preto (*in memorian*), por sempre me incentivarem a estudar. Sei o quanto valorizavam a educação e estou de certa forma realizando o sonho deles também.

À professora Dra. Ana Helena da Rosa Paz, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa sem me conhecer, agradeço pela confiança, pela oportunidade de realizar meu sonho e por acreditar no meu potencial. Agradeço por me guiar na elaboração e execução deste trabalho e sempre me incentivar a dar o meu melhor. Obrigada pela paciência em acolher uma nutricionista clínica em sua primeira experiência pelo mundo da pesquisa experimental. Serei sempre grata por todo o carinho e conselhos recebidos. Tu te tornaste uma referência de mulher, mãe, pesquisadora e professora para mim, aprendi muito mais do que “só” ciência sendo sua aluna, aprendi o valor de colocar amor e otimismo no que se faz. Muito obrigada por tudo!

A todas as minhas colegas do “grupo DII”, agradeço a colaboração com os experimentos, parceria e amizade. Em especial as ICs que participaram ativamente deste trabalho ao meu lado: Giovana Raphaelli, Luísa Biesek e Isabela Schames, obrigada pelo profissionalismo, apoio, companheirismo, pela amizade e por todo o aprendizado que obtive trabalhando com vocês. Vocês tornaram os meses de experimentos muito mais divertidos!

Aos queridos colegas, alunos e professores do CTG, agradeço por todo aprendizado, acolhimento, conselhos, trocas e risadas. Em especial aos pós-docs: Esteban Gonzales, Patrícia Grudzinski e Angélica Salatino. Fui muito feliz neste laboratório!

À professora Dra. Renata Guedes, por me coorientar neste trabalho e contribuir com sua experiência, e à professora Amanda Motta pela parceria e dedicação oferecidas.

As minhas amigas Aline Couto, Greice Benites, Denise Diedrich e Paola Piumato. Obrigada, gurias, por sempre me oferecerem um ombro amigo e palavras de incentivo. Sei o quanto torcem por mim!

A minha família, por estar ao meu lado em todo esse processo, agradeço todo amor e torcida por meu sucesso profissional. Vocês foram fundamentais!

Aos técnicos da UFRGS que se tornaram amigos, Cris Krebs e Maikel Oliveira, obrigada pela paciência e colaboração com este trabalho.

Aos profissionais da UEA, em especial, à médica veterinária Tuane Garcez, que foi essencial na execução deste trabalho e também à enfermeira Marta Giustina, com quem pude contar com o apoio desde a elaboração do projeto. Agradeço também aos técnicos Rosa e Inácio pela parceria. Muito obrigada à equipe UEA pela colaboração, acolhimento, pelo carinho com que sempre fui recebida e pelos grandes ensinamentos! Os meses em que convivi com vocês foram uma experiência valiosa!

Aos profissionais da UPL e CPE.

Ao HCPA e à UFRGS meu agradecimento e orgulho de pertencer mais uma vez. Agradeço a oportunidade recebida e contribuição com a minha formação e capacitação profissional.

Por fim, agradeço aos financiadores deste trabalho, Fipe/HCPA e à Capes. Em um país com tanta desigualdade, poder me dedicar exclusivamente a este trabalho foi um grande privilégio.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL.....	11
2.2 RETOCOLITE ULCERATIVA E DOENÇA DE CROHN.....	13
2.3 INFLAMAÇÃO SISTÊMICA NA DII.....	15
2.4 MANIFESTAÇÕES EXTRAINTestinaIS DA DII E NEUROINFLAMAÇÃO... ..	17
2.5 EIXO INTESTINO-CÉREBRO.....	21
2.5.1 Rotas para sinalizar a inflamação através do eixo intestino-cérebro....	22
2.6 MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL PELO USO DE PROBIÓTICOS.....	25
2.7 ENTEROCOCCUS FAECIUM M7AN10.....	27
2.8 MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE ULCERATIVA.....	28
3 JUSTIFICATIVA.....	31
4 QUESTÃO DE PESQUISA.....	32
5 HIPÓTESE.....	33
6 OBJETIVOS.....	34
6.1 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS.....	34
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
6.3 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	35
6.4 ANIMAIS.....	35
6.5 AMOSTRA E CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA.....	35
6.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	36
6.6.1 Desenho experimental.....	36
6.7 ADMINISTRAÇÃO DO PROBIÓTICO.....	37
6.7.1 Preparo e administração do probiótico.....	37

6.8	INDUÇÃO DE COLITE ULCERATIVA AGUDA POR DSS.....	38
6.9	AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA E DA DOR.....	38
6.10	COLETA DE FEZES	39
6.11	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	40
6.11.1	Open Field	40
6.11.2	Plus Maze.....	41
6.12	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE MATERIAIS BIOLÓGICOS	42
6.13	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS CÓLONS.....	42
6.14	DOSAGEM DE CITOCINAS	43
6.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
6.16	QUESTÕES ÉTICAS	44
7	RESULTADOS.....	45
8	DISCUSSÃO	46
9	CONCLUSÃO	47
10	PERSPECTIVAS/CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	APÊNDICE A - ARTIGO	57

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) são um grupo de distúrbios gastrointestinais caracterizados por inflamação crônica e disbiose da microbiota intestinal. Os dois principais fenótipos de DII são a doença de Crohn (DC), e a retocolite ulcerativa (RCU) ou colite. Estudos recentes têm associado as DII com transtornos psiquiátricos como ansiedade, depressão, demência, doença de Alzheimer, Parkinson entre outras. Uma das possíveis causas é a inflamação do sistema nervoso central (SNC). Esta pode ocorrer a partir da inflamação intestinal, ou da disfunção do sistema nervoso entérico (SNE) que aumentam a permeabilidade intestinal facilitando a translocação de enterotoxinas intestinais para a circulação. A literatura mostra que o uso de probióticos pode contribuir para induzir a remissão das DII ou reduzir a exacerbação dos sintomas inflamatórios, influenciando diretamente a atividade da doença e/ou alterando o sistema imune da mucosa intestinal e a sua microbiota. Além disso, uma vez que bactérias do intestino e seus subprodutos, podem estar associados ao desenvolvimento de neuroinflamação, o uso de probióticos poderia promover redução na neuroinflamação. Neste trabalho, avaliamos os efeitos do Dextran Sulfato de Sódio (DSS) no desenvolvimento da colite e da neuroinflamação, bem como a administração do probiótico *Enterococcus faecium* M7AN10 como possível estratégia terapêutica. Para tal, o modelo de colite experimental foi induzido em camundongos C57BL/6 pela administração oral de 2% DSS na água para beber por 7 dias. Os animais foram divididos em 4 grupos sendo eles: controle saudável, M7AN10, DSS e DSS+M7AN10. Os grupos controle saudável e DSS, receberam gavagem de solução salina, os demais grupos receberam $3,5 \times 10^8$ UFC de *E. faecium* M7AN10, via gavagem, durante 12 dias, antes e durante a indução da RCU. Durante o protocolo, o índice de atividade da doença (IAD) foi atribuído. Também foram realizados os testes comportamentais *open field* e *plus maze* para avaliar comportamento tipo ansioso. Após a eutanásia, o cérebro e o intestino foram coletados para avaliação histológica e dosagem de citocinas. Quanto aos sintomas da RCU, a administração da cepa probiótica *E. faecium* M7AN10 mostrou atenuar o IAD bem como o dano histológico, entretanto o probiótico não atenuou o encurtamento do intestino causado pelo DSS. Em relação a neuroinflamação, foi observado que a colite aguda induzida por DSS a 2% não

promove alterações comportamentais. Entretanto o DSS aumentou os níveis de IL1- β , IL-6 e TNF- α no hipotálamo, o que foi revertido pelo probiótico no grupo DSS+M7AN10. Não foi observado o aumento das referidas citocinas em hipocampo e córtex cerebral. Interessantemente, animais saudáveis que receberam a cepa probiótica de *E. faecium* - grupo M7AN10- também apresentaram aumento de IL1- β , IL-6, TNF-a e ainda IL17a no hipotálamo mesmo sem a presença da inflamação intestinal. Estes achados sugerem que a cepa probiótica M7AN10 auxilia na redução da neuroinflamação e sintomas da colite ulcerativa nos animais com inflamação intestinal, entretanto em animais saudáveis, sua aplicação promove neuroinflamação possivelmente associada à alteração na composição da microbiota. Os dados apontam para uma revisão na indicação de probióticos de forma profilática.

palavras-chave: Doença inflamatória intestinal, *Enterococcus faecium*, DSS, eixo intestino-cérebro, neuroinflamação, probióticos

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBDs) are a group of gastrointestinal disorders characterized by chronic inflammation and dysbiosis of the intestinal microbiota. The two main phenotypes of IBD are Crohn's disease (CD), and ulcerative colitis (UC) or colitis. Recent studies have associated IBD with psychiatric disorders such as anxiety, depression, dementia, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease, among others. One of the possible causes is inflammation of the central nervous system (CNS). This can occur from intestinal inflammation, or dysfunction of the enteric nervous system (ENS), which increases intestinal permeability, facilitating the translocation of intestinal enterotoxins into the circulation. The literature shows that the use of probiotics can contribute to inducing remission of IBD or reducing the exacerbation of inflammatory symptoms, directly influencing the activity of the disease and/or altering the immune system of the intestinal mucosa and its microbiota. Furthermore, since gut bacteria and their byproducts may be associated with the development of neuroinflammation, the use of probiotics could promote a reduction in neuroinflammation. In this work, we evaluated the effects of Dextran Sodium Sulfate (DSS) on the development of colitis and neuroinflammation, as well as the administration of the probiotic *Enterococcus faecium M7AN10* as a possible therapeutic strategy. To this end, the experimental colitis model was induced in C57BL/6 mice by oral administration of 2% DSS in drinking water for 7 days. The animals were divided into 4 groups: healthy control, M7AN10, DSS, and DSS+M7AN10. The healthy control and DSS groups received saline gavage, the other groups received 3.5×10^8 CFU of *E. faecium M7AN10*, via gavage, for 12 days, before and during UC induction. During the protocol, the disease activity index (DAI) was assigned. Open field and plus maze behavioral tests were also carried out to assess anxiety-like behavior. After euthanasia, the brain and intestine were collected for histological evaluation and cytokine measurement. Regarding UC symptoms, administration of the probiotic strain *E. faecium M7AN10* was shown to attenuate IAD as well as histological damage, however, the probiotic did not attenuate the shortening of the intestine caused by DSS. Regarding neuroinflammation, it was observed that acute colitis induced by 2% DSS does not promote behavioral changes. However, DSS increased the levels of IL1- β , IL-6, and

TNF- α in the hypothalamus, which was reversed by the probiotic in the DSS+M7AN10 group. An increase in the aforementioned cytokines was not observed in the hippocampus and cerebral cortex. Interestingly, healthy animals that received the probiotic strain of *E. faecium* - group M7AN10 - also showed an increase in IL1- β , IL-6, TNF- α , and even IL17a in the hypothalamus even without the presence of intestinal inflammation. These findings suggest that the M7AN10 probiotic strain helps to reduce neuroinflammation and symptoms of ulcerative colitis in animals with intestinal inflammation. However, in healthy animals, its application promotes neuroinflammation possibly associated with changes in the composition of the microbiota. The data points to a review of the indication of probiotics prophylactically.

keywords: Inflammatory bowel disease, *Enterococcus faecium*, DSS, gut-brain axis, neuroinflammation, probiotics

LISTA DE ABREVIATURAS

ATG16L1 - Autophagyrelated 16 like 1
BHE - Barreira hematoencefálica
CAMs - Moléculas de adesão celular
CD14 - Cluster de diferenciação 14
CeMBE - Centro de Modelos Biológicos Experimentais
CF - Calprotectina fecal
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPE - Centro de Pesquisa Experimental
CX3CR1- Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
DA - Doença de Alzheimer
DC - Doença de Crohn
DII - Doença inflamatória intestinal
DP - Doença de Parkinson
DSS - Dextran Sulfato de Sódio
ECCO - Organização Europeia de Crohn e Colite
GETAID - Groupe d'ÉtudeThérapeutique des Affections Inflammatoires du Tube Digestif
GFAP - Proteína Ácida Fibrilar Glial
HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE - Hematoxilina e Eosina
HPA- Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IAD - Índice de atividade da doença
Iba1 - Molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1
ICBS - Instituto de Ciências Básicas da Saúde
IFN- γ - Interferon-gama
IHQ - Imunohistoquímica
IL-17A - Interleucina 17A
IL-18 - Interleucina 18
IL-1 β - Interleucina 1 beta
IL-23 - Interleucina 23
IL-6 - Interleucina 6
ILC3 - do inglês "Type 3 innatelymphoidcells" - células linfóides inatas tipo 3

iNOS - Óxido nítrico-sintase induzida
IOIBD - do inglês “Organization for the Study of Inflammatory Bowel Diseases”
I κ B- γ (NEMO) - I-kappa-B kinase gama
LPS - Lipopolissacarídeo
MEIs - Manifestações extraintestinais
MRS - do inglês “Man, Rogosaand Sharpe”
Muc2 - Mucina 2
NO - Óxido nítrico
NOD2 - Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2
NOS - Óxido nítrico-sintase
PBS - Phosphatebuffered saline ou tampão fosfato-salino
PCR - Proteína C reativa
PHQ-9 - Questionário de Saúde do Paciente
RCU - Retocolite ulcerativa
RELM β - Molécula semelhante àresistina-beta
S100 - proteína S-100 Beta
SCFA - do inglês “short-chainfattyacids” - ácidos graxos de cadeia curta
SNC - Sistema nervoso central
SNE - Sistema nervoso entérico
SNP - Sistema Nervoso Periférico
STRIDE-II - do inglês “Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease”
T CD4+ - Cluster de diferenciação 4 de células T
TAG - Transtorno de Ansiedade Geral
TG - Trato gastrointestinal
TNBS - Ácido 2,4,6- trinitrobenzenosulfônico
TNF α - Fator de Necrose Tumoral Alfa
T-reg - Células T reguladoras
UEA - Unidade de Experimentação Animal
UFC - Unidade Formadora de Colônia
UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UPL - Unidade de Pesquisa Laboratorial
WGO - World Gastroenterology Organisation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa global dos estágios epidemiológicos da evolução da DII em 2020

Figura 2: Órgãos e regiões afetadas pela DC e RCU

Figura 3: Seleção de alvos de tratamento na doença de Crohn e colite ulcerativa de acordo com as recomendações do STRIDE-II

Figura 4: A mucosa intestinal no intestino normal e na DII

Figura 5: Mecanismos potenciais que ligam doença inflamatória intestinal, depressão e ansiedade

Figura 6: Vias de comunicação no eixo-cérebro-intestino

Figura 7: Reação do sistema imunológico frente à administração de DSS

Figura 8. Esquema de tratamento com probiótico e indução de colite com DSS 2%

Figura 9: Recipiente de plástico onde eram armazenadas as fezes dos animais

Figura 10: (a) Imagem da realização do teste do open field. (b) aparato para realização do teste (ANYMAZE)

Figura 11: (a) Imagem da realização do teste plus maze. (b) Aparato para o teste do plus maze.

Figura 12. Índice de atividade da doença (IAD) no último dia de protocolo de indução de colite (dia 12)

Figura 13: Conteúdo de água nas fezes no dia 13

Figura 14: Comprimento do intestino grosso no dia 13 do protocolo e imagem representativa exibindo o comprimento do cólon entre os grupos

Figura 15: Fotomicrografia de cortes histológicos do cólon de animais dos diferentes grupos experimentais

Figura 16: Escore histológico

Figura 17: (a) Velocidade em metros/segundos. (b) Distância total percorrida em metros. (c) Tempo na zona periférica.

Figura 18: Número de bolos fecais no teste do Open field

Figura 19: Proporção de tempo nos braços abertos

Figura 20: Quantificação de citocinas pró inflamatórias no hipocampo em picograma/miligramas de proteína (pg/mg)

Figura 21: Quantificação de citocinas pró inflamatórias no córtex em picograma/miligramas de proteína (pg/mg)

Figura 22: Quantificação de TNF- α no hipotálamo em picograma/miligramas de proteína (pg/mg)

Figura 23: Quantificação de IL-1 β no hipotálamo em picograma/miligramas de proteína (pg/mg)

Figura 24: Quantificação de IL-6 no hipotálamo em picograma/miligramas de proteína (pg/mg)

Figura 25: Quantificação de IL-17a no hipotálamo em picograma/miligramas de proteína (pg/mg)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação do Índice de Atividade da Doença

1 INTRODUÇÃO

A doença inflamatória intestinal (DII) é uma doença inflamatória crônica do trato gastrointestinal que compreende a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU), que são diferenciadas pela sua localização e profundidade de envolvimento na parede intestinal. Além do trato gastrointestinal, tanto a DC quanto a RCU apresentam muitas manifestações extraintestinais (MEIs) (1).

As MEIs podem ocorrer paralelas à inflamação intestinal ou ser completamente independentes da atividade da doença. Os sintomas extraintestinais podem envolver praticamente qualquer parte do corpo, com potencial de impactar negativamente a qualidade de vida do paciente (2).

Acredita-se que devido ao aumento da permeabilidade da barreira intestinal, e consequente infiltração de metabólitos microbianos, toxinas e patógenos na corrente sanguínea e nos tecidos extraintestinais favoreça o desencadeamento da inflamação sistêmica. Pacientes com DII podem apresentar diversas manifestações extraintestinais, que incluem neuroinflamação, manifestações neurológicas e psiquiátricas (3).

Com isso, alterar a microbiota através do uso de probióticos pode desempenhar um papel importante contra a inflamação intestinal, modulando a composição da microbiota do intestino. A literatura mostra que o efeito benéfico do uso de probióticos no intestino pode repercutir no cerebelo, no qual foi observada uma regulação negativa dos marcadores relacionados à neuroinflamação em camundongos (4).

Neste trabalho, avaliamos os efeitos da administração da cepa probiótica de *Enterococcus faecium* M7AN10 em modelo experimental de colite induzida por DSS (Dextran Sulfato de Sódio) a 2% sobre a neuroinflamação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

As doenças Inflamatórias intestinais (DII) correspondem a distúrbios inflamatórios do trato gastrointestinal (TG), que incluem a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU) (5). Acredita-se que existam mais de 6,8 milhões de pessoas com DII no mundo. Durante muito tempo as maiores incidências das DII foram atribuídas aos países desenvolvidos, porém a epidemiologia mundial está mudando, atualmente estudos mostram o aumento da incidência e prevalência em países emergentes (6).

Conforme estudo realizado por Kaplan e colaboradores em 2021, a evolução das DII pode ser estratificada em quatro estágios epidemiológicos: Emergência, Aceleração da Incidência, Prevalência Composta e Equilíbrio de Prevalência (Figura 1). Os países em desenvolvimento (regiões em verde) estão atualmente na primeira fase e podem progredir para a segunda fase à medida que suas economias avancem. As regiões em amarelo correspondem aos países recentemente industrializados, região na qual o Brasil se encontra, que correspondem à segunda fase e espera-se que os países dessa região progridam para a terceira fase dentro dos próximos 30 anos. As regiões em laranja correspondem aos países com prevalência agravada que encontram-se na terceira fase e é previsto que alcancem o equilíbrio de prevalência dentro dos próximos 30 anos (7).

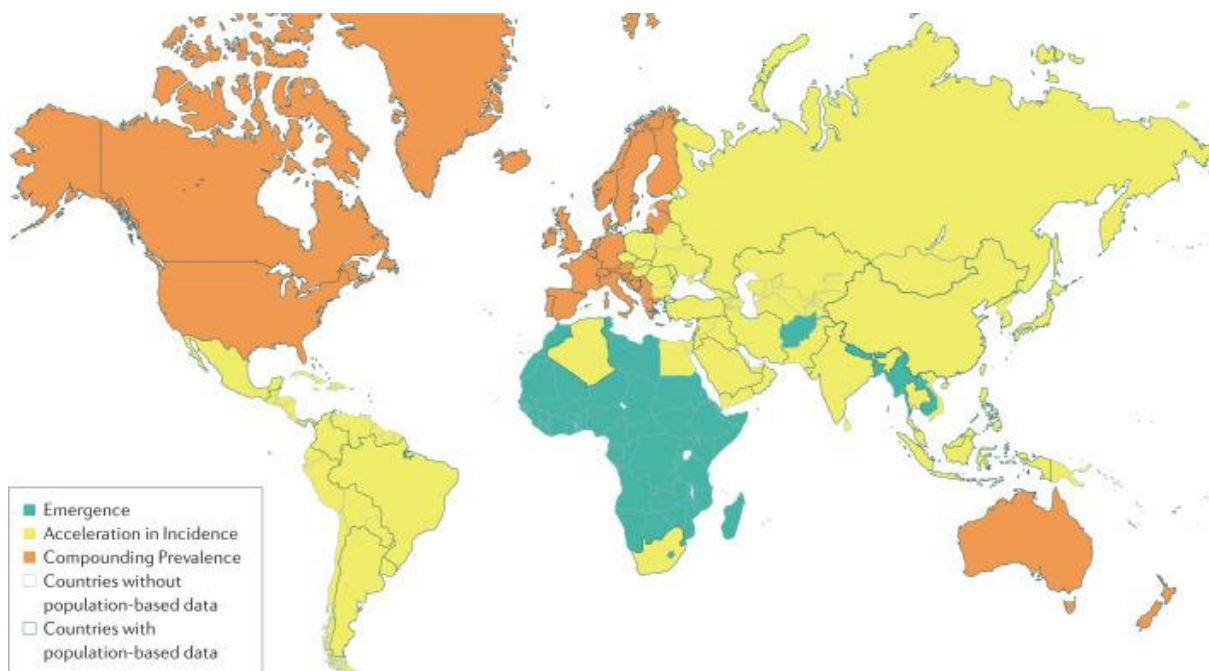


Figura 1 - Mapa global dos estágios epidemiológicos da evolução da DII em 2020. Fonte: Kaplan GG, Windsor JW, 2021.

Como visto, as DIIs estão em expansão na América do Sul se tornando um problema de saúde em evidência (5,8). No Brasil, há uma escassez de dados epidemiológicos sobre a doença de Crohn e a RCU (9), Quaresma e colaboradores 2019, em seu estudo encontraram um aumento nas taxas de incidência e prevalência das DII no Brasil, porém foram encontradas diferenças entre as regiões do país, o que parece refletir-se no número de casos em determinados estados, sendo a incidência e prevalência da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa mais elevadas nas partes mais desenvolvidas do país (9).

Em 2022, um estudo traçou o perfil epidemiológico dos pacientes com DII residentes no estado do Paraná, região sul do Brasil. Houve um marcante aumento na incidência de DII no Paraná entre os anos de 2010 e 2019, com uma taxa estimada por regressão linear em torno de 1,1 por 100.000 pessoas por ano, sendo três vezes maior para RCU do que para DC (10).

No estudo de coorte prospectivo envolvendo pacientes atendidos em centros de referência para DII em três estados do Nordeste do Brasil, de janeiro de 2020 a

dezembro de 2021, também verificou-se um aumento contínuo a cada período de 5 anos no número de casos diagnosticados de DII ao longo das últimas quatro décadas. Os maiores incrementos foram notados entre os anos de 2011 e 2015, representando 25% do total, e entre 2016 e 2020, onde foram diagnosticados 34% dos casos. Constatando um crescimento médio anual de 0,81 ao longo do tempo, com significância estatística ($p < 0,0001$), evidenciando a progressão da doença inflamatória intestinal nesta região. Dos 571 pacientes incluídos no estudo com DII, 355 (62%) tinham RCU e 216 (38%) tinham DC (11).

2.2 RETOCOLITE ULCERATIVA E DOENÇA DE CROHN

A DC e a RCU, são caracterizadas por inflamação inespecífica da mucosa intestinal, podendo se manifestar de forma crônica e progressiva. A etiologia das DII ainda não é completamente compreendida e acredita-se que fatores genéticos, ambientais e distúrbios do sistema imunológico do hospedeiro possam contribuir para o seu desenvolvimento (12).

A DC e a RCU apresentam padrões inflamatórios distintos. Enquanto a DC caracteriza-se por apresentar inflamação transmural descontínua, podendo afetar todo trato gastrointestinal, mas principalmente as regiões de íleo terminal e ceco, na RCU a inflamação é contínua e atinge principalmente a região de cólon e reto, tendo a gravidade da doença correlacionada com a extensão da inflamação (Figura 2) (12–14).

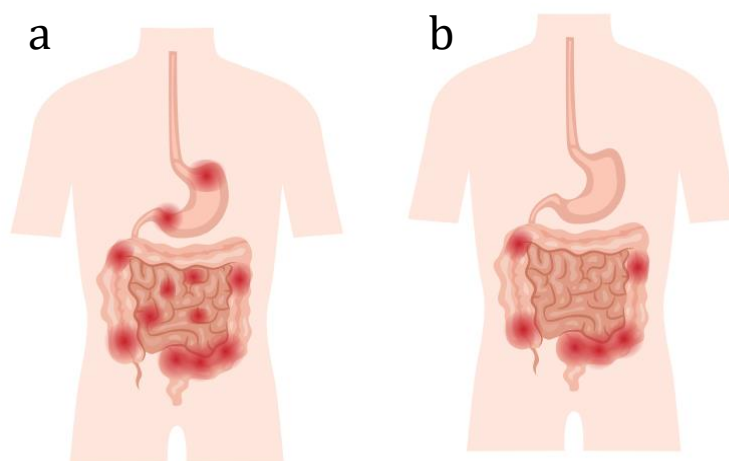


Figura 2 - Órgãos e regiões afetadas pela DC (a) e RCU (b). A doença de Chron pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal da boca ao ânus. Já a RCU se restringe ao cólon. As figuras foram criadas pela autora com Canva.com (acessado em 6 de março de 2024). Obtido em <https://canva.com> (acessado em 6 de março de 2024).

Pacientes com DII podem apresentar diversos sintomas os quais podem variar conforme a doença se RCU ou DC, no entanto, os sintomas prevalentes incluem dor abdominal persistente, diarreia (com ou sem sangue), perda de peso, fadiga, além de sinais de acometimento retal como tenesmo e urgência evacuatória (12,15).Essas condições podem causar impactos significativos na qualidade de vida do paciente, afetando sua saúde mental ao potencialmente desencadear ansiedade e depressão. Além disso, podem impactar negativamente a produtividade e o trabalho (16,17).

O diagnóstico das DIIs geralmente é realizado com base nas características encontradas durante a investigação diagnóstica, utilizando-se da avaliação endoscópica com biópsia e exames como a dosagem de proteína C reativa (PCR) que é um marcador sanguíneo sensível para inflamação e demais exames laboratoriais, além do estudo das fezes, aplicando exames como a calprotectina fecal (CF) um marcador direto da inflamação da mucosa intestinal (12,14,18).

A RCU e a DC ainda não apresentam uma terapia curativa eficaz, o que acaba promovendo complicações ao longo do tempo. As estratégias atuais de tratamento se concentram na remissão dos sintomas, visando resolver a inflamação e evitar a progressão da doença (19,20). Vale ressaltar, ainda, que a cirurgia teoricamente pode curar a RCU ao retirar o cólon e o reto, porém muitos pacientes apresentam problemas subsequentes a sua realização (20). Diante disso, foram definidas metas de tratamento específicas baseadas no tempo, de acordo com as recomendações atualizadas do Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE-II) da International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Diseases (IOIBD) (21). Neste documento a IOIBD em 2021, realizou a atualização das primeiras recomendações do STRIDE e desenvolveu 13 recomendações atualizadas para incorporar alvos de tratamento na DII adulta e pediátrica (STRIDE-II) (22) (Figura 3).

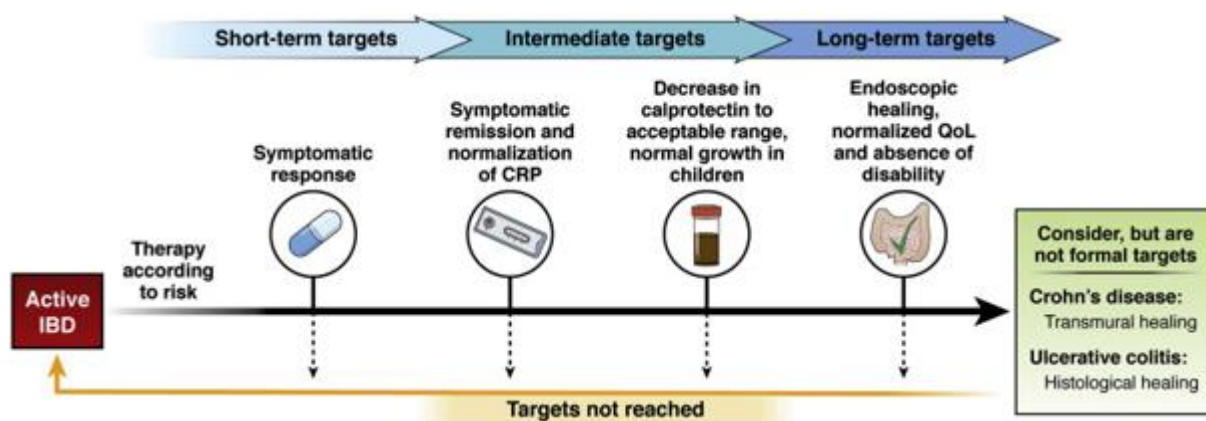


Figura 3 - Seleção de alvos de tratamento na doença de Crohn e colite ulcerativa de acordo com as recomendações do STRIDE-II. Pacientes com DII ativa tem como alvo de curto prazo a resposta sintomática, alvos intermediários: a remissão sintomática e a normalização da proteína C reativa, bem como a diminuição nos níveis de calprotectina. Os alvos de longo prazo compreendem a cicatrização endoscópica e normalização na qualidade de vida. A incapacidade de atingir as metas estabelecidas configura doença ativa. Fonte: Nikolas Plevris, Charlie W. Lees, 2022.

Atualmente, as abordagens terapêuticas para a RCU incluem o uso de medicamentos como ácidos aminossalicílicos, glicocorticoides e agentes imunossupressores. Contudo, o desenvolvimento de terapias com anticorpos monoclonais têm avançado e aprimorado consideravelmente o tratamento dessa condição. Além disso, a manipulação do microbioma intestinal por meio de probióticos demonstra potencial para reduzir a inflamação. Nesse sentido, uma abordagem que também parece ser promissora é o transplante de microbiota fecal para alívio dos sintomas associados à RCU (23).

2.3 INFLAMAÇÃO SISTÊMICA NA DII

Diferentes mecanismos envolvidos tornam as DII uma doença sistêmica. Pacientes com DII podem desenvolver disbiose, ou seja, um desequilíbrio na composição e na função da microbiota do trato intestinal. Tal alteração pode causar impacto em vias metabólicas e outros processos biológicos executados por ela. Uma microbiota intestinal saudável apresenta capacidade funcional equilibrada para processar nutrientes, regular o sistema imunológico e manter a estabilidade energética. Portanto, a disbiose pode ser descrita como uma alteração nessas

capacidades funcionais, o que pode acarretar consequências adversas para a saúde (24).

A barreira intestinal consiste em um conjunto de células epiteliais intestinais que incluem enterócitos, células caliciformes, células neuroendócrinas, células de Paneth e células M, além de células imunológicas (12). Na mucosa afetada pela DII, os mecanismos responsáveis pela manutenção da barreira intestinal estão comprometidos, incluindo a regulação negativa da E-caderina nas junções estreitas, a espessura da camada de muco, a função anormal das células caliciformes (incluindo as proteínas Muc2 e RELM β) e os mecanismos disfuncionais associados às células Paneth, como a secreção de produtos antimicrobianos e funções relacionadas aos genes NOD2 e ATG16L1. Além disso, no contexto da DII ocorre uma diminuição de macrófagos CD14 positivos, alterações no receptor CX3CR1 pelas células dendríticas e desequilíbrio entre células T efetoras e regulatórias (T-reg), resultando na ativação descontrolada de diversas células imunes que migram para o intestino inflamado (25) (Figura 4).

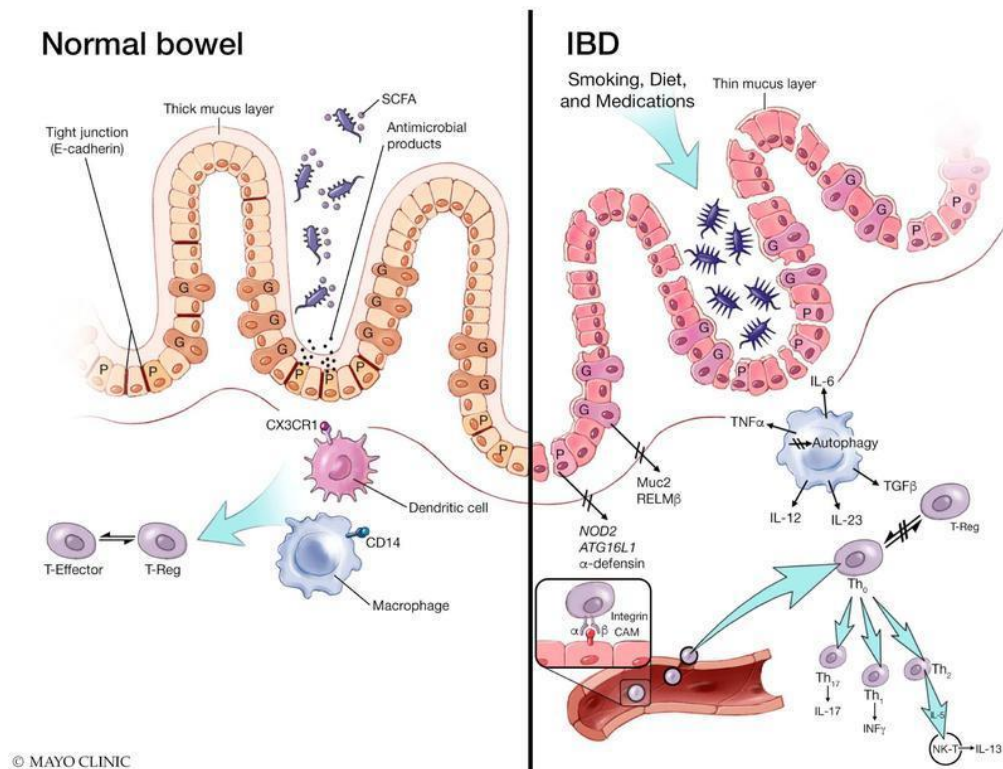


Figura 4 - A mucosa intestinal no intestino normal e na DII. Pacientes com DII após a exposição a fatores ambientais desenvolvem uma disbiose microbiana caracterizada pela diminuição de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) e aumento de Proteobactérias. Fonte: Ramos GP, Papadakis KA. 2019.

Uma característica das DII é o comprometimento causado na barreira da mucosa do intestino (25). Esse dano à barreira favorece a translocação da microbiota alterada pela disbiose e outros antígenos para a circulação, o que resulta em uma ativação imunológica descontrolada e um estado inflamatório sistêmico (26).

2.4 MANIFESTAÇÕES EXTRAINTestinais DA DII E NEUROINFLAMAÇÃO

Os danos causados pelas DIIs não se restringem apenas ao trato gastrointestinal. Pacientes com DII podem apresentar sintomas além do intestino, podendo afetar praticamente qualquer órgão do corpo, o que implica diretamente na qualidade de vida. A epidemiologia das manifestações extraintestinais (MEIs) apresenta grande variabilidade dependendo da população estudada e da definição

utilizada para MEI (27). De acordo com a definição sugerida pelo grupo de trabalho sobre MEI da Organização Europeia de Crohn e Colite (ECCO) as manifestações extraintestinais podem ser determinadas como uma condição inflamatória- em um paciente com DII- que ocorra fora do intestino e que tenha origem relacionada à extensão/translocação das respostas imunológicas intestinais, ou que seja uma inflamação independente desencadeada pela DII, ou ainda, que compartilhe uma predisposição ambiental ou genética comum com a DII (28).

No estudo realizado na França, liderado por Guillo et al, dentro da coorte GETAID um relatório sobre a prevalência e os fatores de risco para MEIs foi apresentado. Esta análise transversal incluiu 1.971 pacientes de 30 centros de referência para DII que preencheram o questionário EXTRA-intestinal, desses 43,3% tinham RCU e 56,5% tinham DC. Com relação a prevalência de MEIs, de 544 pacientes incluídos nessa análise, 27,6% apresentaram pelo menos 1 MEI e em 20,2% dos casos os pacientes tiveram múltiplas MEIs. De maneira geral, as MEIs foram observadas em 24,2% dos pacientes com RCU e 30,3% dos pacientes com DC (29).

Já no estudo retrospectivo realizado no Hospital Pablo Tobón Uribe em Medellín na Colômbia com 759 pacientes adultos com DII, 544 foram diagnosticados com RCU (71,6%), 200 com DC (26,3%) e 15 com DII não classificável (1,9%). Dentre todos os pacientes, 177 (23,3%) apresentaram MEIs, dos quais 123 (22,6%) tinham RCU e 53 de 200 (26,5%) tinham DC (30).

As MEIs podem surgir em qualquer fase da DII e até mesmo iniciar antes dos primeiros sintomas intestinais aparecerem, por isso precisam ser reconhecidas para que se possa iniciar procedimentos diagnósticos apropriados. As principais MEIs podem afetar cérebro, articulações, músculos, olhos, pele, trato hepatobiliar entre outros. Algumas manifestações estão associadas a inflamação ativa do intestino e outras independem dos períodos de crise da doença (31).

A literatura mostra que o sistema nervoso central (SNC) e o periférico (SNP) também são afetados pelas manifestações extraintestinais (32). Pacientes com DII têm maiores chances de desenvolver transtorno de ansiedade e depressão. No estudo descritivo transversal realizado com pacientes adultos com DII atendidos no

Hospital Especializado King Fahad, em Qassim, Arábia Saudita, utilizando o questionário de Transtorno de Ansiedade Geral (TAG) para medir a ansiedade e o questionário de Saúde do Paciente (PHQ-9) para medir a depressão, verificou-se que dos 179 pacientes com DII, a prevalência de pacientes com sintomas de ansiedade foi de 17,3%, enquanto a de sintomas depressivos foi de 19,6%. O sexo feminino foi considerado fator de risco independente para ansiedade, enquanto a MEI foi identificada como fator de risco independente para depressão (33).

De acordo com a revisão sistemática com metanálise publicada pela revista Lancet em 2021, na qual foram incluídos 77 artigos que preencheram os critérios de elegibilidade, com 30.118 pacientes no total, foi demonstrado que existe uma maior prevalência de sintomas de ansiedade e depressão em pacientes com DII, com até um terço dos pacientes estudados afetados por sintomas de ansiedade e um quarto com sintomas de depressão. Também foi observado um aumento na prevalência em pacientes com DII ativa: cerca de metade desses pacientes atendia aos critérios para sintomas de ansiedade e um terço para sintomas de depressão (34).

Na investigação sobre a relação causal entre DII e ansiedade realizada por He e colaboradores observou-se que a suscetibilidade genética à RCU está associada a um risco aumentado de ansiedade, enquanto a suscetibilidade genética à DC não está associada a um risco aumentado de ansiedade. Nenhum efeito causal da ansiedade na RCU e na DC foi observado neste estudo (35).

A neuroinflamação é apontada como um possível gatilho para o desenvolvimento de transtornos de ansiedade e depressão nos pacientes com DII. Acredita-se que o aumento da inflamação no intestino e o mau funcionamento do sistema nervoso entérico (SNE) contribuam para a disfunção da barreira intestinal promovendo a permeabilidade intestinal, o que facilita a passagem de toxinas para a corrente sanguínea. Essas toxinas podem prejudicar o funcionamento imunológico e fisiológico de tecidos distantes do intestino, como o cérebro, provocando neuroinflamação (36). Outros possíveis mecanismos pressupostos para a simultaneidade de ocorrência da DII e de transtorno de ansiedade e depressão, inserem alterações na sinalização e morfologia cerebral, aumento de citocinas pró-inflamatórias periféricas e intracerebrais, comprometimento da via do óxido nítrico,

alterações na sinalização do nervo vago, além de disbiose intestinal e predisposição genética (Figura 5) (37).

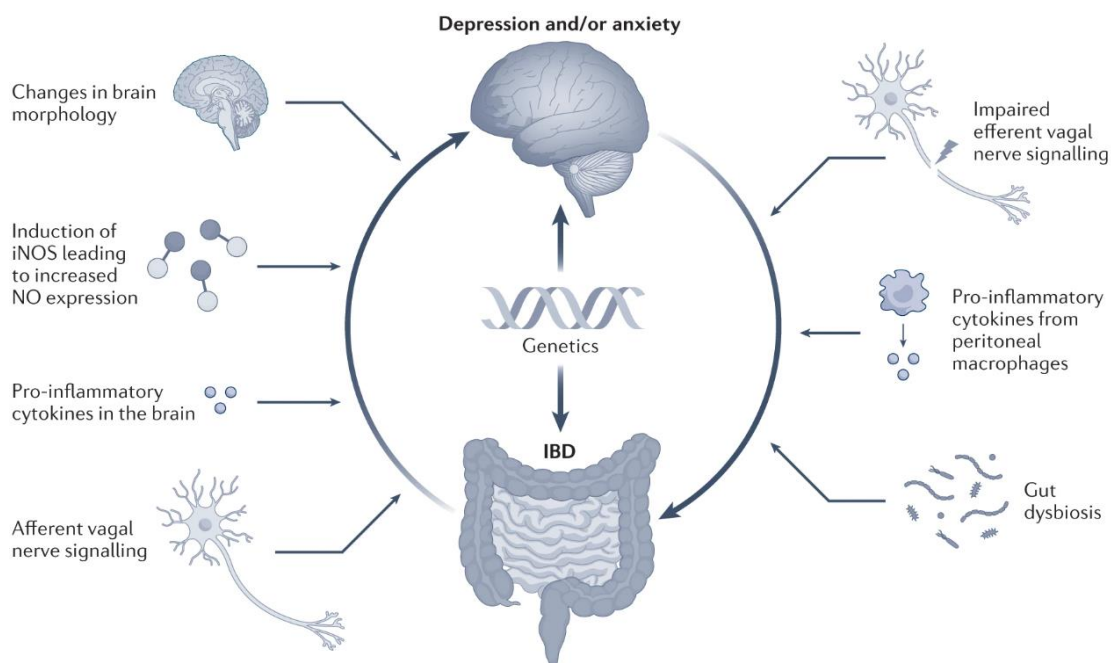


Figura 5 - Potenciais mecanismos que associam doença inflamatória intestinal, depressão e ansiedade. A literatura aponta alterações cerebrais em humanos e em animais relacionados com inflamação intestinal, possivelmente pela sinalização do nervo vago a partir do intestino inflamado. No cérebro, a ativação da óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) que é uma NOS induzida por citocinas e lipopolissacarídeos, no endotélio e musculatura lisa vascular, seguida por aumento nos níveis de óxido nítrico (NO), o aumento de citocinas pró-inflamatórias e modificações na estrutura cerebral são alguns fatores associados a possíveis transtornos psiquiátricos em pacientes com DII. Fonte: Bisgaard, TH, Allin, KH, Keefer, L. *et al.*, 2022.

Além do transtorno de ansiedade e depressão, a literatura atual apresenta outras patologias psiquiátricas associadas à neuroinflamação. No estudo prospectivo sueco que investigou a associação de RCU com demência por todas as causas, através de dados de registros médicos com 4.821.488 participantes 52,6% mulheres a taxa de incidência de demência por todas as causas foi de 63,90 (intervalo de confiança de 95%: 63,73-64,07) eventos por 10.000 pessoas-ano em indivíduos sem RCU e 94,80 (intervalo de confiança de 95%: 92,04–97,64) entre aqueles com RCU. Esses resultados sugerem um risco ligeiramente aumentado de demência entre pacientes com RCU (38).

Já na investigação realizada sobre a associação de inflamação do SNC com doença de Alzheimer (DA) em pacientes com DII, foi observado que há ligação entre a inflamação intestinal crônica e a neuroinflamação e com isso pacientes com DII apresentam um risco maior de desenvolver DA do que os pacientes sem DII. Estudos pré-clínicos também mostraram que a DII agravou o quadro da DA (39).

A relação entre DII e o risco de doença de Parkinson (DP) também vem sendo estudada. Evidências sugerem que existem mecanismos patológicos semelhantes e fatores de risco patogênicos relacionados para DII e DP (40). Na revisão realizada por Lie colaboradores envolvendo 14 estudos (nove estudos de coorte, dois estudos transversais, dois estudos de randomização mendeliana e um estudo de caso-controle) englobando mais de 13,4 milhões de indivíduos, foram encontrados resultados que sugerem que o risco de DP em pacientes com DII está moderadamente aumentado (41).

2.5 EIXO INTESTINO-CÉREBRO

A relação entre o (SNC) e o trato gastrointestinal (TG) recebe o nome de eixo-intestino-cérebro e envolve sinais metabólicos, neurais, imunológicos, hormonais e microbianos. A sinalização da inflamação ocorre através do eixo tanto na direção aferente (intestino-cérebro) quanto na eferente (cérebro-intestino). A literatura sugere que uma disfunção no eixo intestino-cérebro de pacientes com doenças gastrointestinais tem ligação importante no surgimento de doenças neurológicas envolvendo neuroinflamação e neurodegeneração (42).

Um estudo realizado em modelo animal de colite induzida por DSS a 5% identificou a presença de marcadores inflamatórios IL-6 e TNF α na região do córtex de camundongos, sugerindo que a colite induzida por DSS aumenta a inflamação sistêmica que resulta em inflamação cortical (43). Já no estudo realizado por Zonis e colaboradores, se observou que a inflamação intestinal crônica, altera a neurogênese hipocampal e durante a inflamação aguda se verificou um aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α e aumento da expressão de Iba1, um marcador da microglia no hipocampo dos camundongos com colite induzida por DSS a 3% (44).

2.5.1 Rotas para sinalizar a inflamação através do eixo intestino-cérebro

A transmissão de sinais inflamatórios no eixo intestino-cérebro se dá através de três vias de comunicação que são paralelas e interconectadas, são elas a via sistêmico-humoral, via imune-celular e via neuronal (Figura 6).

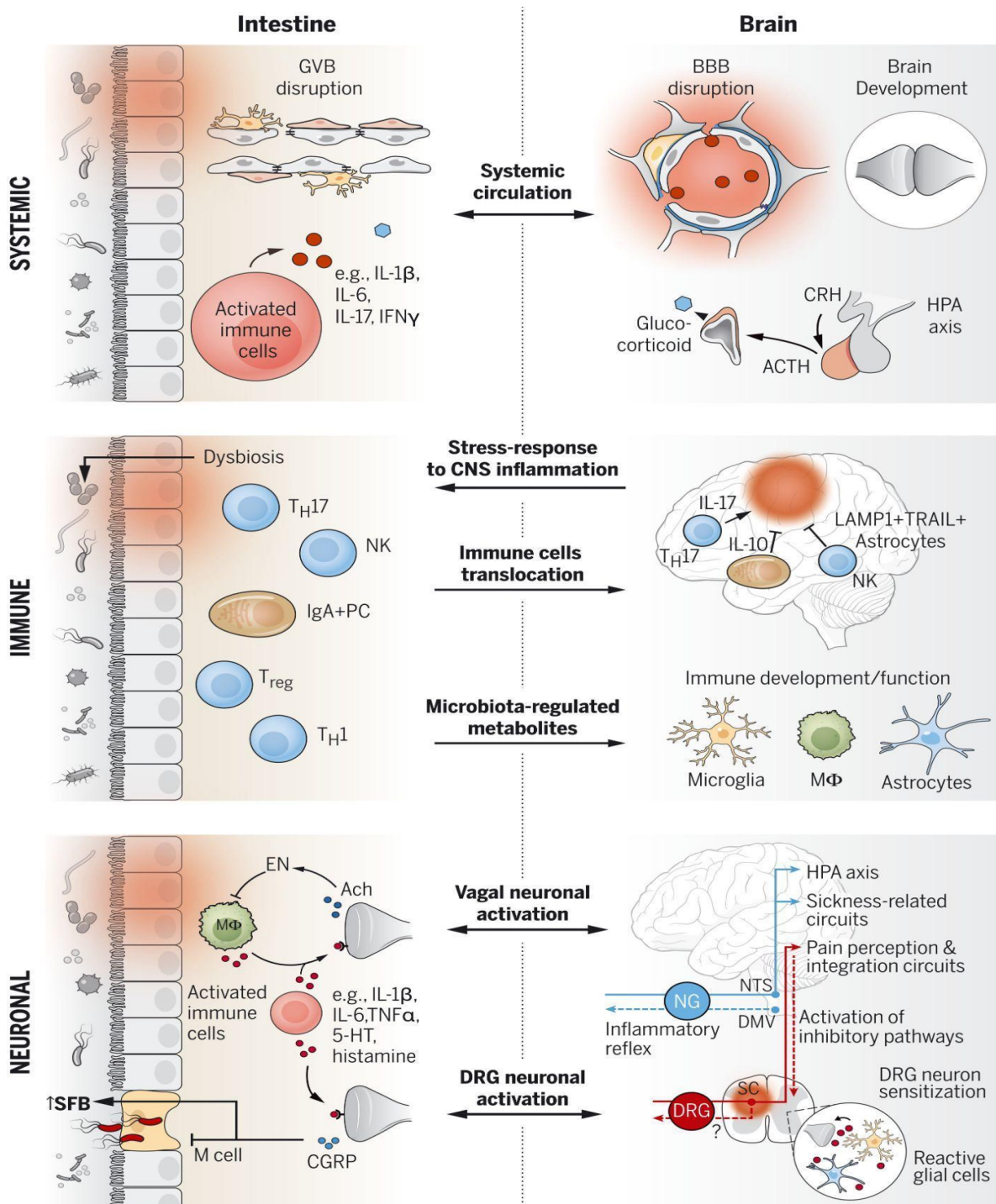


Figura 6 - Vias de comunicação no eixo-cérebro-intestino. As rotas para sinalizar a inflamação através do eixo intestino-cérebro ocorrem em três vias principais: Via humoral, onde ocorre a liberação sistêmica de fatores inflamatórios derivados do intestino que podem alterar a integridade da barreira hematoencefálica levando a danos cerebrais. Via imune celular onde as células imunes do intestino quando ativadas podem se translocar para o SNC para promover ou inibir a neuroinflamação. Via

neuronal onde ocorre a estimulação de neurônios vagais aferentes sensíveis à inflamação e gânglios da raiz dorsal desencadeiam circuitos neurais do SNC envolvidos na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Fonte: AGIRMAN, YU, HSIAO; 2021.

Na via sistêmico-humoral a barreira intestinal é um importante mecanismo de defesa do sistema imune. Alterações na produção de muco e nas estruturas das proteínas intercelulares e intracelulares da barreira intestinal possibilitam a sua “quebra”, resultando no aumento da permeabilidade intestinal. Essa disfunção na integridade da barreira do epitélio intestinal facilita a translocação da microbiota luminal e de toxinas e antígenos para a lâmina própria intestinal. Dessa forma uma resposta imune é provocada com a liberação de citocinas pró inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN- γ que podem entrar na circulação periférica e desencadear uma ativação imunológica a distância, resultando em neuroinflamação e danos à barreira hematoencefálica (BHE) em pacientes com DII (36).

O conjunto de interações conhecido como eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é o principal braço humoral eferente do eixo intestino-cérebro, coordenando a liberação de glicocorticóides da glândula adrenal, hormônio induzido pelo estresse capaz tanto de restaurar a homeostase quanto favorecer a disfunção do TGI, modulando a atividade das células imunes entéricas, a função intestinal e a composição microbiana (45).

Já na via imune, as células imunes entéricas ativadas podem se translocar para o SNC para promover ou inibir a neuroinflamação. A neuroinflamação pode ser agravada devido a resposta aos insultos sofridos pelo SNC que podem alterar a microbiota intestinal e estimular as células imunes inflamatórias, que então migram para o SNC onde pioram os resultados inflamatórios. Metabólitos da microbiota intestinal guiam o desenvolvimento e as respostas neuroinflamatórias das células imunes do cérebro (45).

Por fim, na via neuronal, os campos sensoriais dos neurônios vagais aferentes do intestino possuem receptores que detectam moduladores inflamatórios no microambiente intestinal. As fibras aferentes vagais, cujos corpos celulares residem nos gânglios nodosos, projetam-se no núcleo do trato solitário no tronco encefálico, que então retransmite sinais para regiões cerebrais de ordem superior. A estimulação mediada pela inflamação das fibras aferentes vagais desencadeia o

eixo HPA e ativa os circuitos neurais envolvidos no comportamento de doença. Patógenos intestinais selecionados são capazes de sequestrar a sinalização inflamatória de IL-1 β para o nervo vago assim, a inibição da rota neurosensorial diminui a virulência patogênica para facilitar a disseminação e transmissão. A regulação central da inflamação intestinal ocorre através do caminho vagal descendente do núcleo motor dorsal do vago. As fibras eferentes vagais colinérgicas estimulam os neurônios entéricos que inibem a liberação das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-18 e TNF- α por macrófagos (45).

2.6 MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL PELO USO DE PROBIÓTICOS

A microbiota intestinal corresponde a uma comunidade microbiana coletiva que reside no trato gastrointestinal de animais e seres humanos e que está em constante mudança. É composta principalmente por bactérias, além de fungos, archaea, parasitas e em menor quantidade, por vírus. Estima-se que a microbiota intestinal de seres humanos contenha mais de 100 trilhões de células microbianas (cerca de 4×10^{13}) que vivem uma relação de mutualismo com o hospedeiro, desempenhando um papel fundamental no seu metabolismo (46).

A literatura tem destacado o envolvimento da microbiota intestinal tanto na manutenção da saúde humana quanto no desenvolvimento de doenças. Pensando nisso, muitos pesquisadores exploram novas abordagens para modular a microbiota como uma alternativa promissora de tratamento para muitas doenças relacionadas à disbiose intestinal. Alternativas como dieta, o uso de prebióticos, probióticos, simbióticos e transplante de microbiota fecal se mostram estratégias terapêuticas interessantes para modular a microbiota e restabelecer o seu equilíbrio (47,48) .

Conforme a diretriz da World Gastroenterology Organisation (WGO) probiótico é definido como sendo microrganismos vivos que, quando administrados corretamente e em doses adequadas, conferem benefícios para a saúde do indivíduo. Algumas cepas podem apresentar atividades neurológicas, imunológicas e antimicrobianas, promovendo resistência à colonização, regulação do trânsito intestinal ou a normalização da microbiota alterada (49).

A dose necessária de probióticos que deve ser ingerida para gerar benefícios ao consumidor varia em função da cepa e do produto. Alguns produtos se mostram eficazes em doses mais baixas, enquanto outros requerem quantidades maiores (49). Algumas linhagens utilizadas como probiótico são *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus reuteri* que podem trabalhar em conjunto para promover o equilíbrio do microbioma, regular a resposta imunológica e reparar a integridade da barreira intestinal (50).

Quando relacionamos o uso de probióticos com a DII, o estudo de Jang e colaboradores, 2019 verificou que tanto *Lactobacillus fermentum* KBL374 e KBL375 apresentaram efeitos benéficos em aliviar a inflamação no intestino e alterar a composição da microbiota intestinal, regulando as respostas imunes em camundongos com colite induzida por DSS a 2% (51). Assim como o estudo publicado em 2021 com *Enterococcus faecium* em modelo animal de colite induzida por DSS a 3%, que constatou que a administração de *E. faecium* pode prevenir a inflamação e o desequilíbrio da microbiota intestinal, além de reparar o dano à barreira da mucosa do intestino. Esses resultados demonstram um efeito promissor de se utilizar de forma preventiva *E. faecium* frente a lesão intestinal induzida por DSS (52).

Quando relacionamos o uso de probióticos com a neuroinflamação, evidências recentes mostram que o tratamento com probióticos pode ser uma estratégia alternativa eficaz para induzir a imunorregulação no SNC e reduzir a neuroinflamação (53). O estudo de Takahashi e colaboradores demonstrou que o tratamento preventivo com *Enterococcus faecalis* 2001 (EF-2001), previne o comportamento depressivo em camundongos com DII aguda induzida por 1,5% de DSS (54). No estudo publicado em 2019 com os probióticos *Lactobacillus reuteri* NK33 e *Bifidobacterium teenis* NK98 em modelo animal de colite induzida pelo estresse de imobilização se averiguou que a utilização de probióticos aliviou a ocorrência e desenvolvimento de ansiedade e conferiu melhora na composição da microbiota intestinal (55).

2.7 ENTEROCOCCUS FAECIUM M7AN10

Enterococcus faecium (*E. faecium*) é uma espécie de bactérias gram-positivas, anaeróbias facultativas que pertencem ao grupo das bactérias ácido lácticas. Apresentam a forma de cocos, podendo ser isoladas ou em pares, são não esporuladas e possuem capacidade motora ou crescimento agressivo. Podem ser encontradas em diversos ambientes, incluindo o intestino humano e alimentos fermentados. Diferentes cepas de *E. faecium* demonstram alta tolerância a variações de temperatura, pH e presença de sais biliares. Essa bactéria é capaz de colonizar e aderir ao trato intestinal dos animais de forma rápida (56,57).

Para que uma cepa seja considerada um potencial probiótico, a avaliação *in vitro* da resistência a ácidos e sais biliares antes de prosseguir com ensaios *in vivo* é necessária para determinar se esse possível probiótico é capaz de resistir ao ambiente do trato gastrointestinal do hospedeiro. Os ensaios em modelos animais são fundamentais para antecipar os efeitos em seres humanos e investigar possíveis mudanças em tecidos, estruturas celulares e a expressão de marcadores biológicos em diferentes órgãos (58).

Em nosso estudo utilizamos a cepa com potencial probiótico de *Enterococcus faecium M7AN10* (*E. faecium M7AN10*) isolado de leite de búfala. No estudo preliminar, realizado pelo grupo de pesquisa colaborador, *E. faecium M7AN10* apresentou resultados negativos para hidrólise de gelatina e produção de hemolisina. A cepa também foi considerada suscetível a todos os antimicrobianos testados, sendo selecionada para ensaios que buscavam detectar genes relacionados à virulência e resistência antimicrobiana. *E. faecium M7AN10* apresentou a inocuidade necessária para ser estudado como cultura probiótica (59).

Também foi realizado um estudo posterior que avaliou o potencial probiótico e a viabilidade celular sustentada sob diferentes condições de conservação, além da adesão e viabilidade celular em um teste simulado de trânsito gastrointestinal. A cepa isolada de *E. faecium M7AN10* manteve a viabilidade celular após refrigeração, congelamento e liofilização. Os resultados da avaliação *in vitro* demonstraram que *E. faecium M7AN10* continuou ativo e funcional em condições experimentais e se

mostrou segura e com as características necessárias que tornaram possíveis sugerir seu uso como cepa probiótica (60).

Em recente estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, a cepa probiótica de *E. faecium M7AN10* foi capaz de atenuar os sintomas de RCU no modelo de colite experimental induzida por DSS 1,5%, neste trabalho os animais receberam *E. faecium M7AN10* via gavagem por 11 dias pré e pós indução da doença. A cepa probiótica se mostrou capaz de reduzir os danos na mucosa e a inflamação no cólon. O tratamento probiótico reduziu os níveis colônicos de TNF- α e aumentou os níveis de IL-17A, porém não alterou significativamente os níveis de IL-6 e IL-1 β . Diante dos resultados encontrados, pode-se concluir que a cepa probiótica de *E. faecium M7AN10* apresentou um efeito benéfico no modelo experimental de RCU induzida por DSS 1,5% (61).

2.8 MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE ULCERATIVA

Os modelos pré-clínicos de RCU são amplamente utilizados pois reproduzem características fisiopatológicas importantes da DII. A grande maioria das pesquisas sobre DII em roedores emprega modelos nos quais a inflamação intestinal é induzida quimicamente. Nesses modelos a RCU é facilmente provocada, e os animais manifestam rapidamente sintomas semelhantes aos observados na DII humana como diarreia, perda de peso, úlceras na camada mucosa, cólon encurtado e disbiose, assim como alteração comportamental (62–64).

Atualmente os produtos químicos utilizados nos modelos murinos experimentais são o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), a oxazolona e o dextran sulfato de sódio (DSS). Também é possível utilizar modelos murinos de colite espontânea desencadeada por disbiose da microbiota intestinal e genes específicos relacionados à DII. Como a colite por deficiência de I κ k- γ (NEMO), colite por deficiência de Interleucina-10 (IL-10) e a colite induzida por células imunológicas como o modelo de transferência de células T CD4⁺ (65). No modelo de colite experimental induzida por DSS ocorre morte das células epiteliais, prejudicando a função de barreira e desencadeando subsequente inflamação. Esse modelo tem sido muito utilizado para avaliar os efeitos da microbiota intestinal e das condições que causam alterações na

sua composição, como questões dietéticas, por exemplo, no desenvolvimento da colite (66).

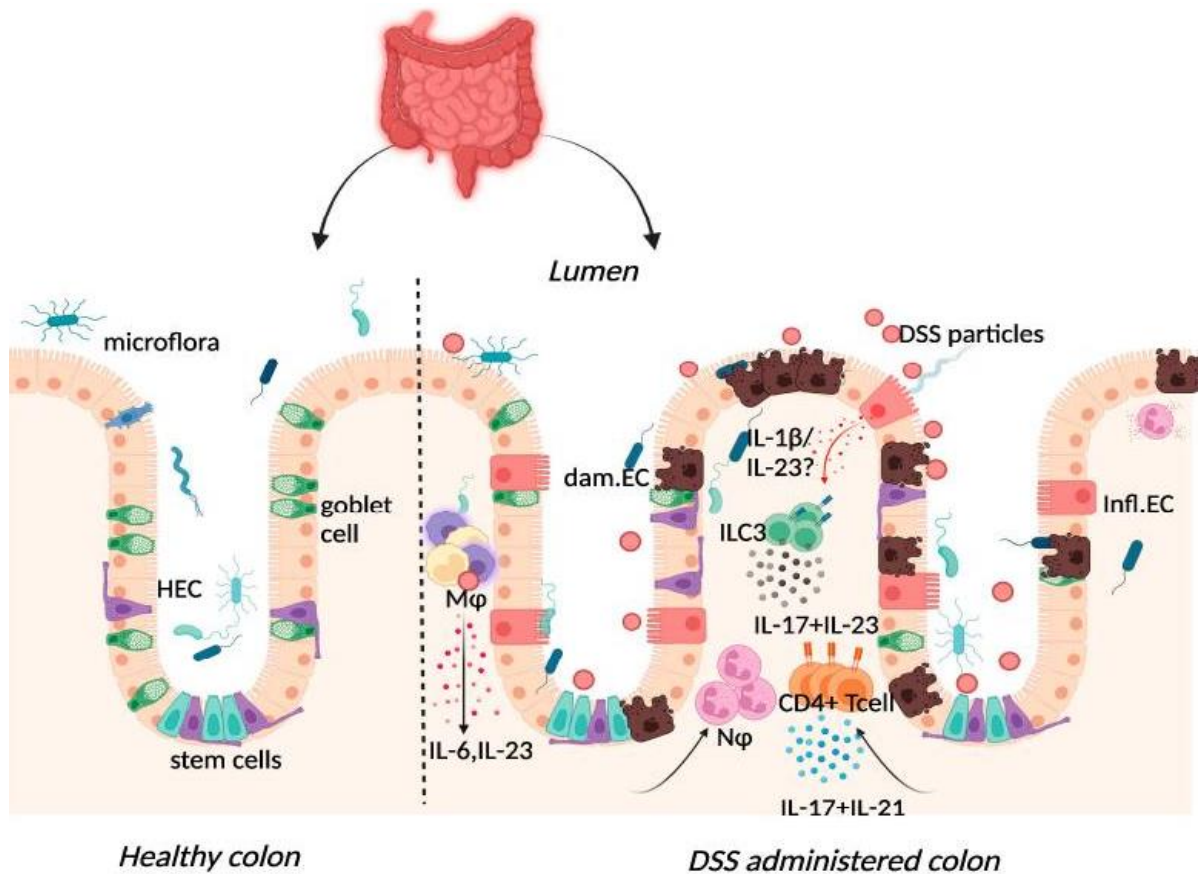


Figura 7 - Reação do sistema imunológico frente à administração de DSS: A ingestão de DSS desencadeia a liberação de IL-1 β pelas células epiteliais, ativando as ILC3 e promovendo a liberação de IL-23. Esta última induz o influxo de neutrófilos e células T CD4+, que intensificam a resposta por meio de uma sinalização aprimorada de IL-17. As respostas inflamatórias crônicas resultantes causam depleção de células caliciformes, aumento da permeabilidade intestinal e elevação da aderência da microbiota intestinal comensal ao epitélio. Retirado de: (Katsandegwaza B, Horsnell W, Smith K., 2022).

A doença é induzida pela administração de DSS na água potável oferecida aos animais. A depender da concentração de DSS utilizada no protocolo, duração e frequência da administração de DSS, os animais podem desenvolver colite aguda ou crônica (67).

Os camundongos da cepa C57BL/6 são amplamente utilizados, pois possuem predisposição intermediária a alta para desenvolver colite através da utilização de

DSS. Concentrações de DSS que variam de 2–3% (p/vol) na água potável por 7 dias induzem colite acentuada em camundongos C57BL/6, com baixas taxas de mortalidade (em comparação com 2,5–5% em camundongos Balb/c). Porém, muitos pesquisadores utilizam concentrações mais elevadas de DSS durante a indução de colite aguda, por um período mais curto de tempo (3-5% durante 5 dias). Já a colite crônica de longa duração pode ser induzida em camundongos C57BL/6 utilizando três ciclos de DSS de 2–3% com 7 dias de indução da doença com DSS e 14 dias de água (66).

3 JUSTIFICATIVA

Os processos patológicos desencadeados por DIIs não são restritos ao trato gastrointestinal e podem afetar outros órgãos incluindo o cérebro. Estudos demonstram que as DIIs estão associadas a neuroinflamação em modelos animais, e que pacientes com DII apresentam risco aumentado para doenças psiquiátricas como depressão e transtornos de ansiedade. A microbiota intestinal pode regular o estado psiquiátrico através de respostas endócrinas, neurais e imunes, o que é conhecido como eixo microbiota-cérebro-intestino. Dessa forma, o tratamento com probióticos tem apresentado sucesso na redução da resposta imunológica da mucosa intestinal inflamada. Entretanto, poucos estudos avaliam a neuroinflamação provocada pelo DSS, bem como os efeitos do tratamento com probióticos na neuroinflamação desencadeada por DII. Dessa forma, estudos da microbiota associada à conexão entre a colite ulcerativa e a neuroinflamação são necessários para desenvolver terapias destinadas a aliviar ou prevenir os danos ao tecido nervoso induzidos pela colite.

4 QUESTÃO DE PESQUISA

O DSS 2% é capaz de promover neuroinflamação e esta pode ser atenuada pelo tratamento com a cepa probiótica de *E. faecium* M7AN10?

5 HIPÓTESE

O DSS promove a alteração de citocinas inflamatórias no tecido nervoso e o tratamento com *E. faecium* M7AN10 é capaz de atenuar os parâmetros inflamatórios no tecido cerebral, reduzindo, portanto, a neuroinflamação em modelo animal de colite induzida por DSS.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da administração de DSS 2% no desenvolvimento da colite aguda e da neuroinflamação, bem como os efeitos da cepa probiótica de *Enterococcus faecium M7AN10* nos diferentes grupos.

- Induzir o modelo de colite por DSS 2% e avaliar os parâmetros de inflamação intestinal e neuroinflamação em camundongos.
- Tratar os animais dos diferentes grupos com a cepa probiótica M7AN10 por gavagem
- Avaliar os parâmetros de RCU no modelo animal como IAD, análise macroscópica do intestino e escore histológico.
- Avaliar o comportamento tipo ansioso através de teste plus maze e open field.
- Quantificar as citocinas: IL-1 β , IL-17a, IL-6 e TNF α em hipotálamo, hipocampo e córtex

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.3 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi desenvolvido no Laboratório Células, Tecidos e Genes (CTG), na Unidade de Pesquisa Laboratorial (UPL) e na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Também contou com o apoio da Unidade de Patologia Experimental do HCPA e do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

6.4 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos fornecidos pelo Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE), provedor externo cadastrado junto ao HCPA por intermédio da UEA. Os animais adquiridos tinham idades entre 8-12 semanas, do início ao fim do protocolo. Após a chegada à UEA, os animais passaram por um período de aclimação/quarentena de pelo menos 15 dias antes do início dos procedimentos experimentais. Todos os animais receberam ração e água *ad libitum*. E foram alocados em 2 a 3 animais por caixa e mantidos em ambiente climatizado ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, bem como em condições padrão de umidade relativa de 40-60% e sistema de exaustão de ar. Foi instituído protocolo padrão de enriquecimento ambiental da 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).

6.5 AMOSTRA E CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

O número amostral foi de 15 animais por grupo experimental, número baseado no estudo de Nyuyki e colaboradores (2018) que avaliou parâmetros comportamentais como desfecho principal e obteve diferenças estatisticamente significantes nas avaliações de *plus maze* e *open field* (68). Dessa forma utilizamos 60 animais para o desenvolvimento do estudo.

6.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS

6.6.1 Desenho experimental

O estudo consistiu na administração de probiótico pré e pós a indução da colite aguda por DSS a 2% (Figura 8). Foram avaliados quatro grupos experimentais que são detalhados a seguir.

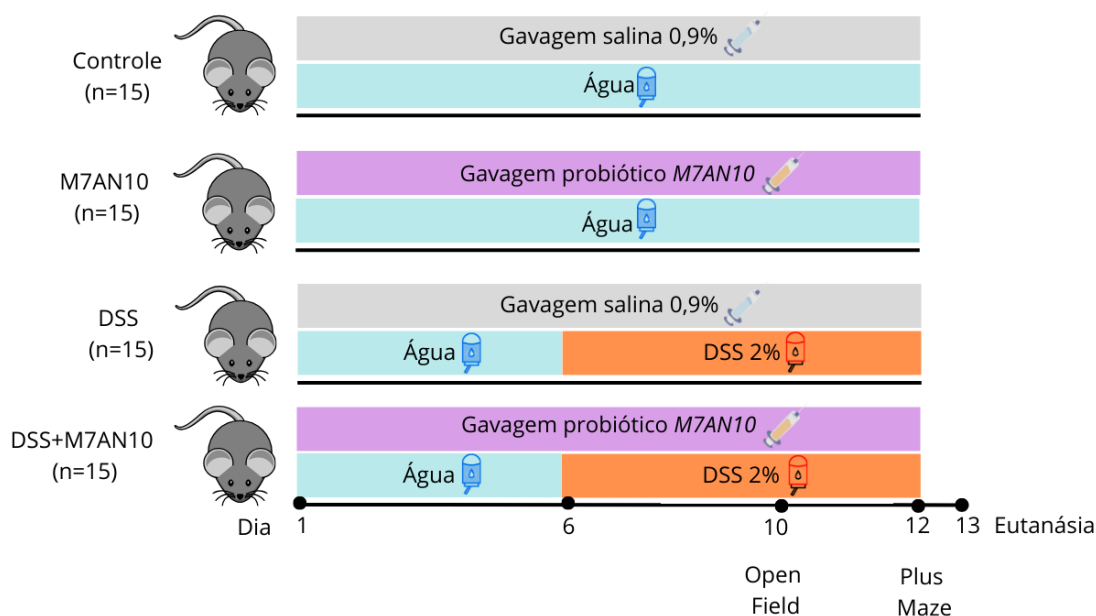


Figura 8 - Esquema de tratamento com probiótico e indução de colite com DSS 2%. As figuras foram criadas pela autora com Canva.com (acessado em 5 de janeiro de 2024). Obtido em <https://canva.com> (acessado em 5 de janeiro de 2024).

Grupo Controle - Animais que recebem água potável autoclavada durante o protocolo e gavagem diária do veículo de administração do probiótico M7AN10 (salina 0,9%) (n=15)

Grupo M7AN10 - Grupo controle saudável onde os animais recebem água potável autoclavada durante o protocolo e gavagem do probiótico M7AN10 (n=15)

Grupo DSS – Grupo com colite induzida por DSS 2% na água de beber que recebeu gavagem do veículo (salina 0,9%) mas não o probiótico M7AN10 pré e pós indução de colite (n=15)

Grupo DSS+M7AN10 – Grupo com colite induzida por DSS 2% e que recebeu gavagem do probiótico M7AN10 pré e pós indução de colite (n=15).

6.7 ADMINISTRAÇÃO DO PROBIÓTICO

6.7.1 Preparo e administração do probiótico

A suspensão do probiótico *Enterococcus faecium M7AN10* isolado de leite bubalino foi fornecida pela Profa. Amanda de Souza da Motta, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFRGS, colaboradora deste trabalho.

Os isolados foram cultivados em caldo MRS (Man, Rogosaand Sharpe) a 37°C por 24 h e uma alíquota de 100 µL foi separada para contagem celular. Os cultivos foram centrifugados a 7.000 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 da cultura administrada foi de aproximadamente $3,5 \times 10^8$ UFC/ml. As amostras foram liofilizadas e congeladas a -20°C. Antes da administração aos animais, as alíquotas foram descongeladas em geladeira (2 - 8°C) e administradas em temperatura ambiente. A ressuspensão das alíquotas de probiótico e controle veículo foram feitas diariamente em 1mL de solução salina 0,9%, imediatamente antes da administração aos animais.

O probiótico foi administrado via gavagem, utilizando agulha de gavagem apropriada 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 profissional treinado, colaborador deste trabalho, 1 vez por dia durante 12 dias do protocolo (do dia 1 ao dia 12).

Os animais do grupo DSS+M7AN10 receberam 150 µL da suspensão de probiótico por 5 dias antes do protocolo de indução da colite e por mais 7 dias durante o protocolo de indução de colite (totalizando 12 dias) (69). E os animais do grupo M7AN10 receberam 150 µL da suspensão de probiótico durante os 12 dias do protocolo. Os animais do grupo Controle e do grupo DSS receberam durante os 12 dias 150 µL do veículo de administração do probiótico *M7AN10* (salina 0,9%) via gavagem.

6.8 INDUÇÃO DE COLITE ULCERATIVA AGUDA POR DSS

Camundongos C57BL/6 foram induzidos a desenvolver colite ulcerativa aguda pela administração de 2% m/v, DSS peso molecular 36 000– 50 000 Da (MP Biomedicals) na água de beber do dia 6 ao dia 12 do protocolo. O DSS foi pesado e diluído na água de beber autoclavada dos animais de maneira a se obter uma solução a 2%. Essa solução foi trocada diariamente, o conteúdo restante foi medido e os valores das sobras diárias foram registrados em uma planilha. A quantidade de solução de DSS a 2% foi preparada de acordo com a estimativa de ingestão média de água de cada animal que é de aproximadamente 5 mL/dia. Os animais do grupo Controle e M7AN10 receberam água pura autoclavada (70–72).

6.9 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA E DA DOR

A confirmação clínica do estabelecimento da colite foi realizada através do Índice de atividade da doença (IAD), avaliado diariamente a partir do início da administração do DSS a 2% (do dia 6 até o dia 12 do protocolo). Diariamente, os animais foram observados em relação a perda de peso, consistência das fezes, e presença de sangue nas fezes (de forma macroscópica) e no ânus (70). Para o parâmetro perda de peso foi atribuído um escore de 0 a 4, e para a consistência das fezes e sangue nas fezes/ânus foi atribuída a pontuação 0, 2 ou 4, resultando na pontuação total do IAD de 0 (não afetado) a 12 (doença severa) conforme tabela abaixo:

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

Tabela 1 - Avaliação do Índice de Atividade da Doença. Fonte: GONÇALVES *et al.*, 2013.

Nos mesmos dias do protocolo, antes da realização do IAD, foi realizada a avaliação da dor, aplicando a Grimace Scale para camundongos. Através de uma escala de expressão facial. Essa escala fornece um meio para avaliar a dor aguda e inflamatória (73).

6.10 COLETA DE FEZES

Visando complementar a avaliação clínica da doença foi realizada a análise do conteúdo de água nas fezes dos animais. As amostras foram coletadas em três momentos distintos durante a indução da colite com DSS 2%. As fezes foram coletadas no dia 12 do protocolo e pesadas em balança analítica, sendo armazenadas em recipiente aberto que não interferisse no resultado e absorvesse a água presente nas fezes dos camundongos (conforme figura 9). Após 3 dias da coleta, as amostras de fezes foram pesadas novamente e a diferença entre o peso inicial (úmido) e o peso final (seco) foi determinada.



Figura 9 - Imagem criada pela autora. Recipiente de plástico onde eram armazenadas as fezes dos animais.

6.11 TESTES COMPORTAMENTAIS

6.11.1 Open Field

Os camundongos foram submetidos ao teste *Open field* (OF) no dia 10 (D10) do protocolo. Para avaliar o comportamento ansioso. Todos os testes comportamentais foram realizados no período da tarde, das 13h às 17h. No dia do teste, os camundongos foram levados para a sala de testes comportamentais e deixados para habitarem-se por pelo menos 1 hora antes do início do teste. Todas as análises foram feitas por um experimentador cego para os grupos de tratamento. O OF é composto por uma caixa de atividade que permite registrar a movimentação do animal para posterior análise através de software. Possui demarcação de 16 quadrantes de 10X10cm dividida em zona central e periférica. Os camundongos foram colocados na zona central e deixados explorar o aparato por 5 min. O aparato foi limpo com etanol a 70% entre cada animal. O teste foi registrado por meio de uma câmera de vídeo e posteriormente analisado usando o software Anymaze versão 7.35 para análise dos vídeos gravados. Para o comportamento relacionado à ansiedade foram analisados a porcentagem de tempo gasto na periferia e na zona central, e a locomoção representada como a distância total percorrida (68).

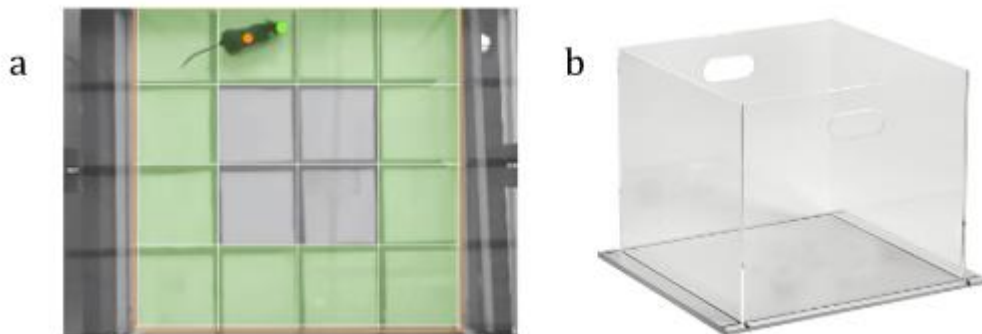


Figura 10 - (a) Imagem da realização do teste do *open field* (Criada pela autora). (b) aparato para realização do teste (ANYMAZE).

6.11.2 Plus Maze

No dia 12 (D12) do protocolo foi realizado o teste de Labirinto em Cruz elevado ou *plus maze* para avaliar o comportamento relacionado à ansiedade dos camundongos. O teste comportamental do *plus maze* é considerado padrão ouro para avaliação de ansiedade. Todos os testes comportamentais foram realizados no período da tarde, das 13h às 17h. No dia do teste, os camundongos foram levados para a sala de testes comportamentais e deixados para habitarem-se por pelo menos 1 hora antes do início do teste. Todas as análises foram feitas por um experimentador cego para os grupos de tratamento. Para o teste plus maze, os camundongos foram selecionados aleatoriamente e colocados no aparato. O aparato consistia em uma plataforma em formato de cruz com superfície de madeira elevada 50 cm acima do chão. Os 4 braços eram compostos por dois braços opostos abertos sem paredes e dois braços fechados por uma parede de 20 cm, todos conectados a uma área central de 7 × 7 cm. Cada braço tinha 21,5 cm de comprimento e 7 cm de largura. A intensidade da luz foi ajustada. A câmera de gravação foi colocada acima do aparato. Em cada sessão, o animal foi colocado na zona central voltado para o braço aberto oposto ao experimentador e registrado por 5 min. Ao final do teste, o camundongo era devolvido a uma nova gaiola e posteriormente a sua gaiola original. O aparelho foi limpo com etanol a 70% entre cada animal. O software Anymaze versão 7.35 foi utilizado para análise dos vídeos gravados, avaliando o tempo de permanência dos animais nos braços abertos e fechados e a locomoção total pelo labirinto (68).

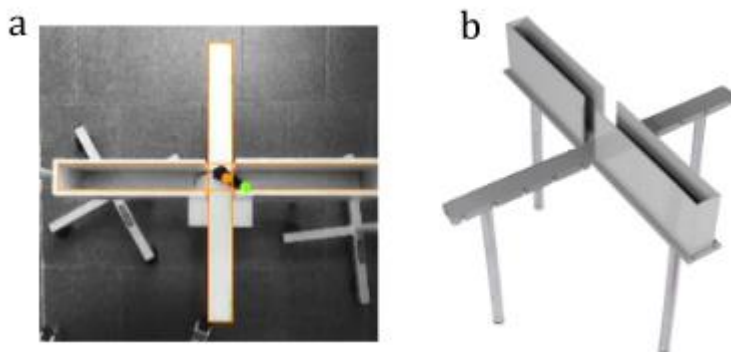


Figura 11 - (a) Imagem da realização do teste plus maze. (b) Aparato para o teste do plus maze.

6.12 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE MATERIAIS BIOLÓGICOS

No 13º dia do protocolo os animais foram eutanasiados. Cinco animais de cada grupo foram submetidos à anestesia profunda (isoflurano 5% vaporizado em 100% O₂ 0,5l/min) e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, colocadas em tubos de coleta de bioquímica (BD Vacutainer, NJ, EUA) para a separação do soro, e centrifugadas a 7000 x g por 20 min. Após separação, o soro foi armazenado a -80°C. Em seguida, os animais foram perfundidos com solução de paraformaldeído 4% (pH 9,5) e os cérebros e intestinos foram coletados para análise histológica. Os dez animais restantes de cada grupo foram eutanasiados por guilhotina, que é um método de indução de morte aceito sob restrição pelo CONCEA. A escolha do método foi devido a possível influência do procedimento anestésico no tecido nervoso. Desses animais foram coletadas as seguintes estruturas: córtex, hipocampo, hipotálamo e cerebelo. Os tecidos foram armazenados a -80°C até a dosagem de citocinas e os intestinos também foram coletados para análise histológica.

O uso de isoflurano não foi indicado em nosso modelo experimental, devido aos mecanismos deste anestésico inalatório, uma vez que a literatura descreve a interferência na função cerebral desse anestésico, como é o caso de estudos avaliando a afinidade *in vivo* de inibidores da fosfodiesterase-4 e a distribuição dos receptores de serotonina (74–76). A confirmação da morte se deu pela verificação dos seguintes sinais: ausência de movimento respiratório, batimentos cardíacos e pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal. A execução da técnica e a confirmação da morte foi realizada por médico veterinário. A fim de evitar possíveis vieses metodológicos os animais não receberam nenhum tipo de analgesia ou anti-inflamatórios, pelo fato que estas medicações influenciam na RCU, sendo capaz de alterar a permeabilidade do colón (77–79).

6.13 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS CÓLONS

Após limpeza, com o auxílio de uma tesoura, os cólons foram abertos longitudinalmente da região distal a proximal, formando uma folha plana. Iniciando-se da parte distal, os intestinos foram rolados de forma a gerar um espiral. Os cólons

foram fixados em formalina tamponada 10% por 24h, processados e incluídos em parafina para que, posteriormente, fossem obtidos cortes mediais longitudinais de 4 µm de espessura na Unidade de Patologia Experimental do CPE do HCPA. Para a avaliação histológica, as amostras foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E), e foi utilizada a escala de Dieleman e colaboradores (1998), com os seguintes critérios para análise (80):

- A) Gravidade da inflamação (0-3);
- B) Extensão da inflamação (0-3);
- C) Regeneração (0-4);
- D) Danos à cripta (0-4);
- E) Percentual do comprometimento do tecido (0-4).

A pontuação de cada parâmetro de gravidade da inflamação (A), extensão da inflamação (B), regeneração (C) e danos à cripta (D) foi multiplicada pelo percentual 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) e (B) tem uma escala de pontuações de 0 a 12, e (C) e (D) de 0 a 16. O índice histológico foi calculado com a soma dos produtos de todos os parâmetros.

6.14 DOSAGEM DE CITOCINAS

Para avaliar a neuroinflamação foi realizada a análise de citocinas das amostras cerebrais. Para isso, as seguintes estruturas foram utilizadas: córtex, hipocampo e hipotálamo que foram homogeneizadas com inibidor de protease SIGMAFAST™. O sobrenadante foi coletado e a quantificação de proteínas foi realizada utilizando a técnica de Bradford sendo feita a leitura em espectrofotômetro a 595nm (SpectraMax M3, Molecular Devices). Posteriormente foi realizada a dosagem das citocinas IL-1β, IL-17a, IL-6, TNFα através do kit Mouse ProcartaPlex Mix&Match 4-Plex (Invitrogen™) utilizando a plataforma LuminexMAP. Este método é baseado nos princípios de um ELISA sanduíche e utiliza a tecnologia das beads para detectar simultaneamente múltiplas citocinas numa mesma amostra.

6.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças estatísticas foram determinadas utilizando ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, usando o software Prism v6.1 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

6.16 QUESTÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais CEUA do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) sob número 2022-0430 e respeitou os procedimentos e resoluções normativas para o uso científico de animais e os todos os critérios propostos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

7 RESULTADOS

8 DISCUSSÃO

9 CONCLUSÃO

10 PERSPECTIVAS/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como perspectivas futuras para este trabalho temos:

- Avaliar estresse oxidativo nas diferentes regiões de SNC;
- Avaliar, por coloração de alcian blue, a conservação e produção de mucinas nas células da mucosa do cólon com e sem tratamento com cepa probiótica de *M7AN10*;
- Avaliar, por imunohistoquímica, a proteína Iba1 (marcador de micróglia), S100 (glia inflamada) e GFAP (astrócito);
- Avaliar a microbiota intestinal para identificar os gêneros de bactérias encontrados nas fezes dos diferentes grupos experimentais. Essa análise será importante para demonstrar as possíveis alterações na composição da microbiota intestinal do grupo *M7AN10* que repercutiram causando neuroinflamação independente da colite.

REFERÊNCIAS

1. McDowell C, Farooq U, Haseeb M. Inflammatory Bowel Disease - StatPearls - NCBI Bookshelf [Internet]. 2023 [cited 2024 Mar 7]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470312/>
2. Fine S. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease.
3. Kociszewska D, Vljakovic SM. The Association of Inflammatory Gut Diseases with Neuroinflammatory and Auditory Disorders. Vol. 14, *Frontiers in Bioscience - Elite*. Bioscience Research Institute; 2022.
4. Paladino L, Rappa F, Barone R, Macaluso F, Zummo FP, David S, et al. NF-κB Regulation and the Chaperone System Mediate Restorative Effects of the Probiotic *Lactobacillus fermentum* LF31 in the Small Intestine and Cerebellum of Mice with Ethanol-Induced Damage. *Biology (Basel)*. 2023 Nov 1;12(11):1394.
5. Selvaratnam S, Gullino S, Shim L, Lee E, Lee A, Paramsothy S, et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in South America: A systematic review. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2019 Dec 12 [cited 2022 Jun 5];25(47):6866. Available from: </pmc/articles/PMC6931006/>
6. Alatab S, Sepanlou SG, Ikuta K, Vahedi H, Bisignano C, Safiri S, et al. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020 Jan 1;5(1):17–30.
7. Kaplan GG, Windsor JW. The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease. Vol. 18, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Research; 2021. p. 56–66.
8. Parente JML, Coy CSR, Campelo V, Parente MPPD, Costa LA, Da Silva RM, et al. Inflammatory bowel disease in an underdeveloped region of Northeastern Brazil. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Jun 5];21(4):1197. Available from: </pmc/articles/PMC4306164/>
9. Quaresma AB, Kaplan GG, Kotze PG. The globalization of inflammatory bowel disease: The incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Brazil. Vol. 35, *Current Opinion in Gastroenterology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2019. p. 259–64.
10. Renuzza SSS, Vieira ER, Cornel CA, Lima MN, Ramos Junior O. Incidence, prevalence, and epidemiological characteristics of inflammatory bowel diseases in the state of Paraná in Southern Brazil. *Arq Gastroenterol*. 2022 Jul 1;59(3):327–33.
11. de Brito CAA, Celani LMS, de Araújo MVT, de Lucena MT, Vasconcelos GBS, Lima GAS, et al. A Multicentre Study of the Clinical and Epidemiological Profile of Inflammatory Bowel Disease in Northeast Brazil. *Clin Exp Gastroenterol*. 2023;16:87–99.
12. Flynn S, Eisenstein S. Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. Vol. 99, *Surgical Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2019. p. 1051–62.
13. M'koma AE. Inflammatory Bowel Disease: Clinical Diagnosis and Surgical Treatment-Overview. Vol. 58, *Medicina (Lithuania)*. MDPI; 2022.
14. Bruner LP, White AM, Proksell S. Inflammatory Bowel Disease. Vol. 50, *Primary Care - Clinics in Office Practice*. W.B. Saunders; 2023. p. 411–27.
15. Shen ZH, Zhu CX, Quan YS, Yang ZY, Wu S, Luo WW, et al. Relationship

- between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2018 Jan 7 [cited 2022 Jun 5];24(1):5–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29358877/>
16. Parra RS, Chebli JMF, Amarante HMBS, Flores C, Parente JML, Ramos O, et al. Quality of life, work productivity impairment and healthcare resources in inflammatory bowel diseases in Brazil. *World J Gastroenterol*. 2019;25(38):5862–82.
 17. Sciberras M, Karmiris K, Nascimento C, Tabone T, Nikolaou P, Theodoropoulou A, et al. Mental Health, Work Presenteeism, and Exercise in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohn's Colitis*. 2022 Aug 1;16(8):1197–201.
 18. Wehkamp J, Götz M, Herrlinger K, Steurer W, Stange EF. Inflammatory Bowel Disease: Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int* [Internet]. 2016 Feb 5 [cited 2022 Jun 5];113(5):72. Available from: [/pmc/articles/PMC4782273/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26411357/)
 19. Mikocka-Walus A, Pittet V, Rossel JB, von Känel R. Symptoms of Depression and Anxiety Are Independently Associated With Clinical Recurrence of Inflammatory Bowel Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016 Jun 1;14(6):829-835.e1.
 20. Le Berre C, Ananthakrishnan AN, Danese S, Singh S, Peyrin-Biroulet L. Ulcerative Colitis and Crohn's Disease Have Similar Burden and Goals for Treatment. Vol. 18, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. W.B. Saunders; 2020. p. 14–23.
 21. Turner D, Ricciuto A, Lewis A, D'Amico F, Dhaliwal J, Griffiths AM, et al. STRIDE-II: An Update on the Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE) Initiative of the International Organization for the Study of IBD (IOIBD): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target strategies in IBD. *Gastroenterology*. 2021 Apr 1;160(5):1570–83.
 22. Plevris N, Lees CW. Disease Monitoring in Inflammatory Bowel Disease: Evolving Principles and Possibilities. *Gastroenterology*. 2022 Apr 1;162(5):1456-1475.e1.
 23. Świrkosz G, Szczygieł A, Logoń K, Wrześniewska M, Gomułka K. The Role of the Microbiome in the Pathogenesis and Treatment of Ulcerative Colitis—A Literature Review. Vol. 11, *Biomedicines*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
 24. Foppa C, Rizkala T, Repici A, Hassan C, Spinelli A. Microbiota and IBD: Current knowledge and future perspectives. *Digestive and Liver Disease*. Elsevier B.V.; 2023.
 25. Ramos GP, Papadakis KA. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. Vol. 94, *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier Ltd; 2019. p. 155–65.
 26. Wang M, Shi J, Yu C, Zhang X, Xu G, Xu Z, et al. Emerging strategy towards mucosal healing in inflammatory bowel disease: what the future holds? *Front Immunol*. 2023 Dec 14;14.
 27. Boneschansker L, Burke KE. Beyond the Gut: The Epidemiology of Extraintestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. *Clin Transl Gastroenterol*. 2023 Dec;14(12):e00618.
 28. Hedin CRH, Vavricka SR, Stagg AJ, Schoepfer A, Raine T, Puig L, et al. The Pathogenesis of Extraintestinal Manifestations: Implications for IBD Research, Diagnosis, and Therapy. *J Crohn's Colitis*. 2019 Apr 26;13(5):541–54.
 29. Guillo L, Savoye G, Amiot A, Gilletta C, Nachury M, Dib N, et al. Prevalence of

- and factors associated with extraintestinal manifestations and their remission in inflammatory bowel disease: The EXTRA prospective study from the GETAID. *Clin Transl Gastroenterol*. 2023;
30. Juliao-Baños F, Arrubla M, Osorio L, Camargo J, Londoño J, Cáceres C, et al. Characterization and prevalence of extraintestinal manifestations in a cohort of patients with inflammatory intestinal disease in Medellín, Colombia. *Gastroenterol y Hepatol (English Ed)*. 2021 Jun;44(6):398–404.
 31. Rogler G, Singh A, Kavanaugh A, Rubin DT. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease: Current Concepts, Treatment, and Implications for Disease Management. Vol. 161, *Gastroenterology*. W.B. Saunders; 2021. p. 1118–32.
 32. Ferro JM, Oliveira Santos M. Neurology of inflammatory bowel disease. *J Neurol Sci [Internet]*. 2021 May 15 [cited 2022 Jun 4];424. Available from: <http://www.jns-journal.com/article/S0022510X21001192/fulltext>
 33. Alnafisah K, Alsaleem HN, Aldakheel FN, Alrashidi A b, Alayid RA, Almuhayzi HN, et al. Anxiety and Depression in Patients With Inflammatory Bowel Disease at King Fahad Specialist Hospital, Qassim Region. *Cureus*. 2023 Sep 8;
 34. Barberio B, Zamani M, Black CJ, Savarino E V., Ford AC. Prevalence of symptoms of anxiety and depression in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2021 May 1;6(5):359–70.
 35. He Y, Chen CL, He J, Liu S De. Causal associations between inflammatory bowel disease and anxiety: A bidirectional Mendelian randomization study. *World J Gastroenterol*. 2023;29(44):5872–81.
 36. Craig CF, Filippone RT, Stavely R, Bornstein JC, Apostolopoulos V, Nurgali K. Neuroinflammation as an etiological trigger for depression comorbid with inflammatory bowel disease. *J Neuroinflammation [Internet]*. 2022 Dec 1 [cited 2022 Jun 4];19(1):1–30. Available from: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-021-02354-1>
 37. Bisgaard TH, Allin KH, Keefer L, Ananthakrishnan AN, Jess T. Depression and anxiety in inflammatory bowel disease: epidemiology, mechanisms and treatment. Vol. 19, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Research; 2022. p. 717–26.
 38. Garcia-Argibay M, Hiyoshi A, Montgomery S. Association between dementia risk and ulcerative colitis, with and without colectomy: a Swedish population-based register study. *BMJ Open*. 2023 Dec;13(12):e074110.
 39. Du H, Wang D, Zhang X. Inflammatory bowel disease: A potential pathogenic factor of Alzheimer’s disease. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry [Internet]*. 2022;119(November 2021):110610. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2022.110610>
 40. Zhu Y, Yuan M, Liu Y, Yang F, Chen WZ, Xu ZZ, et al. Association between inflammatory bowel diseases and Parkinson’s disease: Systematic review and meta-Analysis. Vol. 17, *Neural Regeneration Research*. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2022. p. 344–53.
 41. Li HX, Zhang C, Zhang K, Liu YZ, Peng XX, Zong Q. Inflammatory bowel disease and risk of Parkinson’s disease: evidence from a meta-analysis of 14 studies involving more than 13.4 million individuals. Vol. 10, *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media SA; 2023.

42. Günther C, Rothhammer V, Karow M, Neurath M, Winner B. The Gut-Brain Axis in Inflammatory Bowel Disease-Current and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Aug 2 [cited 2023 Sep 4];22(16). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34445575/>
43. Han Y, Zhao T, Cheng X, Zhao M, Gong SH, Zhao YQ, et al. Cortical Inflammation is Increased in a DSS-Induced Colitis Mouse Model. *Neurosci Bull* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2022 Jun 4];34(6):1058–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30225764/>
44. Zonis S, Pechnick RN, Ljubimov VA, Mahgerefteh M, Wawrowsky K, Michelsen KS, et al. Chronic intestinal inflammation alters hippocampal neurogenesis. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2015 Apr 3 [cited 2022 Jun 4];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25889852/>
45. Agirman G, Yu KB, Hsiao EY. Signaling inflammation across the gut-brain axis. *Science* (80-) [Internet]. 2021 Nov 26 [cited 2022 Aug 8];374(6571):1087–92. Available from: <https://www-science-org.ez45.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1126/science.abi6087>
46. Illiano P, Brambilla R, Parolini C. The mutual interplay of gut microbiota, diet and human disease. Vol. 287, *FEBS Journal*. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 833–55.
47. Quigley EMM. Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. Vol. 17, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. W.B. Saunders; 2019. p. 333–44.
48. Pandey H, Jain D, Tang DWT, Wong SH, Lal D. Gut microbiota in pathophysiology, diagnosis, and therapeutics of inflammatory bowel disease. *Intest Res*. 2023 Nov 8;
49. Guarner F, Sanders ME, Eliakim R, Fedorak R, Gangl A, Garisch J, et al. Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia: Probióticos e prebióticos [Internet]. World Gastroenterology Organisation. 2023. Available from: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-portuguese>
50. Fang J, Yang Y, Xie W. Chinese expert consensus on the application of live combined Bifidobacterium, Lactobacillus, and Enterococcus powder/capsule in digestive system diseases (2021). 2023; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jgh.16195>
51. Jang YJ, Kim WK, Han DH, Lee K, Ko G. Lactobacillus fermentum species ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis by regulating the immune response and altering gut microbiota. *Gut Microbes* [Internet]. 2019 Nov 2 [cited 2022 Jun 5];10(6):696. Available from: [/pmc/articles/PMC6866707/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34445575/)
52. He W, Ni W, Zhao J. Enterococcus faecium Alleviates Gut Barrier Injury in C57BL/6 Mice with Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis. *Gastroenterol Res Pract*. 2021;2021.
53. Frank MG, Fonken LK, Watkins LR, Maier SF, Lowry CA. Could Probiotics Be Used to Mitigate Neuroinflammation? *ACS Chem Neurosci* [Internet]. 2019 Jan 16 [cited 2022 Jun 5];10(1):13–5. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acchemneuro.8b00386>
54. Takahashi K, Nakagawasai O, Nemoto W, Odaira T, Sakuma W, Onogi H, et al. Effect of Enterococcus faecalis 2001 on colitis and depressive-like behavior in dextran sulfate sodium-treated mice: Involvement of the brain-gut axis. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2019 Oct 31 [cited 2022 May 29];16(1):1–16. Available from: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-019->

- 1580-7
55. Nk B, Jang H min, Lee K eon, Kim D hyun. nutrients The Preventive and Curative Effects of Lactobacillus. 2019;(II).
 56. Rodríguez-Lucas C, Ladero V. Enterococcal Phages: Food and Health Applications. Vol. 12, Antibiotics. MDPI; 2023.
 57. Liu ZL, Chen YJ, Meng QL, Zhang X, Wang XL. Progress in the application of Enterococcus faecium in animal husbandry. Vol. 13, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Frontiers Media SA; 2023.
 58. Aprea G, Del Matto I, Tucci P, Marino L, Scattolini S, Rossi F. In Vivo Functional Properties of Dairy Bacteria. Vol. 11, Microorganisms. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
 59. Pires Kurtz J, Trapp Grassotti T, Paula A, Frazzon G, Monks Jantzen M, De Souza Da Motta A. An Assessment of the innocuity of Enterococcus faecium isolated from buffalo milk in southern Brazil. Microbiol Curr Res [Internet]. 2021 Mar 31 [cited 2024 Mar 7];5(1):1–6. Available from: <https://www.alliedacademies.org/articles/>
 60. KURTZ JNP. The probiotic properties of Enterococcus faecium strains isolated from buffalo milk: food matrix studies. Journal of clinical nutrition and food science. . J Clin Nutr food Sci [Internet]. 2021 [cited 2022 Jun 7];4(1):17–29. Available from: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/237138>
 61. Santos LA. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:FISIOLOGIA.
 62. Masanetz RK, Winkler J, Winner B, Günther C, Süß P. The Gut–Immune–Brain Axis: An Important Route for Neuropsychiatric Morbidity in Inflammatory Bowel Disease. Vol. 23, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2022.
 63. Bercik P, Park AJ, Sinclair D, Khoshdel A, Lu J, Huang X, et al. The anxiolytic effect of Bifidobacterium longum NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. Neurogastroenterol Motil. 2011 Dec;23(12):1132–9.
 64. Eichele DD, Kharbanda KK. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. Vol. 23, World Journal of Gastroenterology. Baishideng Publishing Group Co; 2017. p. 6016–29.
 65. Katsandegwaza B, Horsnell W, Smith K. Inflammatory Bowel Disease: A Review of Pre-Clinical Murine Models of Human Disease. Vol. 23, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2022.
 66. Wirtz S, Popp V, Kindermann M, Gerlach K, Weigmann B, Fichtner-Feigl S, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. Nat Protoc. 2017 Jul 1;12(7):1295–309.
 67. Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: Traps and tricks. Vol. 2012, Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012.
 68. Nyuyki KD, Cluny NL, Swain MG, Sharkey KA, Pittman QJ. Altered Brain Excitability and Increased Anxiety in Mice With Experimental Colitis: Consideration of Hyperalgesia and Sex Differences. Front Behav Neurosci [Internet]. 2018 Apr 3 [cited 2022 Jun 7];12. Available from: </pmc/articles/PMC5893896/>
 69. Bian X, Wu W, Yang L, Lv L, Wang Q, Li Y, et al. Administration of Akkermansia muciniphila Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice. Front Microbiol [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2022 Sep 20];10. Available from: </pmc/articles/PMC6779789/>

70. da Costa Gonçalves F, Schneider N, Flores Mello, Helena; Pandolfi Passos, Eduardo; Meurer L, Cirne-Lima, Elizabeth; Helena da Rosa Paz A. Characterization of acute murine dextran sodium sulfate (DSS) colitis: severity of inflammation is dependent on the DSS molecular weight and concentration. *Acta sci vet.* 2013;41:01–9.
71. Gonçalves F da C, Schneider N, Pinto FO tesbelgu., Meyer FS, Visioli F, Pfaffenseller B, et al. Intravenous vs intraperitoneal mesenchymal stem cells administration: What is the best route for treating experimental colitis? *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014 Dec 12 [cited 2022 Jun 7];20(48):18228. Available from: [/pmc/articles/PMC4277960/](#)
72. da Costa Gonçalves F, Grings M, Nunes NS, Pinto FO, Garcez TNA, Visioli F, et al. Antioxidant properties of mesenchymal stem cells against oxidative stress in a murine model of colitis. *Biotechnol Lett* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2022 Jun 7];39(4):613–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28032203/>
73. Leung VSY, Benoit-Biancamano MO, Pang DSJ. Performance of behavioral assays: the Rat Grimace Scale, burrowing activity and a composite behavior score to identify visceral pain in an acute and chronic colitis model. *Pain Reports* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2023 Feb 27];4(2). Available from: [/pmc/articles/PMC6455688/](#)
74. Matsumura A, Mizokawa S, Tanaka M, Wada Y, Nozaki S, Nakamura F, et al. Assessment of microPET performance in analyzing the rat brain under different types of anesthesia: comparison between quantitative data obtained with microPET and ex vivo autoradiography. *Neuroimage.* 2003 Dec 1;20(4):2040–50.
75. Tokugawa J, Ravasi L, Nakayama T, Lang L, Schmidt KC, Seidel J, et al. Distribution of the 5-HT_{1A} receptor antagonist [18F]FPWAY in blood and brain of the rat with and without isoflurane anesthesia. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006 342 [Internet]. 2006 Sep 22 [cited 2022 Sep 20];34(2):259–66. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00259-006-0228-x>
76. Itoh T, Abe K, Zoghbi SS, Inoue O, Hong J, Imaizumi M, et al. PET Measurement of the In Vivo Affinity of 11C-(R)-Rolipram and the Density of Its Target, Phosphodiesterase-4, in the Brains of Conscious and Anesthetized Rats. *J Nucl Med* [Internet]. 2009 May 1 [cited 2022 Sep 20];50(5):749. Available from: [/pmc/articles/PMC2791885/](#)
77. Felder JB, Korelitz BI, Rajapakse R, Schwarz S, Horatagis AP, Gleim G. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2000 Aug [cited 2022 Jun 7];95(8):1949–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10950041/>
78. Guslandi M. Exacerbation of inflammatory bowel disease by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors: Fact or fiction? *World J Gastroenterol* [Internet]. 2006 Mar 3 [cited 2022 Jun 7];12(10):1509. Available from: [/pmc/articles/PMC4124281/](#)
79. Osterman MT, Haynes K, Delzell E, Zhang J, Bewtra M, Brensinger CM, et al. Effectiveness and Safety of Immunomodulators with Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2022 Jun 7];13(7):1293. Available from: [/pmc/articles/PMC4475667/](#)
80. Dieleman LA, Palmen MJHJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SGM, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1998

- [cited 2022 Jun 7];114(3):385–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9844047/>
81. Kim WK, Han DH, Jang YJ, Park S, Jang SJ, Lee G, et al. Alleviation of DSS-induced colitis: Via *Lactobacillus acidophilus* treatment in mice. *Food Funct*. 2021 Jan 7;12(1):340–50.
 82. Wang QW, Jia DJC, He JM, Sun Y, Qian Y, Ge QW, et al. *Lactobacillus Intestinalis* Primes Epithelial Cells to Suppress Colitis-Related Th17 Response by Host-Microbe Retinoic Acid Biosynthesis. *Adv Sci*. 2023 Dec 27;10(36).
 83. Zhu Y, Xu Y, Wang X, Rao L, Yan X, Gao R, et al. Probiotic Cocktail Alleviates Intestinal Inflammation Through Improving Gut Microbiota and Metabolites in Colitis Mice. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jun 15;12.
 84. Zhang WQ, Quan KY, Feng CJ, Zhang T, He QW, Kwok LY, et al. The *Lactobacillus gasseri* G098 Strain Mitigates Symptoms of DSS-Induced Inflammatory Bowel Disease in Mice. *Nutrients*. 2022 Sep 1;14(18).
 85. Celiberto LS, Bedani R, Dejana NN, De Medeiros AI, Zuanon JAS, Spolidorio LC, 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*. 2017 Apr 1;12(4).
 86. Rahman AA, Robinson AM, Jovanovska V, Eri R, Nurgali K. Alterations in the distal colon innervation in Winnie mouse model of spontaneous chronic colitis. *Cell Tissue Res*. 2015 Dec 1;362(3):497–512.
 87. Kim HJ, Jeon HJ, Kim JY, Shim JJ, Lee JH. *Lactiplantibacillus plantarum* HY7718 Improves Intestinal Integrity in a DSS-Induced Ulcerative Colitis Mouse Model by Suppressing Inflammation through Modulation of the Gut Microbiota. *Int J Mol Sci*. 2024 Jan 1;25(1).
 88. Wang H, Zhang X, Kou X, Zhai Z, Hao Y. A Ropy Exopolysaccharide-Producing Strain *Bifidobacterium pseudocatenulatum* Bi-OTA128 Alleviates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. *Nutrients*. 2023 Dec 1;15(23).
 89. Zheng T, Hao H, Liu Q, Li J, Yao Y, Liu Y, et al. Effect of Extracellular Vesicles Derived from *Akkermansia muciniphila* on Intestinal Barrier in Colitis Mice. *Nutrients*. 2023 Nov 1;15(22).
 90. Butorac K, Novak J, Banić M, Leboš Pavunc A, Čuljak N, Oršolić N, et al. Modulation of the Gut Microbiota by the Plantaricin-Producing *Lactiplantibacillus plantarum* D13, Analysed in the DSS-Induced Colitis Mouse Model. *Int J Mol Sci*. 2023 Oct 1;24(20).
 91. Han M, Liao W, Dong Y, Fei T, Gai Z. Sustained ameliorative effect of *Lactobacillus acidophilus* LA85 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J Food Sci*. 2023;88(9):3893–904.
 92. Carola V, Olimpico FD, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice [Internet]. Vol. 134, *Behavioural Brain Research*. 2002. Available from: www.elsevier.com/locate/bbr
 93. Zhou Y, Ji G, Yang X, Chen Z, Zhou L. Behavioral abnormalities in C57BL/6 mice with chronic ulcerative colitis induced by DSS. *BMC Gastroenterol*. 2023 Dec 1;23(1).
 94. Castanon N, Mormi-de P. 0306-4530(93)E0008-J REVIEW PSYCHOBIOGENETICS: ADAPTED TOOLS FOR THE STUDY OF THE COUPLING BETWEEN BEHAVIORAL AND NEUROENDOCRINE TRAITS OF EMOTIONAL REACTIVITY. Vol. 19, *Pergamon Psychoneuroendocrinology*. 1994.

95. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Bevilacqua A, Renzi P, Mangia F. Anxiety-related behaviour in C57BL/6 ↔ BALB/c chimeric mice. *Behav Brain Res*. 2004 Apr 2;150(1–2):25–32.
96. Henderson ND, Turri MG, Defries JC, Flint J. QTL Analysis of Multiple Behavioral Measures of Anxiety in Mice. Vol. 34, *Behavior Genetics*. 2004.
97. Milner LC, Crabbe JC. Three murine anxiety models: Results from multiple inbred strain comparisons. *Genes, Brain Behav*. 2008 Jun;7(4):496–505.
98. Vicentini FA, Szamosi JC, Rossi L, Griffin L, Nieves K, Bihan D, et al. Colitis-associated microbiota drives changes in behaviour in male mice in the absence of inflammation. *Brain Behav Immun*. 2022 May 1;102:266–78.
99. Ronquillo J, Nguyen MT, Rothi LY, Bui-Tu TD, Yang J, Halladay LR. Nature and nurture: Comparing mouse behavior in classic versus revised anxiety-like and social behavioral assays in genetically or environmentally defined groups. *Genes, Brain Behav*. 2023 Dec 1;22(6).
100. Reichmann F, Hassan AM, Farzi A, Jain P, Schuligoi R, Holzer P. Dextran sulfate sodium-induced colitis alters stress-associated behaviour and neuropeptide gene expression in the amygdala-hippocampus network of mice. *Sci Rep*. 2015 Jun 12;5.
101. Haddad-Tóvulli R, Dragano NRV, Ramalho AFS, Velloso LA. Development and function of the blood-brain barrier in the context of metabolic control. Vol. 11, *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Research Foundation; 2017.
102. Vojdani A, Lambert J. The Role of Th17 in Neuroimmune Disorders: Target for CAM Therapy. Part I. Evidence-Based Complement Altern Med. 2011;2011:1–8.
103. Chen J, Liu X, Zhong Y. Interleukin-17A: The Key Cytokine in Neurodegenerative Diseases. Vol. 12, *Frontiers in Aging Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2020.
104. Jang HM, Kim JK, Joo MK, Shin YJ, Lee KE, Lee CK, et al. Enterococcus faecium and Pediococcus acidilactici deteriorate Enterobacteriaceae-induced depression and colitis in mice. *Sci Rep*. 2022 Dec 1;12(1).
105. Ma X, Kim JK, Shin YJ, Park HS, Lee DY, Yim SV, et al. Lipopolysaccharide-producing Veillonella infantium and Escherichia fergusonii cause vagus nerve-mediated cognitive impairment in mice. *Brain Behav Immun [Internet]*. 2024 May;118:136–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889159124002770>
106. Scardaci R, Bietto F, Racine PJ, Boukerb AM, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, et al. Norepinephrine and Serotonin Can Modulate the Behavior of the Probiotic Enterococcus faecium NCIMB10415 towards the Host: Is a Putative Surface Sensor Involved? *Microorganisms*. 2022 Mar 1;10(3).
107. Fliss I, Hammami R, Le Lay C. Biological control of human digestive microbiota using antimicrobial cultures and bacteriocins. *Prot Cult Antimicrob Metab Bacteriophages Food Beverage Biopreservation*. 2011 Jan 1;240–63.

APÊNDICE A - ARTIGO