

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

Alexandre Kleber Silveira

Os efeitos do tratamento com butirato e da terapia
com células tronco mesenquimais em modelos de
colite ulcerativa

Porto Alegre
2023

Alexandre Kleber Silveira

Os efeitos do tratamento com butirato e da terapia com células tronco mesenquimais em modelos de colite ulcerativa

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

Orientador: José Cláudio Fonseca Moreira

Porto Alegre 2023

CIP - Catalogação na Publicação

Kleber Silveira, Alexandre
Os efeitos do tratamento com butirato e da terapia
com células tronco mesenquimais em modelos de colite
ulcerativa / Alexandre Kleber Silveira. -- 2023.
102 f.
Orientador: José Claudio Fonseca Moreira.

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

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2.
Microbioma. 3. Butirato. 4. Neuroinflamação. I.
Fonseca Moreira, José Claudio, orient. II. Título.

Resumo

Doenças inflamatórias intestinais (DIIs) são caracterizadas por uma inflamação crônica do intestino, podendo progredir muitas vezes para um câncer intestinal. No Brasil houve um aumento de 14% ao ano na prevalência das DIIs no Brasil de 2012 até 2020, sendo um problema de saúde pública com alta relevância nacional. Apesar das causas ainda não estarem completamente esclarecidas, sabemos que a infiltração de células imunes é uma das principais causas de desconforto abdominal e dano intestinal. Até o momento, não existe cura para DIIs e o tratamento consiste na utilização de anti-inflamatórios, corticoides para tratar os sintomas associados à doença. Pacientes com DIIs apresentam um aumento da permeabilidade intestinal que permite que toxinas, metabólitos microbianos, bactérias e outras moléculas menores do lúmen intestinal entrem na circulação sanguínea. Existe uma grande similaridade na estrutura da barreira hematoencefálica (BHE) e da barreira intestinal ressaltando a importante comunicação do intestino-cérebro, já que nesses dois ambientes é necessário o controle fino da passagem de moléculas e íons. O butirato é um dos principais metabólitos microbianos do cólon e, por ser um ácido graxo de cadeia curta (SCFA), pode atravessar a BHE e afetar diretamente o sistema nervoso central. Possuímos receptores específicos para SCFA no intestino, onde essas moléculas promovem a regeneração tecidual e uma resposta anti-inflamatória, sendo um bom tratamento para os sintomas de Colite Ulcerativa (UC). A terapia com células tronco mesenquimais (MSC), também utilizada em modelos de DIIs, promove uma redução no infiltrado de células inflamatórias no intestino, além de melhora histológica e clínica. Apesar disso, ainda se sabe pouco sobre a intersecção entre a microbiota intestinal e a terapia com MSCs. A UC foi induzida em ratos e camundongos utilizando o DSS 2,5%~5% na água potável por 7 dias. Animais que receberam DSS apresentam um aumento de permeabilidade intestinal e um maior estresse oxidativo no intestino. O modelo de UC também causou neuroinflamação no córtex pré-frontal, além de gerar disbiose e perda de diversidade no microbioma intestinal. O tratamento com MSCs foi capaz de atenuar a perda de diversidade e melhorar a disbiose causada pela UC. No presente trabalho observamos que o tratamento com butirato protege o intestino do estresse oxidativo através da ativação de defesas enzimáticas de fase II, e evita a perda de proteínas de junção associadas com a integridade do epitélio. Como consequência, o tratamento com butirato também protege o CNS da neuroinflamação observada na UC, através de mecanismos antiinflamatórios e de regeneração da integridade da barreira intestinal.

Palavras-chave: Doenças Inflamatórias Intestinais; Microbioma; Butirato; Neuroinflamação.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBDs) are characterized by chronic inflammation gut, which can often progress to intestinal cancer. Although the causes are not yet completely understood, we know that immune cell infiltration is one of the main causes of abdominal discomfort and intestinal damage. We had a 14% increase per year in the prevalence of IBD in Brazil from 2012 to 2020, making it a public health problem with high national relevance. There is no cure for IBD, treatment consists of the use of anti-inflammatories, corticosteroids and injectable medications to treat the symptoms associated with the disease. Patients with IBDs experience increased intestinal permeability that allows toxins, microbial metabolites, bacteria, and other smaller molecules from the intestinal lumen to enter the blood circulation. There is a great similarity in the structure of the blood-brain barrier (BBB) and the intestinal barrier, highlighting the important gut-brain communication, since in these two environments fine control of the influx of molecules and ions is necessary. Butyrate is a short-chain fatty acid (SCFA) and one of the main microbial metabolites of the colon and can cross the BBB and directly affect the brain. We have specific receptors for SCFA in the intestine, where these molecules promote tissue regeneration and an anti-inflammatory response, being a good treatment for UC symptoms. Mesenchymal stem cell (MSC) therapy, also used in IBD models, promotes a reduction in inflammatory cell infiltrates in the intestine, in addition to histological and clinical improvement. Despite this, little is still known about the intersection between the intestinal microbiota and MSC therapy. We used DSS administered in water as a model of IBDs in the present work. We induced ulcerative colitis (UC) in mice and rats using 2.5%~5% DSS in drinking water for 7 days. Animals that received DSS show increased intestinal permeability and oxidative stress in the intestine. The UC model also causes neuroinflammation in the prefrontal cortex, in addition to generating dysbiosis and loss of diversity in the intestinal microbiome. Butyrate treatment protects the intestine from oxidative stress through the activation of phase II defenses and prevents the loss of junction proteins associated with the integrity of the epithelium. Therefore, butyrate treatment also protects the CNS from the neuroinflammation observed in UC, through anti-inflammatory mechanisms and regeneration of the integrity of the intestinal barrier. Treatment with MSCs can attenuate the loss of diversity and improving the dysbiosis caused by UC.

Keywords: Inflammatory Bowel Diseases; Microbiome; Butyrate; Neuroinflammation.

Sumário

1. Introdução	8
1.1 Caracterização das Doenças inflamatórias intestinais (DII)	8
1.2 Incidência, Prevalência e Tratamento de DII	8
1.3 Modelos de DII	9
1.3.1 Modelos Biológicos de DII:	9
1.3.2 Modelos químicos de indução de DII:	11
1.3.3 Escolha do modelo de DSS	13
1.4 A inflamação na colite ulcerativa	13
1.5 O estresse oxidativo nas Doenças Inflamatórias Intestinais	15
1.6 O microbioma nas doenças inflamatórias intestinais	16
1.6.1 Imuno nutrição e os ácidos graxos de cadeia curta	16
1.7 Colite, permeabilidade intestinal e Neuroinflamação	18
1.8 Terapia com Células Tronco Mesenquimais (MSCs) para Doenças Inflamatórias Intestinais	23
1.8.1 Utilização de Partículas de Membrana	24
2. Objetivos	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
Parte I	27
3. Artigo publicado na revista <i>Immunological Investigations</i>	27
4. Discussão	60
4.1 O tratamento com butirato atenua a severidade da UC	60
4.2 Estresse oxidativo e a regulação das enzimas antioxidantes na colite ulcerativa	60

4.3 HIF-1 α na colite ulcerativa	63
4.4 Neuroinflamação	65
4.5 RAGE e a Neuroinflamação	66
Parte II	68
5.1 Artigo em português a ser submetido	68
6. Materiais e Métodos	68
6.1 Desenho experimental:	68
6.2 Cultura Primária, Administração e Dose MSCs e PMs	69
6.3 Indução de colite	70
6.4 Avaliações Clínicas	70
6.5 Análise Histológica	71
6.6 Local, forma de confinamento e tratamento dos animais	71
6.7 Sequenciamento e Análises de Bioinformática	73
7. Resultados e Discussão	74
7.1 Cultura primária de MSCs	74
7.2 Ganho de Peso, DAI e Avaliação histológica do cólon	74
7.3 Citocinas Proinflamatórias	77
7.4 Sequenciamento do Microbioma	78
7.4.1 Riqueza e Diversidade do Microbioma Intestinal	78
8. Conclusões:	84
9. Perspectivas futuras	85
Anexo 1 – Figuras complementares	86
Anexo II – Outras publicações durante o período do doutorado como autor ou coautor	89
10. Referências	91

Lista de abreviaturas

DIIs – Doenças inflamatórias intestinais UC – Colite Ulcerativa
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa DSS – Dextran Sulfato de Sódio
BUT – Butirato de sódio IL-10 – Interleucina 10 IL-6 – Interleucina 6
IL-22 – Interleucina 22
SNC – Sistema Nervoso central BHE – Barreira Hemato encefálica
IL-1 β – Interleucina 1 beta
Nrf2 – Fator Nuclear Eritróide 2 Nf κ β – Fator Nuclear Kappa
K.O – Knock Out
MDR1 – Proteína de resistência à multidrogas 1 TNBS – Ácido trinitrobenzeno sulfônico
DAI – Score de severidade da doença
Keap1 – Proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch
NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina GSH – Glutathiona reduzida
ARES – elementos de resposta antioxidante SOD –Superóxido Dismutase
CAT – Enzima Catalase
GPx – Enzima Glutathiona Peroxidase
FFAR2 – Receptor de ácido graxo 2 FFAR3 – Receptor de ácido graxo 3 SCFA – Ácido Graxo de cadeia curta
Hif-1 α – Fator induzível por hipóxia 1 alfa I γ – Interferon Gamma
MAPK – Proteína-quinases ativadas por mitógenos JAK – Quinase Janus
STAT – Família de Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
NLPR3 – Inflamossomo NLPR3
IBA-1 - Molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada 1
MSCs – Células Tronco Mesenquimais
PMs – Partículas de Membrana

1. Introdução

1.1 Caracterização das Doenças inflamatórias intestinais (DIIs):

Doenças inflamatórias intestinais são caracterizadas por uma inflamação crônica do intestino, podendo progredir muitas vezes para um câncer intestinal. Existe uma predisposição genética a esse tipo de doença, entretanto fatores ambientais podem ser responsáveis pelo agravamento das condições intestinais dos pacientes ([Gajendran et al. 2019](#)). Apesar das causas ainda não estarem completamente esclarecidas, sabemos que a infiltração de células imunes causada por um desequilíbrio da resposta imune do hospedeiro é uma das principais causas de desconforto abdominal e dano intestinal. Entre estas doenças temos a doença de Chron, que é caracterizada por uma inflamação que pode ocorrer em qualquer porção do intestino, e a Colite Ulcerativa que é caracterizada pela inflamação da mucosa do cólon.

A etiologia das doenças inflamatórias intestinais ainda permanece dúbia, visto que a manifestação da doença pode ocorrer de diversas formas e depende de fatores geográficos e culturais ([GBD 2017 Inflammatory Bowel Disease Collaborators 2020](#)).

1.2 Incidência, Prevalência e Tratamento de DIIs:

Segundo dados do DataSUS publicados pela Sociedade Brasileira de Coloproctologia (SBCP), a incidência de DIIs no Brasil é de aproximadamente 10 casos a cada 100.000 habitantes. Já a prevalência da doença é de aproximadamente 100 casos para cada 100.000 habitantes. Essa prevalência apresentou um aumento de 14% ao ano se analisarmos os dados de 2012 até 2020 ([Quaresma et al. 2022](#)). Esse aumento na prevalência reforça a necessidade de tratamento efetivo, já que em muitos casos os pacientes são acompanhados pela doença por toda vida. Em alguns países, como é o caso dos Estados Unidos da América, temos a prevalência de aproximadamente 1% da população com algum tipo de doença inflamatória intestinal ([Ng et al. 2017](#)). Apesar da etiologia ainda não

ser totalmente conhecida, o aumento na prevalência da doença é visível, mesmo em países que possuem um sistema de saúde robusto. Esse crescente nos casos de DIIs muito provavelmente está correlacionado à problemas de maturação do sistema imune durante o desenvolvimento do indivíduo.

Em 2017 tivemos entre 6 e 8 milhões de casos diagnosticados de DIIs no mundo. A incidência de DIIs aumentou de 79,5 para 84,3 casos a cada 100.000 habitantes no mundo. O auge da ocorrência de DIIs acontece geralmente entre 20 e 40 anos de idade e tem um grande impacto na funcionalidade do ser humano. Por ser uma doença crônica, muitas vezes os pacientes são acometidos por várias crises ao longo dos anos, tendo um profundo impacto nos gastos de saúde pública.

No Brasil, pesquisadores e profissionais da área propuseram a criação do mês de conscientização das doenças inflamatórias intestinais. A campanha ficou conhecida como MAIO ROXO, onde nesse mês, profissionais propõe o debate e a conscientização da comunidade sobre os problemas acarretados pelas doenças inflamatórias intestinais. O mês foi escolhido em referência à data 19 de maio, tido como o dia mundial das doenças inflamatórias intestinais. (<https://www.abcd.org.br/maioroxo/>) e (<https://worldibdday.org/>).

Não existe cura para DIIs, o tratamento consiste em atenuar o problema inflamatório através de anti-inflamatórios tópicos, corticoides e medicamentos injetáveis. Uma das únicas alternativas é tratar os sintomas associados à doença e trabalhar com uma possível remissão através de mudanças de hábitos que causam um aumento da inflamação intestinal, como por exemplo o tabagismo, que está associado à uma maior incidência de DIIs.

1.3 Modelos de Doenças Inflamatórias Intestinais:

As DIIs apresentam uma grande variedade de sintomas e, por ser uma doença de etiologia mista e com uma grande diversidade entre os quadros clínicos, modelos animais que mimetizam a doença devem ser estudados de acordo com as suas limitações.

1.3.1 Modelos Biológicos de DIIs:

Infecção por bactérias patogênicas

Dentre os modelos biológicos de DIIs, podemos citar aqueles que utilizam uma infecção por microrganismos como modelo de UC. Um desses modelos é a infecção por *Clostridium difficile*, que é a principal bactéria causadora de colite pseudomembranosa ([Saavedra et al. 2018](#)). Embora modelos de infecção bacteriana sejam úteis para observarmos as reações no intestino a partir de um estímulo microbiano, geralmente é necessário fazer o uso de antibióticos previamente para que a colonização da bactéria alvo aconteça de forma adequada.

Animais Knock Out (K.O) e Linhagens Espontâneas de DIIs

Modelos utilizando animais K.O também são utilizados para estudarmos a UC. Um dos modelos utilizados é com animais KO para IL 10 (IL 10 -/-), o que impede que as células T regulatórias secretem IL-10, causando uma falha na resposta anti-inflamatória do intestino. Essa falha na secreção de IL-10 faz com que esses animais desenvolvam espontaneamente inflamação intestinal, semelhante à UC ([Kühn et al. 1993](#)).

Animais K.O para o gene que codifica a proteína de resistência à multidrogas 1 (MDR1) também já foi descrito como um modelo de UC ([Wilk et al. 2005](#)). A proteína MDR1 atua como transportador de xenobióticos para fora da célula, sendo especialmente importante na regulação intestinal, exportando moléculas de volta para o lúmen do intestino e diminuindo a absorção de moléculas potencialmente patogênicas ou xenobióticos em geral ([Yu et al. 2017](#)). MDR1 também é um transportador de bilirrubina, com uma afinidade pelo substrato 22 vezes maior que os outros transportadores. Essa proteína é utilizada para secretar a bilirrubina do SNC para a circulação. Estudos mostram que 25% dos animais K.O para MDRP1 desenvolvem espontaneamente UC em algum momento da vida ([Resta-Lenert et al. 2005](#)). Isso se deve à importância dessa proteína na formação da barreira epitelial

do intestino, esses estudos demonstraram que esses animais que não possuem essa proteína são mais suscetíveis à desenvolver colite por infecção de *Helicobacter* e possuem uma diminuição nas proteínas de junção no intestino ([Resta-Lenert et al. 2005](#)).

Animais K.O para o gene Muc2, responsável pela produção de muco pelas células de goblet do intestino, também é um modelo espontâneo de UC ([Johansson et al. 2014](#)). A produção de muco no intestino é importante para a proteção contra patógenos e toxinas presentes no lúmen intestinal. Essa proteção é extremamente relevante no colón, onde temos uma grande carga bacteriana, que quando desregulada pode causar inflamação do epitélio. Em pessoas saudáveis, o muco intestinal é impenetrável por bactérias, mas em pacientes com UC observamos uma diminuição da camada de muco, permitindo o aporte de microrganismos e moléculas derivadas do lúmen na circulação ([Johansson et al. 2014](#)).

1.3.2 Modelos químicos de indução de DIIs:

Ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS)

O modelo com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) age com um agente haptogenico que quando administrado por via retal causa uma resposta imunogênica na parede do colón. O veículo utilizado para a administração de TNBS é o etanol, que causa um rompimento da barreira intestinal e promove a interação do TNBS com células do sistema imune ([Ikeda et al. 2008](#)). Após a administração de TNBS, células T CD4+ são recrutadas para tecido intestinal e promovem uma resposta inflamatória semelhante ao quadro de doenças inflamatórias intestinais. Por ser um modelo com forte mecanismo imune, o TNBS é utilizado tanto para modelo de doença de Chron quanto para UC ([Antoniou et al. 2016](#)).

Oxalozona

O composto Oxalozona (4-etoximetileno-2-fenil-2-oxazolin-5-ona) também é utilizado em modelos de DIIs. Administração por via retal desse agente haptinizante causa uma inflamação aguda da porção distal do colón, gerando uma resposta imune exacerbada, que ocorre principalmente pela ação de linfócitos NKT (T-NK) ([Heller et al. 2002](#)). Apesar de ser um agente haptinizante como o TNBS, o modelo de oxalozona apresenta diferenças no mecanismo de ação, visto que é observado uma grande produção de Interleucina 13 (IL-13) pelas células T oriundas da lâmina própria. Esse grupo de células geralmente responde com a secreção de Inteferon gama (Ifn- γ) ao invés de IL-13. Essas células T-NK são ativadas pelo dano nas epitelial intestinal causado pela oxalozona, onde as células T-NK vão exercer o seu efeito citotóxico nas células afetadas ([Heller et al. 2002](#)).

Dextran Sulfato de Sódio (DSS)

O modelo de DSS é focado no dano epitelial que ocorre e mimetiza bem a inflamação do cólon, já que as moléculas de DSS vão se ligar aos colonócitos, rompendo sua membrana e gerando uma resposta inflamatória e imune. O dano epitelial e o conseqüente aumento de permeabilidade intestinal observado no modelo de DSS é um dos que mais se assemelha aos casos de UC ([Randhawa et al. 2014](#)). Estudos utilizando DSS são úteis para avaliarmos tratamentos e mecanismos de ação que estão intimamente relacionados com o funcionamento da barreira intestinal ([Kiesler et al. 2015](#)).

Existem também outros modelos mais gerais de indução de dano intestinal que podem se assemelhar com a UC, como a injeção retal de ácido acético que causa uma inflamação intestinal e um aumento no estresse oxidativo do intestino ([Cetinkaya et al. 2005](#)).

1.3.3 Escolha do modelo de DSS:

O modelo de DSS possui como principal mecanismo de ação o dano epitelial, aumentando a permeabilidade intestinal e se assemelhando à inflamação observada durante um período de crise em pacientes com UC. O modelo de DSS também apresenta vantagem pela simplicidade na administração do agente químico, aumentando a reprodutibilidade dos experimentos. Desta maneira, este modelo foi escolhido para o desenvolvimento do presente trabalho.

1.4 A inflamação na colite ulcerativa:

A UC é caracterizada por um pico de inflamação intestinal na porção do cólon que acarreta dores abdominais, diarreia e hematoquezia ([Kobayashi et al. 2020](#)). Pacientes afetados por DIIs apresentam um quadro de reincidência da doença ao longo da vida, sendo marcados por períodos de maior ou menor inflamação, porém sem a remissão completa dos sintomas. A severidade e extensão da UC devem ser avaliadas através de diferentes testes, dentre eles podemos destacar as avaliações histopatológicas ([Patil et al. 2016](#)), que utilizam os parâmetros:

- A) Inflamação do tecido.
- B) Profundidade da inflamação.
- C) Regeneração do tecido.
- D) Dano às criptas intestinais.

Essa união de avaliações histológicas, junto com o score de severidade da doença (DAI) nos ajudam a identificar a severidade do quadro e os possíveis efeitos terapêuticos dos tratamentos ([Dignass et al. 2015](#)). O dano ao tecido está intimamente relacionado com a infiltração de células do sistema imune, principalmente pelo efeito inflamatório causado por essa infiltração ([Patil et al. 2016](#)). A secreção de citocinas pro inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), está diretamente relacionada com a severidade da doença. Estudos

anteriores visando bloquear a inflamação com anticorpos anti-TNF- α se mostraram promissores para o tratamento de UC ([Colombel et al. 2011](#)). A diminuição do estado inflamatório contínuo através da dieta é uma estratégia já utilizada em doenças como obesidade e síndrome metabólica. Sabemos da importância da imunoregulação através da alimentação, principalmente através da modulação da microbiota intestinal. ([Ordás et al. 2012](#))

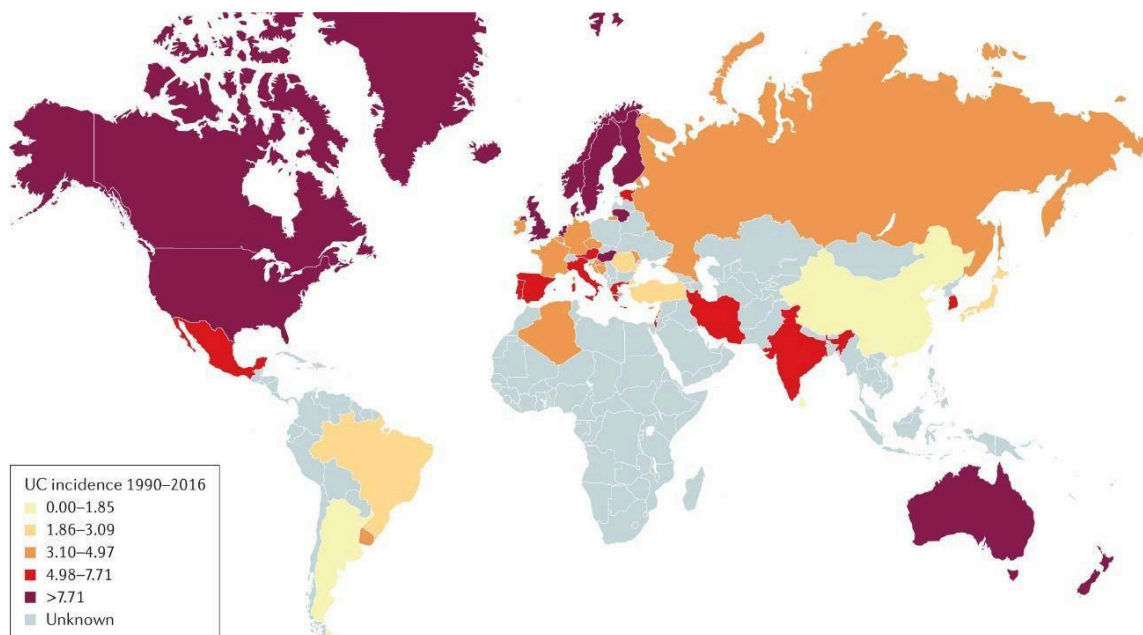


Figura 1: Incidência de colite ulcerativa no mundo em 2016.
Retirado de: **Ulcerative colitis** - ([Kobayashi et al. 2020](#)).

1.5 O estresse oxidativo nas Doenças Inflamatórias Intestinais:

Estresse oxidativo é caracterizado pelo dano excessivo às biomoléculas pela oxidação de radicais livres. A maior fonte de radicais livres endógenos é cadeia transportadora de elétrons, onde intermediários podem escapar dos complexos da mitocôndria, oxidando moléculas adjacentes e causando na maioria das vezes a sua inativação (Halliwell & Gutteridge 2015).

O aumento do dano por estresse oxidativo também está associado a hábitos de vida e fatores ambientais. Tabagismo, poluentes atmosféricos e dieta ocidental tem sido correlacionado com um aumento nos níveis de estresse oxidativo. O correto funcionamento do sistema antioxidante é essencial para controlar a oxidação de biomoléculas e manter esses níveis de estresse oxidativo baixos. (Halliwell & Gutteridge 2015).

O balanço redox requer uma fina regulação entre a presença de intermediários reduzidos, defesas antioxidantes e produção de radicais livres pelo metabolismo. Ao longo da evolução os organismos precisaram desenvolver ferramentas capazes de reconhecer esse desbalanço redox. O fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) é um fator de transcrição ativado pelo aumento de espécies reativas dentro da célula. Ele atua como um sensor de estresse oxidativo, regulando diversos genes relacionados com a resposta antioxidante, com destaque para as rotas de recuperação dos intermediários reduzidos: glutathiona reduzida (GSH) e o fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH). Tanto a Glutathiona quanto o NADPH são utilizados como doadores de elétrons na reação de neutralização de radicais livres pelas enzimas antioxidantes (Halliwell & Gutteridge 2015). A relação entre esses intermediários também é importante, visto que o NADPH é utilizado como doador de elétrons para a recuperação de GSH pela Glutathiona Redutase (Lu 2013).

O Nrf2 fica preso à um complexo com duas proteínas chamadas de Proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch (Keap1) (Itoh et al. 1999). O complexo proteico fica localizado no citosol da célula até sofrer oxidação por um agente estressor. Após a sinalização oxidativa, esse complexo proteico é rapidamente degradado e permite a translocação do fator de transcrição até o núcleo, onde pode exercer o seu papel. O Nrf2, quando translocado, se liga à elementos de resposta antioxidante (AREs do inglês) nas regiões promotoras responsáveis pela proteção antioxidante da célula.

A maior parte dos ativadores de Nrf2, endógenos e exógenos, são moléculas eletrofílicas capazes de oxidar diferentes resíduos de cisteína na estrutura da Keap1, levando a sua inativação (Hayes and Dinkova-Kostova 2014).

As defesas contra o estresse oxidativo são baseadas principalmente na atuação de enzimas antioxidantes que vão atuar na neutralização de radicais livres, assim como na recuperação de biomoléculas oxidadas. Dentre as enzimas antioxidantes envolvidas na defesa, podemos citar a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT) e a Glutathione peroxidase (GPx).

Trabalhos recentes têm demonstrado a importância do estresse oxidativo em DIIs, a ativação do fator de transcrição Nrf2 é uma clássica via de resposta ao estresse. No quadro de UC ele possui um papel ainda mais relevante, sendo um fator essencial ao iniciar a resposta inflamatória que precede a UC ([Piotrowska et al. 2021](#)). Também temos a participação na ativação de defesas de fase II, que serão necessárias para atenuar o estresse oxidativo observado na UC ([Forman and Zhang 2021](#)).

1.6 O microbioma nas doenças inflamatórias intestinais:

1.6.1 Imuno nutrição e os ácidos graxos de cadeia curta:

Recentemente foi observado que pacientes com DII apresentam mudanças específicas na composição das comunidades de bactérias intestinais. Espécies bacterianas do trato gastrointestinal podem promover respostas pró ou anti-inflamatórias ([Maslowski et al. 2009](#)) essenciais na atenuação ou agravamento desse quadro clínico. DII estão relacionadas à integridade do epitélio gastrointestinal e à resposta imune e inflamatória nesses órgãos.

O microbioma intestinal é conhecido por exercer um importante efeito estimulador sobre a integridade intestinal e as respostas imunes locais sendo que a recuperação da integridade intestinal é comprometida em camundongos com o microbioma alterado ([Mar et al. 2014](#)). O transplante de microbiota intestinal, obtida de doadores saudáveis, aparenta ser um tratamento promissor para DII ([Wang et al. 2018](#))

A imunonutrição (Fig 2) é uma estratégia que pode ser utilizada para a diminuição da reincidência ou da severidade da doença ([Celiberto et al. 2018](#)). Podemos destacar principalmente alimentos que a longo prazo vão diminuir os níveis inflamatórios do hospedeiro, principalmente através da modulação do microbioma intestinal. Dentre eles podemos destacar a administração de probióticos e prébióticos que favorecem a produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) pelo microbioma do paciente, principalmente o Butirato de sódio.

São considerados SCFA todos os ácidos graxos com menos de 6 carbonos. Os três principais são Acetato, Propionato e Butirato. O termo butirato é oriundo da palavra grega βουτυρος, que significa manteiga. A manteiga e o leite apresentam um cheiro rançoso e azedo após sua degradação e as bactérias produtoras de butirato são responsáveis em parte por esse aroma de ranço dos alimentos lácteos. ([Stilling et al. 2016](#)).

Nossa principal fonte de ácidos graxos exógenos é a dieta. A fermentação bacteriana de fibras não absorvíveis tem como um dos subprodutos os SCFA. O aumento no interesse da pesquisa com SCFA se deu pela descoberta de receptores específicos, chamados de receptores de ácidos graxos livres 2 e 3 (FFAR2 e FFAR3) que estão presentes em diversas células, incluindo células enteroendócrinas e imunes ([Le Poul et al. 2003](#)). A presença de receptores específicos para metabólitos advindos de bactérias não patogênicas mudou a forma de enxergarmos a relação microbioma-hospedeiro. Esses receptores estão distribuídos muito além do intestino e das células imunes associadas à ele, estando presentes em todo o corpo. O pâncreas e o fígado apresentam uma grande quantidade de receptores FFAR, e alguns autores acreditam que isso ocorre devido a proximidade destes órgãos com os metabólitos do microbioma intestinal. Estudos anteriores demonstraram que o microbioma de pacientes com colite ulcerativa apresenta diminuição na abundância de organismos que produzem SCFA, importantes no efeito imunomodulador em modelos animais ([Zhang et al. 2022](#)).

Os efeitos sistêmicos que ocorrem após a ativação desses receptores reforçam a ideia de que o hospedeiro cria uma rede de sinais com os microrganismos que o habitam, havendo intensa comunicação nos dois sentidos.

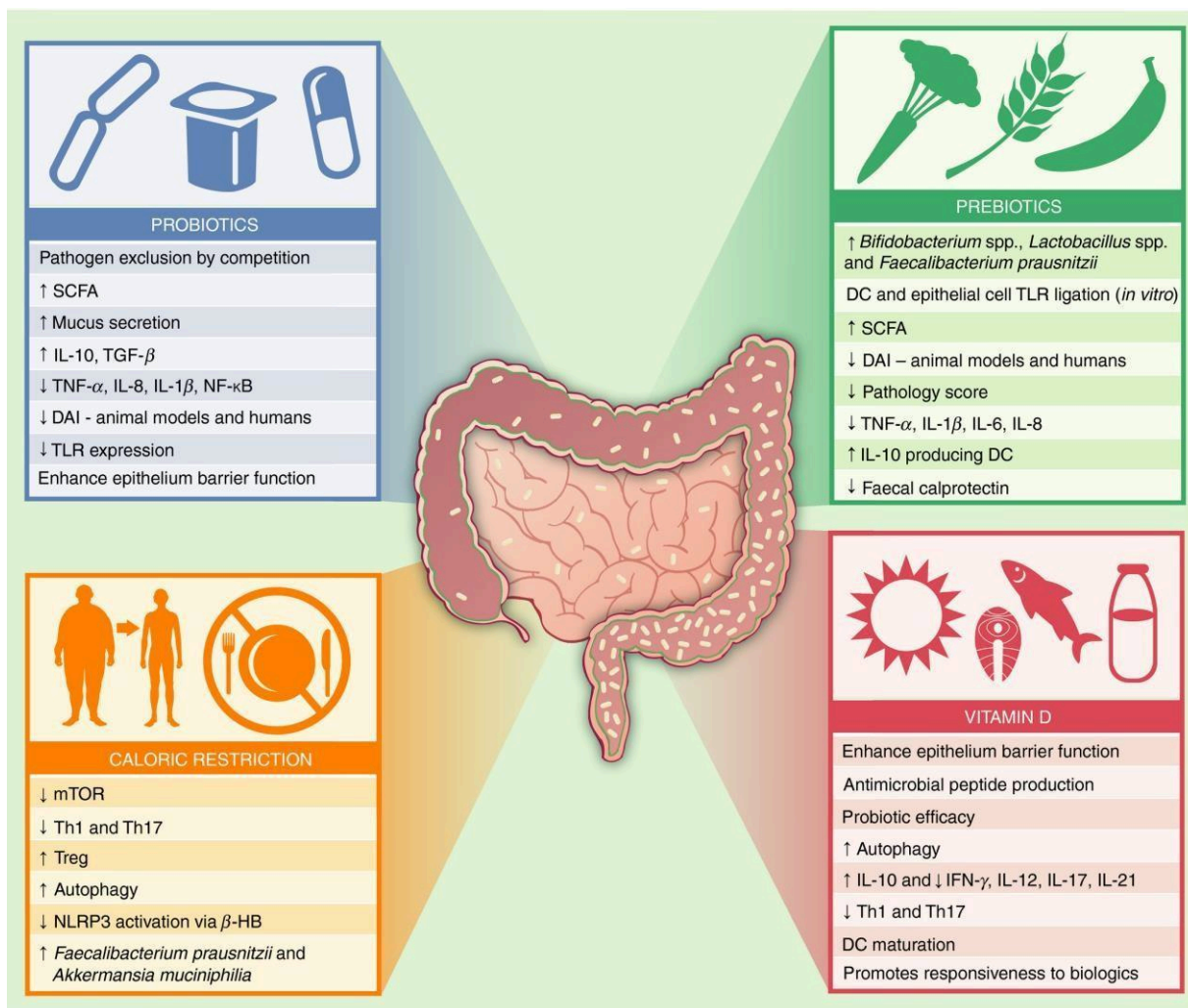


Figura 2. Estratégias de Imunonutrição – retirado de [\(Celiberto et al. 2018\)](#).

1.7 Colite, permeabilidade intestinal e Neuroinflamação:

A conexão entre o sistema nervoso e o digestório vem ganhando muita importância nas pesquisas recentes, uma vez que a regulação do eixo intestino cérebro está relacionada com a progressão e incidência doenças. O próprio sistema nervoso entérico é composto por aproximadamente 100 milhões de neurônios [\(Gershon 1999\)](#), além das diversas outras células secretórias e imunes que são responsáveis pela regulação da homeostase intestinal. O termo “segundo cérebro” é utilizado para descrever o intestino pela similaridade na regulação desses dois órgãos, que compartilham características estruturais e fisiológicas. Esse termo

apesar de ter sido cunhado a mais de 20 anos atrás ganhou importância com o aumento dos estudos de microbiota intestinal e do eixo intestino cérebro ([Gershon 1999](#)).

Anos atrás, acreditávamos que o cérebro se comunicava apenas de maneira endócrina com o intestino, e de maneira unidirecional, através da secreção de hormônios como a colecistocinina e Peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1). Hoje em dia sabemos que uma atuação exclusivamente endócrina não explica a velocidade da comunicação intestino-cérebro. Estudos recentes de optogenética mostraram que a ativação de células enteroendócrinas provoca a excitação de neurônios nodosos localizados na parte inferior do nervo vago ([Kaelberer et al. 2018](#)). Essa ativação neuronal acontece em milissegundos, o que seria incompatível com uma ativação apenas endócrina. Sabemos hoje também que essa troca acontece de forma bidirecional, já que o intestino é capaz de modular as funções cerebrais. Essa modulação se dá de diversas formas, mas podemos citar principalmente a atuação de moléculas derivadas do microbioma intestinal. Alguns microrganismos, através do seu metabolismo, conseguem produzir moléculas que possuem uma atuação direta nas células do intestino ([Kim 2018](#)). Os SFCA são um ótimo exemplo disso, já que através da fermentação incompleta de fibras temos a produção de moléculas que são reconhecidas pelo hospedeiro. O reconhecimento de ácidos graxos de cadeia curta pelo intestino se dá através de receptores específicos localizados no epitélio intestinal, que são capazes de modular os níveis inflamatórios do hospedeiro ([Sivaprakasam et al. 2016](#)).

1.7.1 Leaky gut e Leaky Brain:

O termo leaky gut é utilizado para retratarmos os problemas causados pelo aumento excessivo da permeabilidade intestinal. Esse aumento de permeabilidade permite que toxinas, metabólitos microbianos, bactérias e outras moléculas menores do lúmen intestinal entrem na circulação sanguínea, causando aumento na inflamação e desencadeando uma resposta imune no hospedeiro. Esse aumento de permeabilidade acontece conforme envelhecemos ([Wilson et al. 2018](#)) ou nos alimentamos, mas também pode ser desencadeado por doenças inflamatórias intestinais ([Johansson et al. 2014](#)).

Sabemos que o aumento no aporte de moléculas do lúmen afeta os órgãos associados com a digestão, como fígado, rins e intestino, mas também afeta o SNC. O *cross-talk* entre o intestino e o cérebro vem ganhando importância, já que acreditamos que muitas doenças observadas no SNC possuem seu início no intestino. Um exemplo disso é a doença de Parkinson, que é causada pelo acúmulo de α -sinucleína no cérebro e trabalhos anteriores já demonstraram que a α -sinucleína é capaz de entrar pelo intestino e se locomover pelo nervo vago até atingir o SNC. O microbioma intestinal é responsável por regular a entrada de α -sinucleína ([Sampson et al. 2016](#)).

A estrutura da barreira hemato encefálica (BHE) é uma rede difusa de capilares que impede a entrada de bactérias e moléculas maiores no SNC. A barreira é formada por diferentes tipos celulares, como a porção terminal de astrócitos, células endoteliais e pericitos, além de proteínas de junção e oclusão que mantêm a barreira pouco permeável ([Ballabh et al. 2004](#)). Existe uma grande similaridade na estrutura da BHE e da barreira intestinal (Figura 3), as proteínas de junção e oclusão presentes entre as células das duas barreiras são principalmente claudinas, ocludinas e caderinas ([Daneman and Rescigno 2009](#)). Essa semelhança entre as barreiras ressalta ainda mais a importante comunicação do intestino-cérebro, já que nesses dois ambientes é necessário o controle fino da passagem de moléculas e íons. A formação dessas duas barreiras é diretamente afetada pelo microbioma desde o período embrionário, e a regulação nessa fase afeta a estrutura do SNC ([Scalise et al. 2021](#)).

Quando observamos o *leaky gut* ocorrendo, temos também o fenômeno *leaky brain* ([Obrenovich 2018](#)), que seria o efeito decorrente da entrada de moléculas e toxinas do lúmen na circulação sanguínea. Essas moléculas vão desencadear uma resposta imune e inflamatória que afeta também a permeabilidade da BHE ([Liang et al. 2018](#)). Sabemos que em situações de inflamação aumentada e contínua temos um aumento de permeabilidade da BHE, permitindo uma maior entrada de íons, toxinas e moléculas no SNC. Estudos com doenças do espectro autista mostram que esses pacientes possuem um aumento na permeabilidade intestinal e na BHE ([Fiorentino et al. 2016](#)). Esse aumento de permeabilidade de barreiras pode ser um dos motivos pelo qual pacientes autistas apresentam uma arquitetura cerebral diferente, além de uma microglia mais ativada. Alguns autores defendem que os

pacientes autistas apresentam uma neuroinflamação que começa nos primeiros anos de vida e afeta a formação do SNC. Essa neuroinflamação estaria diretamente relacionada com um aumento da permeabilidade intestinal. Muitos estudos já relataram que a severidade dos sintomas cognitivos e sociais está diretamente relacionada com a severidade dos problemas intestinais, que também são observados em pacientes autistas ([Kang et al. 2019](#)).

Nas DIIs também temos os sintomas relacionados com o SNC. Pacientes com DIIs apresentam uma maior incidência de depressão e ansiedade que a população geral ([Byrne et al. 2017](#)). Trabalhos recentes sugerem a neuroinflamação como o gatilho para desenvolver depressão em pacientes com DIIs ([Craig et al. 2022](#)). Em síntese, diversas doenças que eram tidas como exclusivas do SNC apresentam sintomas e comorbidades relacionados com o trato gastrointestinal. Esses efeitos não acontecem por acaso, por isso acreditamos na importância de estudar esses dois sistemas com uma perspectiva integrada.

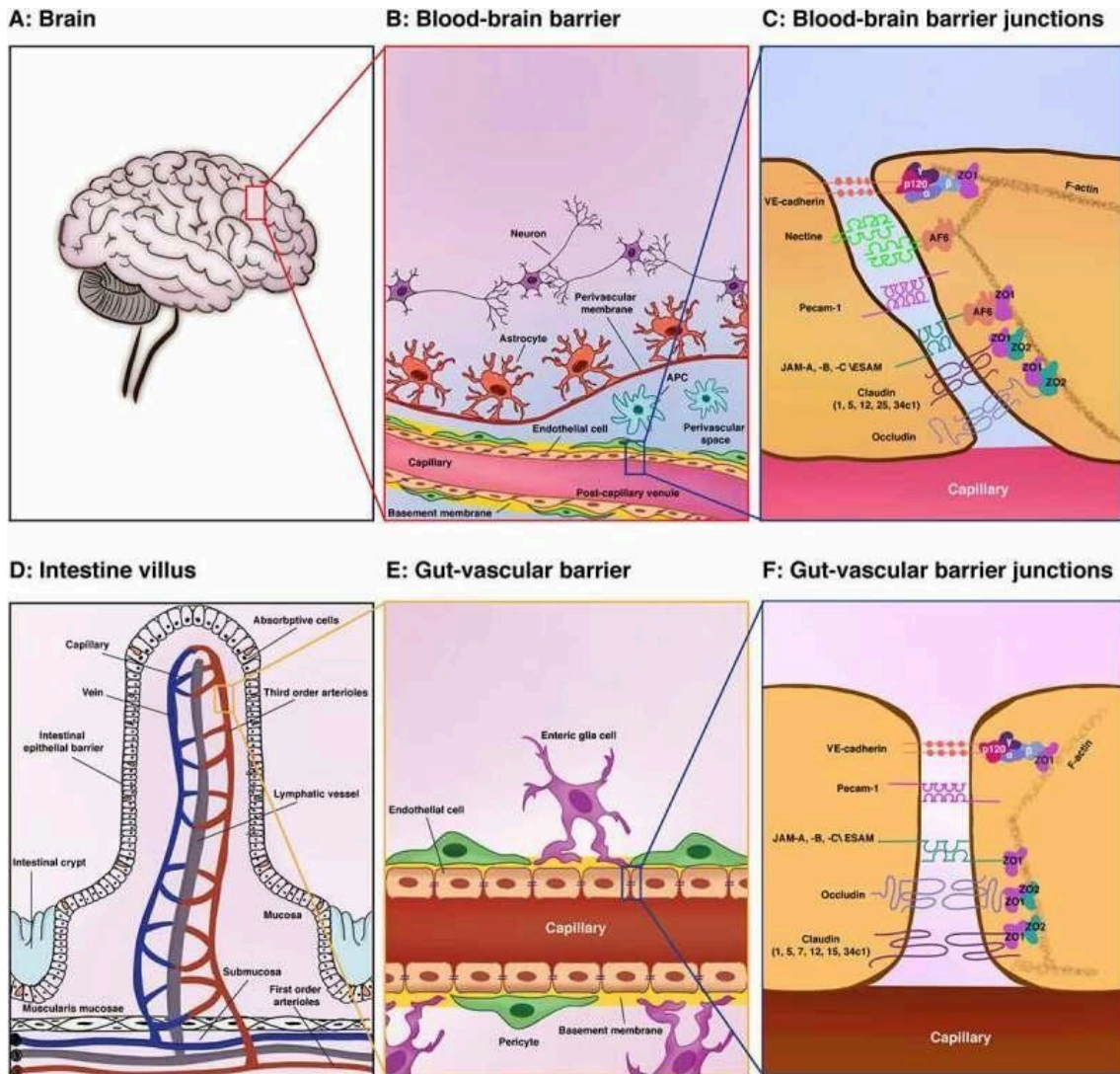


Figura 3: A similaridade da Barreira Intestinal e da Barreira Hemato Encefálica (BHE). Retirado com texto adaptado de (Scalise et al. 2021). A. Diagrama do cérebro.

B. Representação esquemática dos componentes da unidade neurovascular mostrando os capilares cerebrais e as vênulas pós-capilares. A figura mostra a interação da BHE, formada por células endoteliais que interagem com a lamina basal, a porção terminal de astrócitos, perócitos e células apresentadoras de antígeno (APC, na figura). C. Representação da área de junção das células endoteliais cerebrais, contendo claudinas, ocludinas, caderinas e outras proteínas responsáveis pela integridade da BHE.

D. Representação esquemática de uma vilosidade intestinal e sua vascularização, com indicação da barreira epitelial e endotelial. E. Representação esquemática dos componentes da unidade vascular intestinal no nível dos capilares, mostrando as células endoteliais, pericitos e células gliais entéricas. F. Representação da área de junção das células endoteliais da barreira intestinal. É possível observar a similaridade com a composição da BHE na figura C, apesar de apresentarem uma diferença na composição de proteínas.

1.8 Terapia com Células Tronco Mesenquimais (MSCs) para Doenças Inflamatórias Intestinais:

A terapia com células tronco mesenquimais (MSC) tem se mostrado um promissor tratamento para DIIs ([Aubin et al. 2022](#)). Sabemos também que modelos animais de colite induzida tratados com terapia celular apresentam redução no infiltrado de células inflamatórias no intestino, além de melhora histológica e clínica ([da Costa Gonçalves et al. 2017](#)). Apesar disso ainda se sabe pouco sobre a interação entre a microbiota intestinal e a terapia com MSCs.

O recrutamento de MSCs para o intestino é pouco eficiente após a administração intravenosa (i.v), o que faz com que acreditemos que o mecanismo de ação das MSCs seja via modulação imune (Sala et al., 2015). Entretanto, também é sugerido que as MSC tenham um efeito estimulador sobre o epitélio intestinal, incluindo estimulação da proliferação de células-tronco intestinais o que foi observado em modelos de lesão gastrointestinal (Gong et al., 2016; Semont et al. 2013). As MSCs também suprimem as respostas Th17, aumentam a relação Treg: Th17 e levam à diminuição de células T efetoras ([Gong et al. 2016](#)).

Além disso, a estimulação da regeneração epitelial pode ser tão importante para a cura quanto a supressão da inflamação. Nesse sentido foi observado o aumento significativo no número de células-tronco intestinais (Lgr5⁺) no intestino de camundongos com colite tratados por terapia celular. Acredita-se que o secretoma de MSC ative a via de sinalização Wnt / β -catenina e estimula a proliferação de Lgr5⁺. Além disso citocinas inflamatórias reduzidas podem melhorar a auto renovação ou interferir na taxa apoptótica de células Lgr5⁺. Portanto, a supressão da inflamação e a estimulação da proliferação local de células-tronco por MSCs possivelmente atuam em conjunto. Bactérias comensais filamentosas segmentadas também demonstraram induzir a proliferação de células Th17 enquanto bactérias do gênero *Clostridium* promovem a proliferação de células T regulatórias demonstrando, portanto, o importante efeito do microbioma para a manutenção da homeostase. Essa informação é especialmente relevante, uma vez que pacientes humanos e modelos murinos de UC apresentam reduções significativas na diversidade da

microbiota gastrointestinal necessária para manutenção da homeostase imune. (Wang et al. 2019).

Apesar de promissora, a terapia com MSCs apresenta algumas limitações. Um dos principais problemas é que parte das células fica aprisionada no pulmão, pouco tempo após a administração intravenosa. Esse fenômeno ocorre devido à rede de capilares pulmonares, que aprisiona as células devido ao seu diâmetro (<20 μm), maior dos microcapilares pulmonares. Aproximadamente 90% das MSCs ficam aprisionadas no pulmão em 24h (Figura 4).

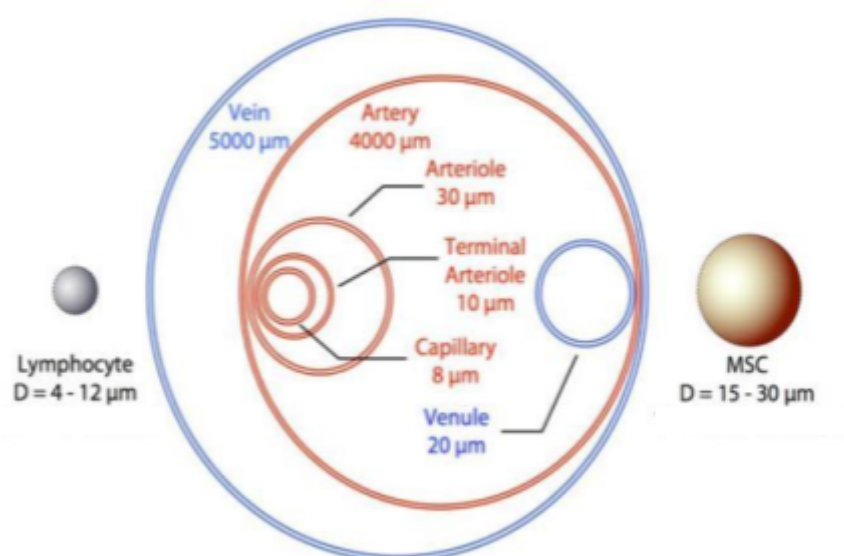


Figura 4. Barreiras mecânicas e dimensão das MSCs comparadas aos vasos sanguíneos e capilares. Adaptado de (Krueger et al. 2018)

1.8.1 Utilização de Partículas de Membrana:

Estudos prévios demonstram que é possível utilizar partículas fracionadas da membrana celular de MSCs no tratamento, sendo essas partículas reconhecidas por células do sistema imune, e ativando a resposta antiinflamatória em células periféricas do sangue (da Costa Gonçalves et al. 2021). Estudos prévios também demonstraram que MSCs apresentam uma capacidade imunomodulatória independente do seu secretoma. MSCs inativadas por calor ainda apresentam

potencial imunomodulatório. Parte do potencial terapêutico de MSCs vem do seu reconhecimento de membrana por monócitos, o que induz a resposta antiinflamatória. Posto isso, é possível utilizar apenas a membrana externa de MSCs para obter seu efeito indutor de monócitos (Luk et al. 2016).

Sabemos que o tratamento com MSCs melhora anormalidades clínicas e imunológicas em DIIs. Apesar das evidências da eficácia da terapia celular para DIIs, nossa compreensão dos seus mecanismos incompleta.

As causas no aumento da incidência de doenças inflamatórias intestinais ainda não são claras, porém, é possível observar uma forte correlação da microbiota intestinal com DIIs, assim como parâmetros inflamatórios e imunes (Sheehan et al. 2015) . Se faz necessário o estudo dos efeitos da terapia celular na microbiota intestinal em indivíduos acometidos de DIIs, assim como o efeito possivelmente equivalente das partículas de membrana das MSCs.

2. Objetivos:

2.1 Objetivo geral:

2.2

Avaliar os efeitos da administração do ácido graxo de cadeia curta Butirato de sódio assim como o tratamento com MSC e Partículas de membrana (PMs) na colite ulcerativa em camundongos e ratos.

2.3 Objetivos específicos:

Avaliar os efeitos da UC pelo modelo de DSS na neuroinflamação

Avaliar como a indução de UC por modelo de DSS altera o balanço redox no intestino.

Avaliar aumento alterações na permeabilidade intestinal e no Sistema nervos central causado pelo modelo de UC utilizando DSS.

Avaliar os possíveis efeitos atenuantes de um tratamento Butirato de sódio sobre os parâmetros observados em modelo de UC induzido pod DSS.

Avaliar os efeitos do tratamento com MSCs assim como de suas PMs na severidade da UC.

Avaliar as alterações do Microbioma intestinal dos animais submetidos ao modelo de DSS assim como os efeitos do tratamento com MSCs e PMs.

Parte I

3. Artigo publicado na revista *Immunological Investigations*:

A. K. SILVEIRA ET AL.

IMMUNOLOGICAL INVESTIGATIONS

Sodium Butyrate Protects Against Intestinal Oxidative Damage and Neuroinflammation in the Prefrontal Cortex of Ulcerative Colitis Mice Model

Alexandre Kleber Silveira^a, Henrique Mautone Gomes^a, Nicole Thais. Fröhlich^a, Luana Possa^a, Lucas Santos^a, Flávio Kessler^a, Alberto Martins^a, Matheus Scarpatto Rodrigues^a, Jade De Oliveira^a, Natália Duarte Do Nascimento^a, Dienifer Sirena^a, Ana Helena Paz^b, Daniel Pens. Gelain^b, José Cláudio Fonseca Moreira^a

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Federal University of Rio Grande Do Sul (UFRGS) Avenida, Porto Alegre, Brazil

^b Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA), Clinics Hospital of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

CONTACT Alexandre Kleber Silveira alexandre.ksilveira@hotmail.com Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Federal University of Rio Grande Do Sul (UFRGS) Avenida, Avenida Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo, Porto Alegre 90035-003, Brazil

Sodium butyrate protects against intestinal oxidative damage and

neuroinflammation in the prefrontal cortex of ulcerative colitis mice model

Corresponding author contact:
alexandre.ksilveira@hotmail.com

Silveira, Alexandre Kleber¹; Gomes, Henrique Mautone¹; Fröhlich, Nicole Thais.¹ ; Possa, Luana¹; Santos, Lucas¹ ; Kessler, Flávio¹; Martins, Alberto¹; Rodrigues, Matheus Scarpatto ¹; De Oliveira, Jade¹; do Nascimento, Natália Duarte¹; Sirena, Dienifer² ; Paz, Ana Helena² , Gelain, Daniel Pens.¹ ; Moreira , José Cláudio Fonseca¹.

(1) :Centro de Estudos em Estresse Oxidativo - Departamento de Bioquímica – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo, Porto Alegre, RS, Brazil, Postal Code: 90035-003.

:Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA) – Clinics Hospital of Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Postal Code: 90035-903.

Keywords: Inflammatory bowel diseases; Butyrate; Oxidative damage; Antioxidant Response; Neuroinflammation.

Abstract:

Inflammatory bowel diseases (IBD) cause increased inflammatory signalling and oxidative damage. IBDs are correlated with an increased incidence of brain-related disorders suggesting that the gut-brain-axis exerts a pivotal role in IBD. Butyrate is one of the main microbial metabolites in the colon, and it can cross the blood-brain barrier, directly affecting the brain. We induced ulcerative colitis (UC) in mice utilizing dextran sodium sulfate (DSS) in the drinking water for 7 days. Animals were divided into four groups, receiving water or DSS and treated with saline or 0,066g/kg of Sodium Butyrate for 7 days. We also used an integrative approach, combining bioinformatics functional network and experimental strategies to understand how butyrate may affect UC. Butyrate was able to attenuate colitis severity and intestinal inflammation. Butyrate protected the colon against oxidative damage in UC and protected the prefrontal cortex from neuroinflammation observed in DSS group. Immunoccontent of tight junction proteins Claudin-5 and Occludin were reduced in colon of DSS group mice and butyrate was able to restore to control levels. Occludin and Claudin-5 decrease in DSS group indicate that an intestinal barrier disruption may lead to the increased influx of gut-derived molecules, causing neuroinflammation in the prefrontal cortex, observed by increased IBA-1 marker. The probable protection mechanism of butyrate treatment occursthrough NRF2 through Nrf2 and HIF-1 α activation and consequent activation of catalase and superoxide dismutase. Our data suggest that systemic inflammation associated with intestinal barrier disruption in UC lead to neuroinflammation in the prefrontal cortex, which was atenuated by butyrate.

1. Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBD) are correlated with increased incidence of brain-related disorders, like cognitive impairments, depression, and anxiety. The gut-brain-axis signalling is crucial in IBD, since intestinal inflammation may lead to neuroinflammation. In the same way, chronic neuroinflammation induces long-term disruption in the CNS network (Belarbi et al., 2012).

Oxidative damage is also a major pathogenic factor in UC. Increased oxidised molecules in inflamed tissue aggravate inflammation and intestinal tissue damage. Oxidative stress also causes DNA damage, which augments the risk of carcinogenesis. Ulcerative colitis is associated with an increased risk of colorectal cancer, one of the most common cancers (Rogler, 2014). Nrf2 is a master regulator of oxidative stress response, being involved in glutathione and thioredoxin regeneration and controlling ROS production in the mitochondria (Kovac et al., 2015).

The prefrontal cortex region regulates autonomic and neuroendocrine pathways involved in peripheral immune cells activity (Bonaz and Bernstein 2013). Tissue inflammation may lead to hypoxia condition due to immune cells oxygen metabolism. Therefore, the transcription factor HIF-1 α , activated in hypoxia conditions, is involved in intestinal inflammatory signalling. HIF-1 α also promotes intestinal barrier integrity and proper intestinal epithelial barrier function (Manresa and Taylor, 2017). Antioxidant balance, proper inflammatory signalling and intestinal barrier integrity are essential to maintain colonic and whole body health.

Butyrate has been proposed as one of the main microbial metabolites in the colon (Pryde et al., 2002), and its administration is known to ameliorate colitis severity in animal models (Dou et al., 2020). We can observe SCFA- specific receptors in every organ, including the brain (Spichak et al., 2021), and butyrate can cross the blood-brain barrier, affecting CNS directly (Yang et al., 2018).

In the present work, we evaluated neuroinflammatory markers in mice's hippocampus and prefrontal cortex subjected to DSS-induced ulcerative colitis treated or non-treated with sodium butyrate. Our objective is to assess how sodium butyrate can protect the gut and may go beyond intestinal regulation, helping to decrease chronic neuroinflammation in crucial brain areas related to IBD. We used

an integrative approach, combining bioinformatics functional network and experimental strategies to understand how butyrate may affect UC.

2. Material and Methods:

2.1 Animals

Male CF-1 mice (8 weeks old) were maintained under a 12-h light–dark cycle (7 am–7 pm) in a temperature-controlled room ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). The animals were maintained in groups of four with access to standard diet and water or DSS, according to treatment, *ad libitum*. Groups were divided with 10 mice in each group.

2.2 Ethical statement

All experimental procedures were made in accordance with the recommendations of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL-COBEA) and the US National Institute of Health (*Guide for the care and use of laboratory animals*, 2010). The project was reviewed and accepted by The Ethics Committee on Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul (protocol number:39823)

2.3 DSS Induction, Colitis Disease Activity Index (DAI) and Histological Evaluation

To evaluate colitis severity, disease activity score (DAI) was utilized. This index is commonly used for humanitarian purposes. It includes weight loss, stool consistency and the presence of blood in stool and anus (Cooper et al., 1993). The maximum value of the DAI was 12, animals who reached score 12 must be sacrificed for humanitarian reasons. None of the animals in the present study had 12 points in DAI during the experiment.

To perform histological evaluation, colons were fixed in 40 g/L paraformaldehyde, processed, and embedded in paraffin to obtain longitudinal medial cuts. Colon section (4 μm) was stained with hematoxylin-eosin (H&E) and analyzed using halogen light microscope. Histological score was blindly determined as per Dieleman et al. Each parameter of histological score, such as severity of inflammation (0-3), depth of inflammation (0-3), regeneration (0-4) and crypt damage

(0-4), was multiplied by the percentage of compromised tissue (1 point for 25%, 2 points for 26-50%, 3 points for 51-75%, and 4 points for 76-100%). Therefore, inflammation and extent have a range from 0 to 12, and regeneration and crypt damage have a range from 0 to 16.

2.4 Treatment

The animals were divided randomly into four groups and received 7 days of gavage treatment with 150mM Sodium Butyrate or water once daily, receiving 4uL/g (Table 1.). Sodium Butyrate may cause metabolic acidosis, stressful properties and even death in high doses (1,2g/kg). The utilized dose represents 0,066 g/kg of Sodium butyrate, which is a safe dose according to previous work ([Gagliano et al. 2013](#)).

Group name	Drink offered	Treatment
Control	Water	Water
Butyrate	Water	Sodium Butyrate 0,066 g/kg
DSS	DSS	Water
DSS + Buryrate	DSS	Sodium Butyrate 0,066 g/kg

Table 1: Groups according to treatment.

2.5 Sample acquisition

Animals were euthanized at the end of the experiment, on day 8. Euthanasia was performed in accordance with the recommendations of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL-COBEA) and the US National Institute of Health (*Guide for the care and use of laboratory animals*, 2010). The blood, liver, and intestines were collected for subsequent analysis. The blood was centrifuged at $900 \times g$ for 5 min and the serum obtained was frozen at -80°C . Tissues were also frozen under the same conditions.

2.6 Measurement of oxidative damage markers.

The formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) was quantified as an index of lipid peroxidation, as previously described (Draper and Hadley, 1990). The samples were mixed with 0.6 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA) and 0.5 mL of 0.67% thiobarbituric acid, and heated in a boiling water bath for 30 min. TBARS formation was determined at 532 nm using a spectrophotometer. Results are expressed as nmol of TBARS/mg protein.

Oxidative damage to proteins was quantified by the levels of carbonyl groups, as previously described (Levine et al., 1990). This method was based on the reaction of dinitrophenylhydrazine (DNPH) with protein carbonyl groups and the absorbance was read using a spectrophotometer set at 370 nm. Results are expressed as μmol carbonyl/mg protein.

To quantify the levels of reduced thiol (-SH) in the protein and non-protein fractions of rat tissues, we performed the Ellman's reagent based assay (Ellman, 1959). For total -SH content measurement, a 50- to 100- μg aliquot was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) and reacted with 10 mM 5,5'-dithionitrobenzyl-2-nitrobenzoic acid. After 60 min of incubation at room temperature (25°C), the

absorbance was read using a spectrophotometer set at 412 nm. Results are expressed as mmol -SH groups/mg protein.

2.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA):

Samples were homogenized and normalized in phosphate buffer 50 mM (KH₂PO₄ and K₂HPO₄, pH 7.4). The final concentration used for all the samples was 10µg/ml. The homogenate samples were placed in ELISA plates and incubated 24 hours and then washed three times with Wash Buffer (PBS 10 mM, 150 mM NaCl and 0,05% Tween-20). Subsequently, 200 µL of primary antibody (1:2000/4000) was added and incubation was carried for 2 hours at room temperature. The plates were washed three times with Wash Buffer and incubated with the specific (according to fabricant) IgG peroxidase-linked secondary antibody (1:2000) for 2 hours. After washing the plate three times with Wash Buffer, 100 µL of substrate solution (TMB spectrophotometric ELISA detection kit) were added to each well and incubated for 10 min. The reaction was terminated with 50 µL/well of 2 M sulfuric acid stopping reagent and the absorbance read at 450 nm in a spectrophotometer (SpectraMax® i3). The results are expressed in percentage to control (Gasparotto et al., 2017).

2.8 Western Blotting

To perform immunoblot experiments, the tissues were prepared and normalized using a radioimmunoprecipitation assay buffer protocol(Gasparotto et al., 2015). The proteins (30 µg/well) were fractionated by SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes with Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, CA, USA). Protein loading and electroblotting efficiency were verified through Ponceau S staining, and the membranes were washed with TTBS. Membranes were incubated for 20 min at room temperature in SNAP i.d. 2.0 Protein

Detection System (Merck Millipore, MA, USA) with each primary antibody (1:500 dilution) and subsequently washed with TTBS. Anti-rabbit, mouse or goat IgG peroxidase-linked secondary antibody was incubated for an additional 20 min in SNAP (1:5.000 dilution) and washed again. The immunoreactivity was detected by enhanced chemiluminescence using Supersignal West Pico Chemiluminescent kit. The chemiluminescence was captured with an ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, São Paulo, Brazil). Densitometric analysis of the images was performed using ImageJ software (ImageJ v1.49, National Institute of Health, USA). Blots were developed to be linear in the range used for densitometry. All results were expressed as a relative ratio to β -actin or total isoform.

2.9 Enzyme antioxidant assays.

Superoxide dismutase (SOD) activity was also estimated from the inhibition of superoxide anion-dependent adrenaline auto-oxidation, using a spectrophotometer at 480 nm as previously described (Misra, 1972)

2.10 Immunofluorescence staining

Animals were anaesthetized with a mixture of ketamine and xylazine via intraperitoneal injection and transcardially perfused with a 0.9% saline solution, followed by 4% paraformaldehyde prepared in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS). After perfusion, whole brains were removed and maintained in 4% paraformaldehyde at 4°C for 24 hours and cryoprotected at 4°C in a solution of 30% sucrose in PBS. Serial coronal sections (30 μ m) of the prefrontal cortex and hippocampus were obtained with a Leica VT 1000 S vibrating blade microtome (Leica® – United States) at room temperature (25°C) and stored in 0.1M PBS with sodium azide (0.5%) at 4°C. For the immunofluorescence assay, the slices were washed twice with 0.1M PBS and blocked using 1% bovine serum albumin (BSA) diluted in 0.1M PBS with 0.3% Triton x100 (PBS-Tx) for 45 minutes at room temperature. The tissues were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies rabbit anti-IBA-1 (Wako 01919741, 1:500) in 1% BSA diluted in PBS-Tx. After five

washes with 0.1M PBS, the slices were incubated with the secondary antibodies goat anti-rabbit Alexa Fluor 568 (Invitrogen, 1:1000) and goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1:1000) in 1% BSA diluted in PBS-Tx for 2 hours at room temperature and protected from the light. After incubation with secondary antibodies, the slices were washed three more times with 0.1M PBS, mounted on slides with CC/Mount liquid (Sigma), and then covered with coverslips. Images were acquired using a Microscopy EVOS® FL Auto Imaging System (AMAFD1000 - Thermo Fisher Scientific) or a laser-scanning Olympus®FV1000 confocal microscope. Image reconstruction, quantitative and qualitative analysis were performed using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.11 Bioinformatic network analysis

To build the protein-protein network key proteins were used as seeds in STRING database v11.5 ([Szklarczyk et al. 2021](#)). These proteins were: Cldn5, Ocln, Hif1a, Cat, Nfe2l2 and Nfkb1. The criteria set to generate the network were: *Mus musculus* as organism; consider only experiments, databases, co-expression and co-occurrence as active interaction sources; 0.700 as the minimum required score; no more than 100 interactors in the first shell; and no more than 20 interactors in the second shell. The network generated had 126 proteins and 1522 connections.

In parallel, we collected GSE148794, a transcriptional data of colonic tissue from mice subjected to DSS exposure ([Ho et al. 2021](#)). In the experiment, mice were exposed to 1.5% DSS for 6 days and then switched to drinking water. Mice were also treated with PBS or Serpina3n and colonic tissue was collected at several time points. In order to reproduce our experimental procedures, we selected only control mice with no exposure to DSS and mice exposed to DSS for 6 days without the supplementation of Serpina3n. Here, the data were analyzed as whole tissue expression data, disregarding single-cell stratified expression. In Cytoscape v3.9.1 ([Shannon et al. 2003](#)), the network was uploaded and clusters were generated using MCODE, an algorithm and plugin in Cytoscape, ([Bader and Hogue 2003](#)). The

eight clusters found were annotated using gene ontology enrichment analysis ([Mi et al. 2019](#)), the analysis was made as follows: proteins from each cluster used as seeds; biological process as class and *Mus musculus* as organism. Only significant ontologies were considered. Altogether, we generated a protein-protein interaction network with functional clusters and transcriptional information (Fig.1).

2.11 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Data were evaluated by one-way ANOVA analysis and followed by Tukey's Multiple Comparison post-hoc test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Weight gain and Colon length

DSS in drinking water for 7 days was able to induce UC in mice. Colon length was shortened in the DSS group as compared to Control group. Butyrate treatment was able to reverse colon shortening caused by DSS treatment, returning to control levels (Fig. 1). UC severity was also attenuated by butyrate treatment, observed by the decrease in the disease score and in the histological score of But+DSS group as compared to DSS group (Fig 2.).

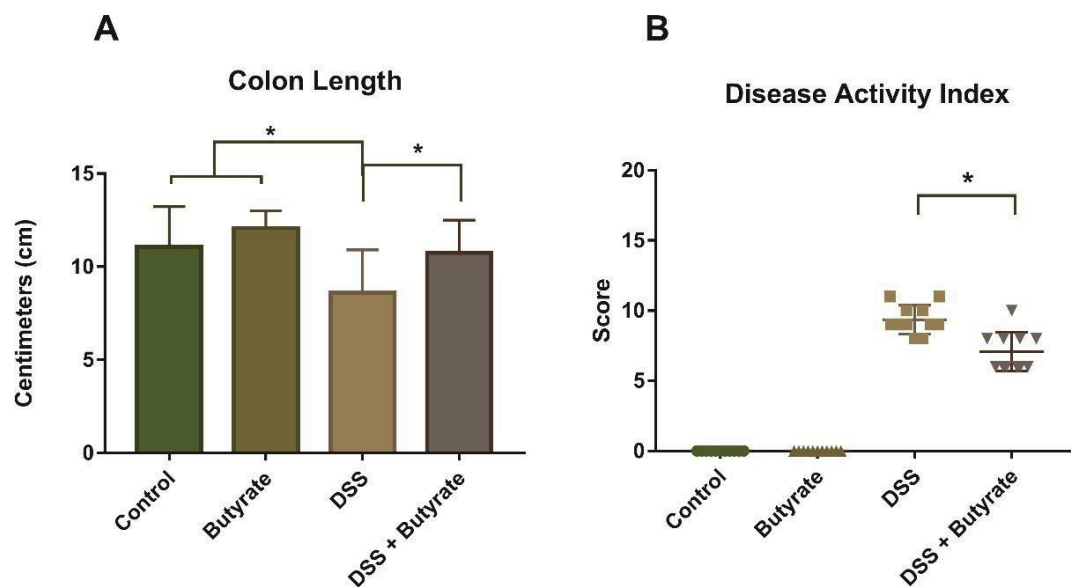


Figure 1: (A) Colon length. Mice colon measure in centimeters. Representative pictures of each group can be accessed in supplementary material. **(B) Disease Activity Index:** UC clinical evaluation, Score obtained from three parameters: Consistence of stool, presence of blood in stool and anus and animal's weight loss along the treatment. Samples are presented as MEAN + SD. n = 10(*): p<0.05 compared to the control group (two-way Anova test).

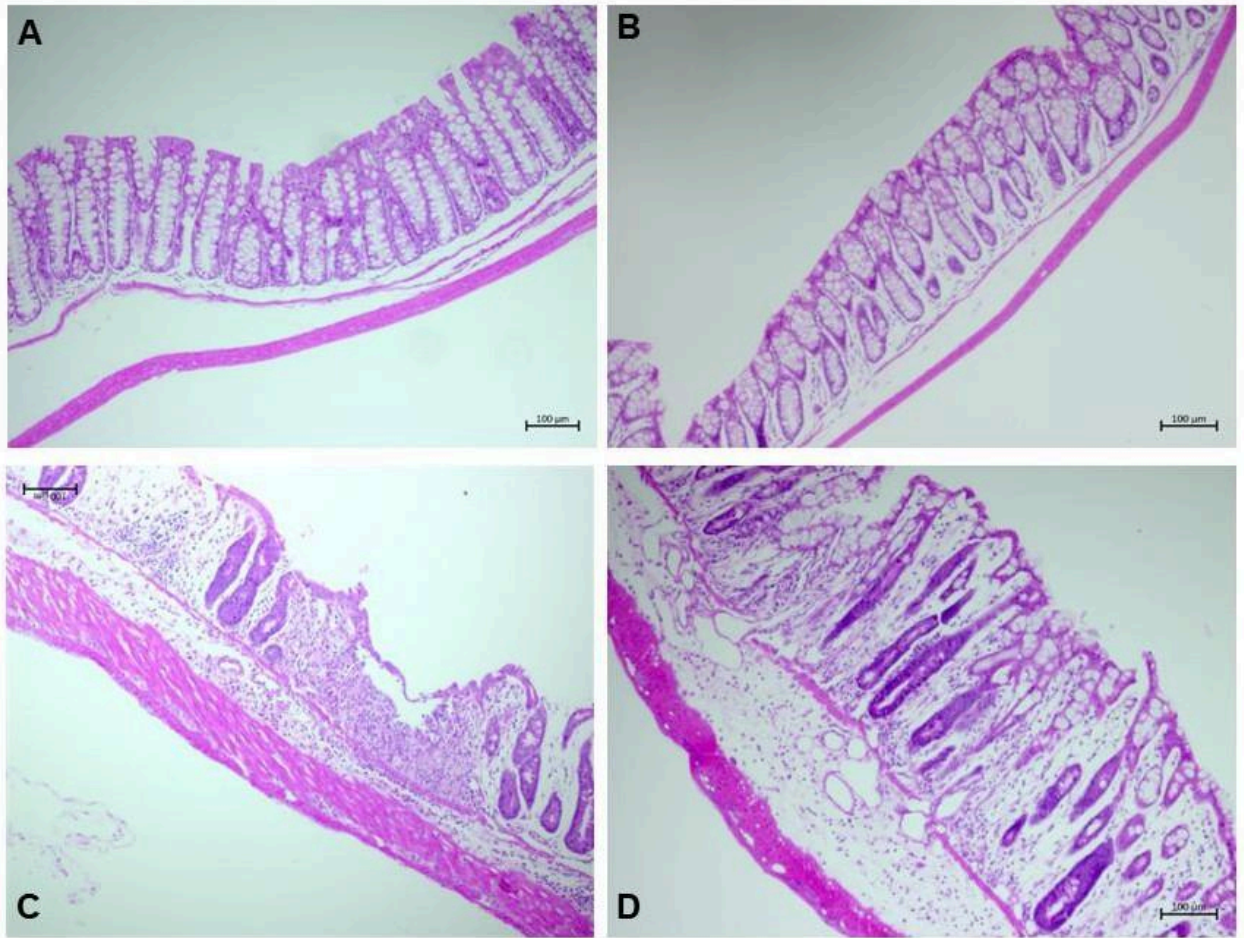


Figure 2: Representative lamina obtained from histological evaluation of the Colon: (A) Control Group. (B) Butyrate group. (C) DSS group. (D) Butyrate + DSS group.

3.2 Oxidative damage markers

Chronic inflammation in UC triggers immune cells chemotaxis to damaged areas and infiltration in colonic tissue. The infiltrated neutrophils can produce a large amount of ROS, which may lead to increased oxidative damage in intestinal tissue (Jena et al., 2012). The liver is very affected by the gut since the portal vein brings blood enriched with gut-derived molecules directly to the liver, which is further transported to the whole circulation. We evaluated oxidative damage markers in the colon and liver. DSS group presented higher levels of carbonylated proteins as compared to Control and Butyrate group. Butyrate+DSS did not present statistical differences between Control, Butyrate and DSS group (Fig 3B). DSS group presented increased TBARS levels and decreased concentration of reduced thiols in the colon as compared to Butyrate group (Fig 3A and 3C). We observed similar results in the liver, but only TBARS analysis showed a statistical difference, where DSS group presented increased lipid peroxidation as compared to Control group (Fig 4A). These results suggest that DSS treatment induced colonic and hepatic oxidative damage and Butyrate treatment was able to attenuate the changes in these oxidative damage markers.

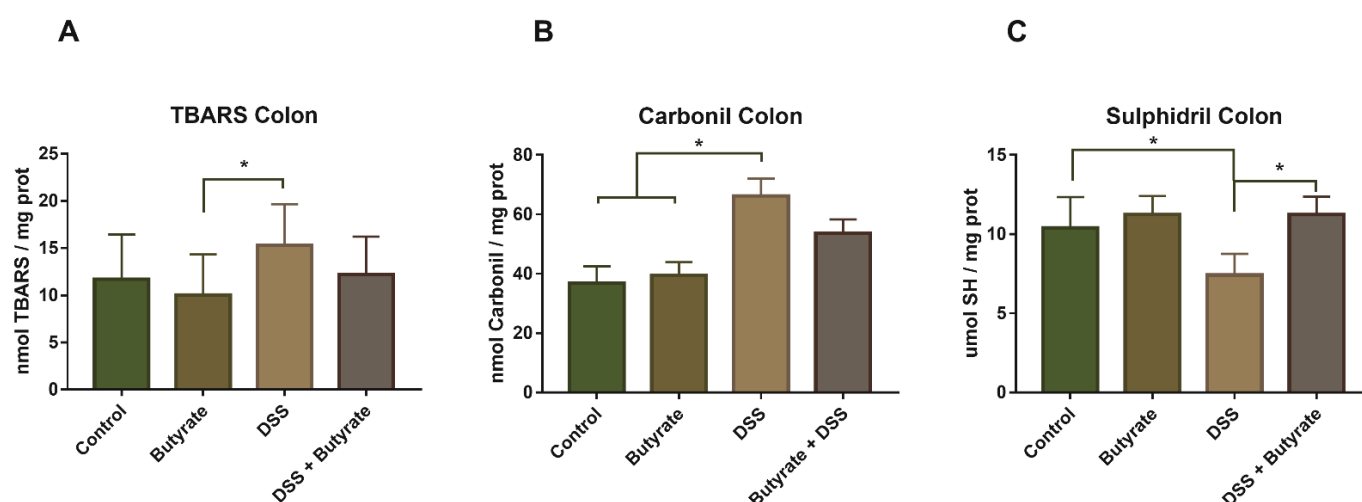


Figure 3: Oxidative Damage Markers in Colon. (A) TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances detection in Colon. Sample are presented as MEAN + SD. n = 10 (*) : p < 0.05 compared to the control group (two-way Anova test)

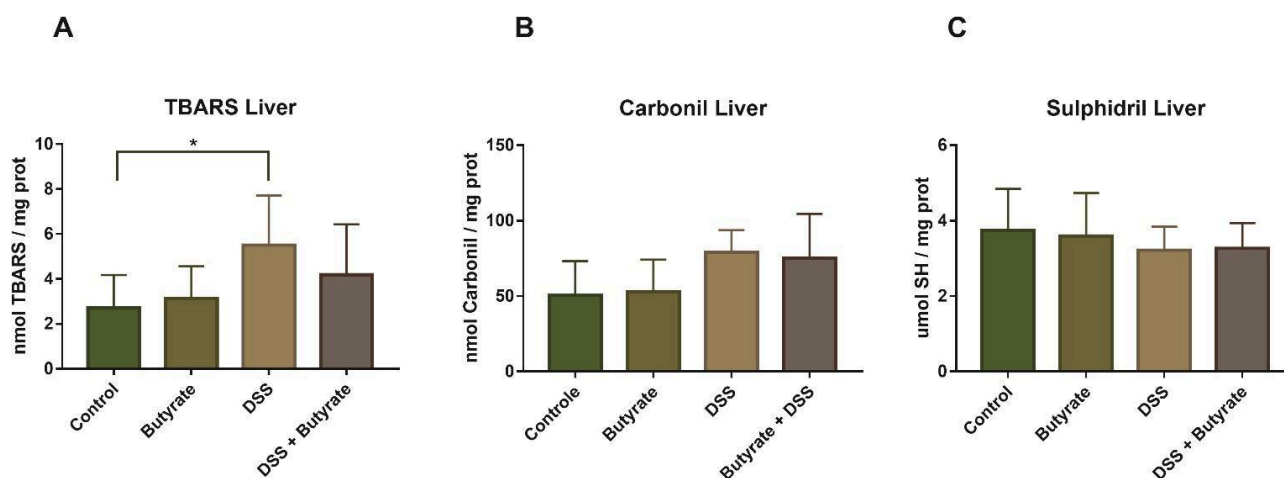


Figure 4: Oxidative Damage Markers in Liver. (A) TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances detection in Liver. Sample are presented as MEAN + SD. n = 10 10 (*) : p<0.05 compared to the control group (two-way Anova test).

3. Superoxide Dismutase activity, Catalase and Nrf2 and Keap1 immune content in the colon

We observed an increase in catalase content in colonic tissue (Fig 5A) in DSS group when compared to control, but BUT+DSS group presented an increased catalase content when compared to DSS group, which could partially explain Butyrate ability to protect against colon oxidative damage in UC.

There is no difference between groups in Nrf2 levels in mice colonic tissue, despite an apparent increase in DSS-treated animals (Fig 5B). The Keap1 content was also evaluated since Keap1 regulates the activity of Nrf2. DSS and BUT+DSS groups presented increased Keap1 immune content when compared to Control and BUT groups (Fig 5C). DSS group presented lower SOD activity when compared to DSS+BUT group, but there is no difference between control and BUT group (Fig 5D).

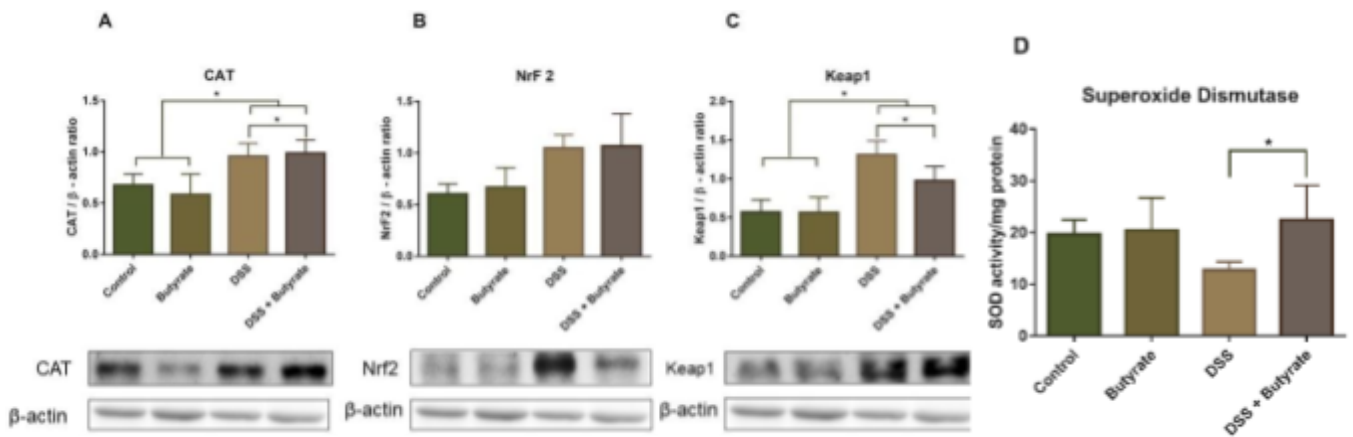


Figure 5. Antioxidant response related proteins. Bar represents Western Blot band quantification: **(A) Catalase** in Colon tissue, **(B) Nrf2** in Colon tissue. **(C) Keap1** in Colon tissue. Representative bands are placed below graphics **(D) Superoxide Dismutase** enzyme activity in the colon tissue. n = 6. (*): $p < 0.05$ compared to the control group (two-way Anova test)

3.4 Claudin-5 and Occludin content in the colon

We evaluated tight junction proteins Claudin-5 and Occludin content in colonic tissue. DSS group presented decreased Claudin-5 and Occludin and Butyrate was able to return these two tight junctions proteins content back to control levels, suggesting that barrier disruption observed in this UC model is attenuated (Fig. 6).

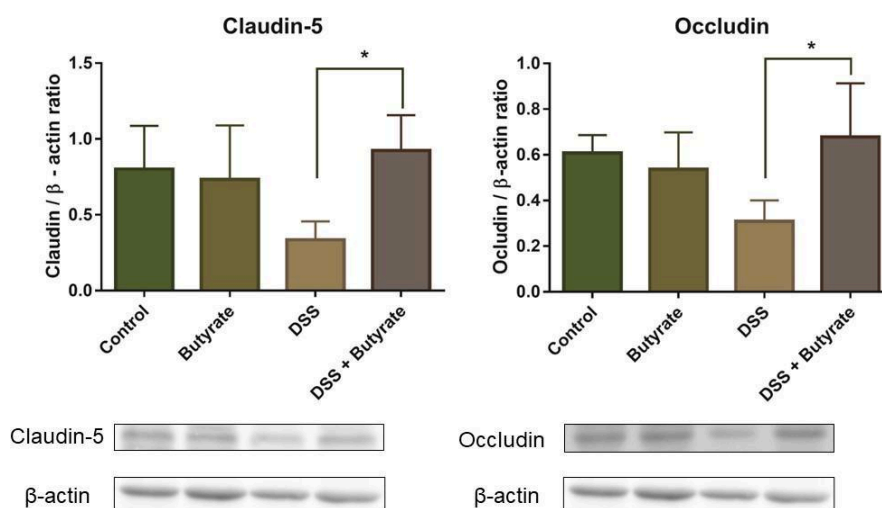


Figure 6. Claudin-5 and Occludin in colon tissue. Bars represents western blot band quantification: (A) Claudin-1 in Colon tissue (B) Occludin in Colon tissue. . MEAN + SD. n = 10 (*): $p < 0.05$ compared to the control group (two-way Anova test)

3.5 HIF-1 α and TNF- α quantifications.

We observed a decrease in HIF-1 α concentration in colonic tissue in the DSS-group when compared to Control, Butyrate and DSS+Butyrate groups (Fig. 7A).

Butyrate treatment alone did not alter HIF-1 α concentrations in colonic tissue of healthy animals, but Butyrate treatment in colitis induced group was able to increase HIF-1 α back to control levels (Fig 7A).

As expected, we also observed increased TNF- α levels in DSS-group as compared to Control. There is no difference between BUT+DSS and Control group in TNF- α levels (Fig 7B). The mechanism behind this effect may occur through the conversion of Butyrate into β -hydroxybutyrate, which has the ability to block the NLRP3 signalling cascade, decreasing inflammatory response (Youm et al., 2015). NLRP3 upregulation activates pro-inflammatory pathways(Bian et al., 2017). NLRP3 inflammasome signalling is also inhibited by Nrf2, which is augmented in DSS and DSS+ But groups. We also evaluated IL-1 β levels in mice serum but there was no difference between groups. (Figure S1).

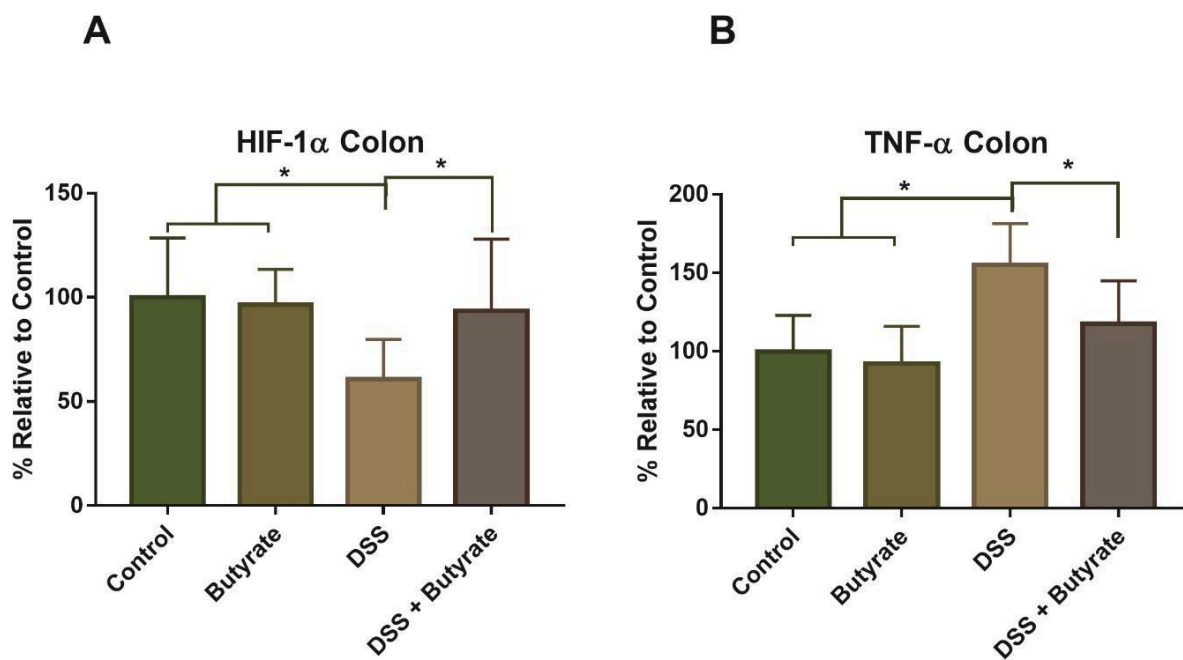
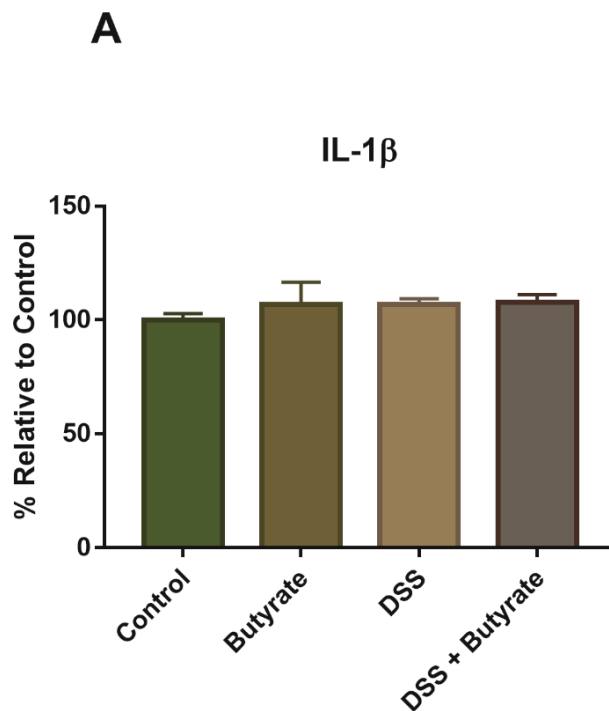


Figure 7 HIF-1 α and TNF- α levels in colon tissue. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) performed in Colon: (A) HIF-1- α in Colon tissue. (B) TNF- α ELISA in Colon tissue. n = 10 (*): p<0.05 compared to the control group (two-way Anova test)



Supplementary Figure 1. IL-1 β Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) performed in Colon: n = 10 (*): p<0.05 compared to the control group (two-way Anova test)

3.6 Immunoreactivity quantifications for neuroinflammatory markers

To assess the effects of DSS and butyrate treatment on neuroinflammation, we performed the immunofluorescence assay for IBA1, a structural microglial cell marker. The analysis of IBA1 immunoreactivity in the prefrontal cortex revealed that the DSS group exhibited higher IBA1 content in comparison to the control group. Moreover, no effects of butyrate treatment were observed regarding the IBA1 content in the prefrontal cortex (Figure 8).

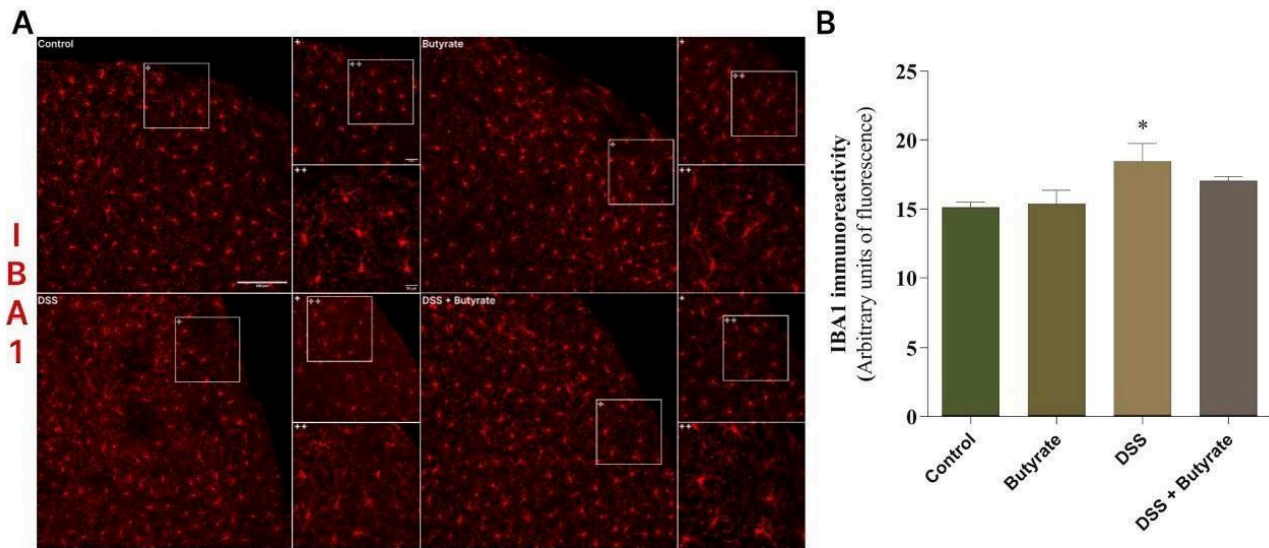


Figure 8 - Expression of IBA1 in the prefrontal cortex. (A) Representative images of IBA1 labeling on the prefrontal cortex slices (n=4-5 per group). Images were acquired using a laser-scanning Olympus®FV1000 confocal microscope. Scale bars = 200µm for 20x objective images, 100µm for 40x objective images (represented in the figure by +), and 50µm for digital zoom images (illustrated in the figure by ++). (B) Quantification of IBA1 immunoreactivity from pictures taken with 20x objective lens. Data are expressed as the mean ± SEM from 4-5 animals per group. * p<0.05 compared to the control group (two-way ANOVA followed by Duncan posthoc test).

In addition, the immunoreactivity of IBA1 in the hippocampus was also quantified. The two-way ANOVA statistical analysis showed a significant effect of DSS in the immunoreactivity of IBA1 in the CA3 hippocampal region. However, the Duncan posthoc test revealed that DSS treatment only exerts a tendency to increase the IBA1 content in comparison to the control group (Figure 9 B).

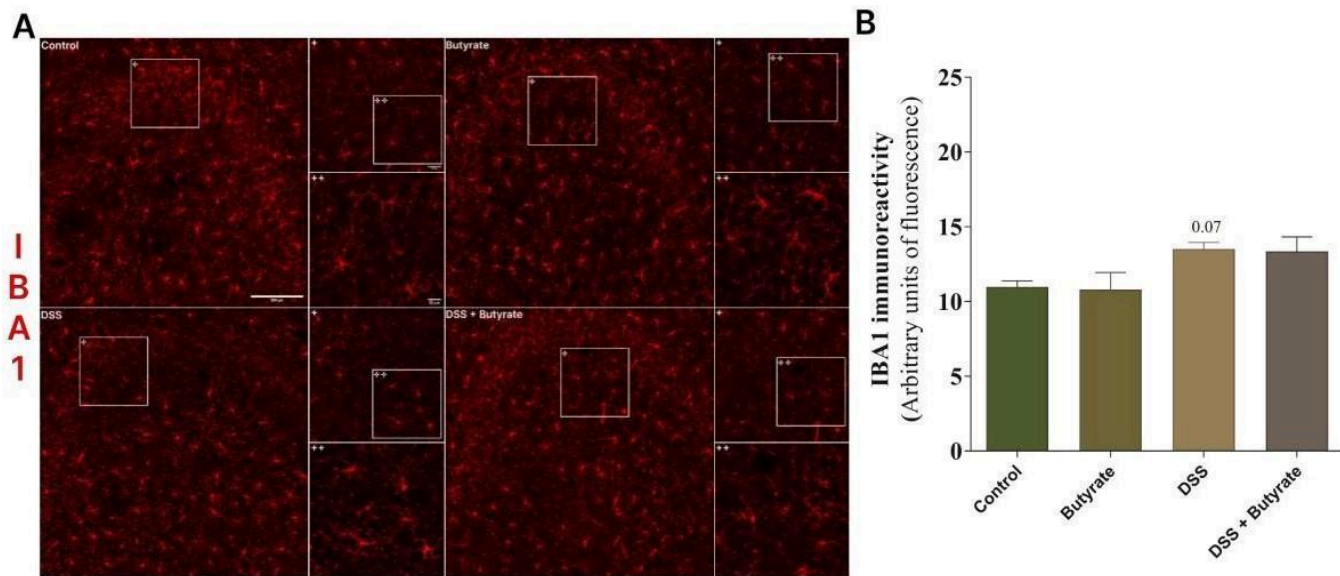


Figure 9 - Expression of IBA1 in the CA3 region of the hippocampus

Figure 9 - Expression of IBA1 in the CA3 region of the hippocampus. (A) Representative images of IBA1 labeling on the CA3 region of the hippocampus slices (n=4-5 per group). Images were acquired using a laser-scanning Olympus®FV1000 confocal microscope. Scale bars = 200µm for 20x objective images, 100µm for 40x objective images (represented in the figure by +), and 50µm for digital zoom images (illustrated in the figure by ++). (B) Quantification of IBA1 immunoreactivity from pictures taken with 20x objective lens. Data are expressed as the mean ± SEM from 4-5 animals per group (two-way ANOVA followed by Duncan posthoc test).

No effect of butyrate treatment was observed regarding the IBA1 content in the CA3 hippocampal region. Likewise, the two-way ANOVA analysis indicated that there was no effect of either DSS or butyrate treatment regarding the IBA1 content in both CA1 (Figure 10) and in the DG (Figure 11) hippocampal regions.

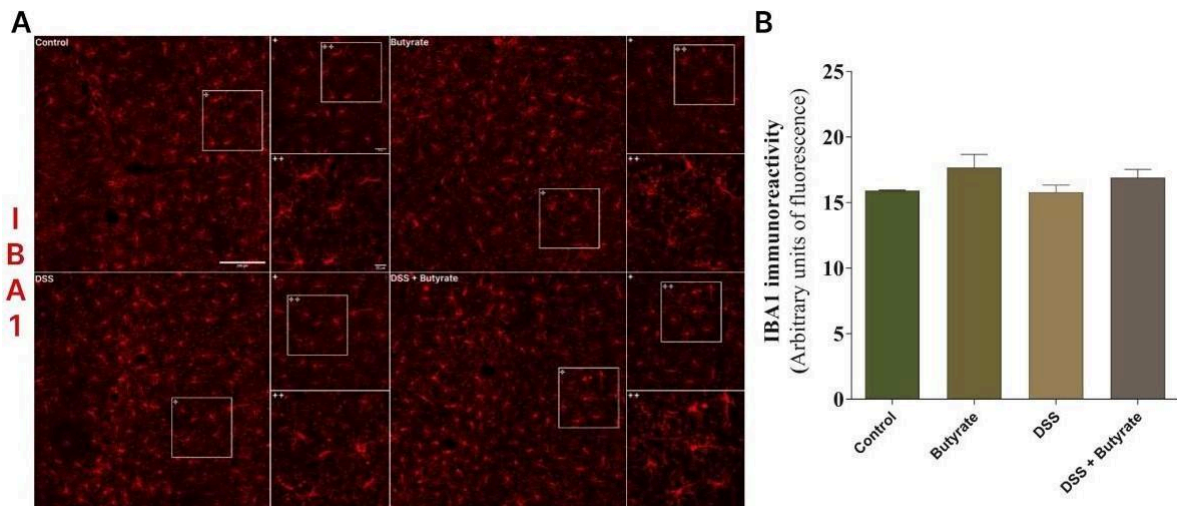


Figure 10 - Expression of IBA1 in the CA1 region of the hippocampus.

Figure 10 - Expression of IBA1 in the CA1 region of the hippocampus. (A) Representative images of IBA1 labeling on the CA1 region of the hippocampus slices (n=4-5 per group). Images were acquired using a laser-scanning Olympus®FV1000 confocal microscope. Scale bars = 200µm for 20x objective images, 100µm for 40x objective images (represented in the figure by +), and 50µm for digital zoom images (illustrated in the figure by ++). (B) Quantification of IBA1 immunoreactivity from pictures taken with 20x objective lens. Data are expressed as the mean ± SEM from 4-5 animals per group (two-way ANOVA followed by Duncan posthoc test).

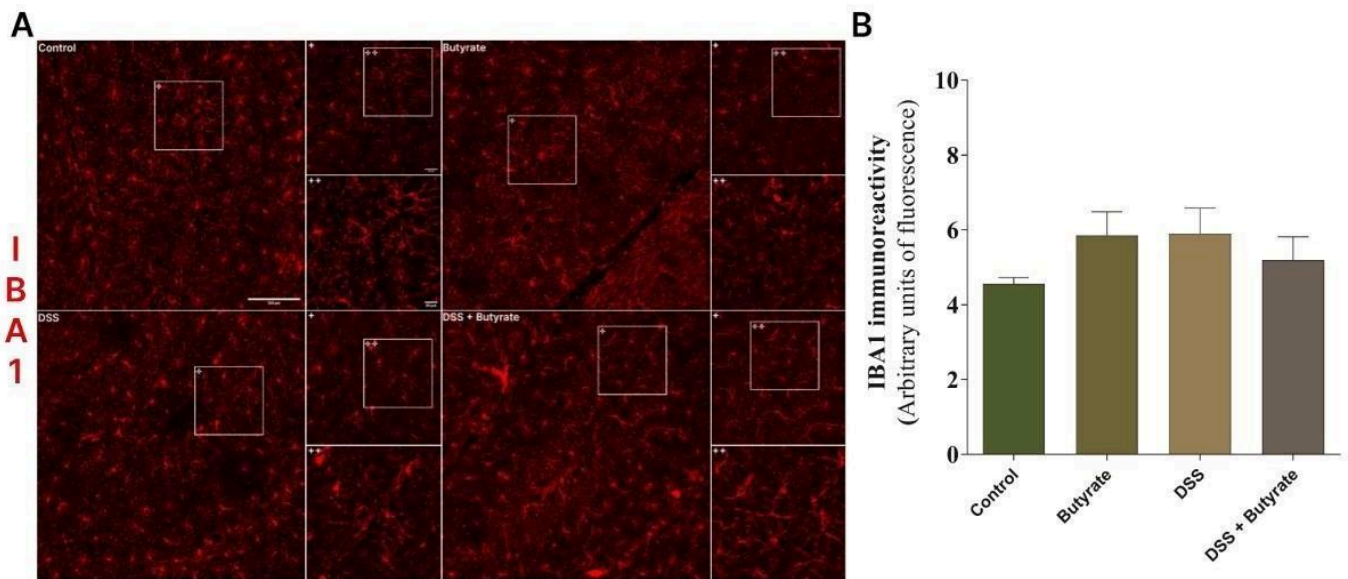


Figure 11 - Expression of IBA1 in the DG region of the hippocampus

Figure 11 - Expression of IBA1 in the DG region of the hippocampus.

(A) Representative images of IBA1 labeling on the dentate gyrus region of the hippocampus slices (n=4-5 per group). Images were acquired using a laser-scanning Olympus®FV1000 confocal microscope. Scale bars = 200µm for 20x objective images, 100µm for 40x objective images (represented in the figure by

+) , and 50µm for digital zoom images (illustrated in the figure by ++)

(B) Quantification of IBA1 immunoreactivity from pictures taken with 20x objective lens. Data are expressed as the mean ± SEM from 4-5 animals per group (two-way ANOVA followed by Duncan posthoc test).

3.7 Comparison between the functional network and experimental data.

Considering the results found in the present work, we selected key proteins to generate a protein-protein interaction network. Using transcriptional data available in public repositories of colonic tissue from DSS-exposed mice, we plotted the transcription profile affected by DSS in the network in order to compare with our results. The key proteins used as seeds for the network generation were: HIF-1 α , Nfkb, Nfe2l2 (Nrf2 gene), Cat, Ocln and Cldn5. These proteins were selected to represent pathways such as hypoxia, inflammation, response to stress and tight junctions in the network. Moreover, there is an important crosstalk between Nfkb and Nrf2 pathways(Chen et al., 2021; Wardyn et al., 2015).

Proteasome Assembly

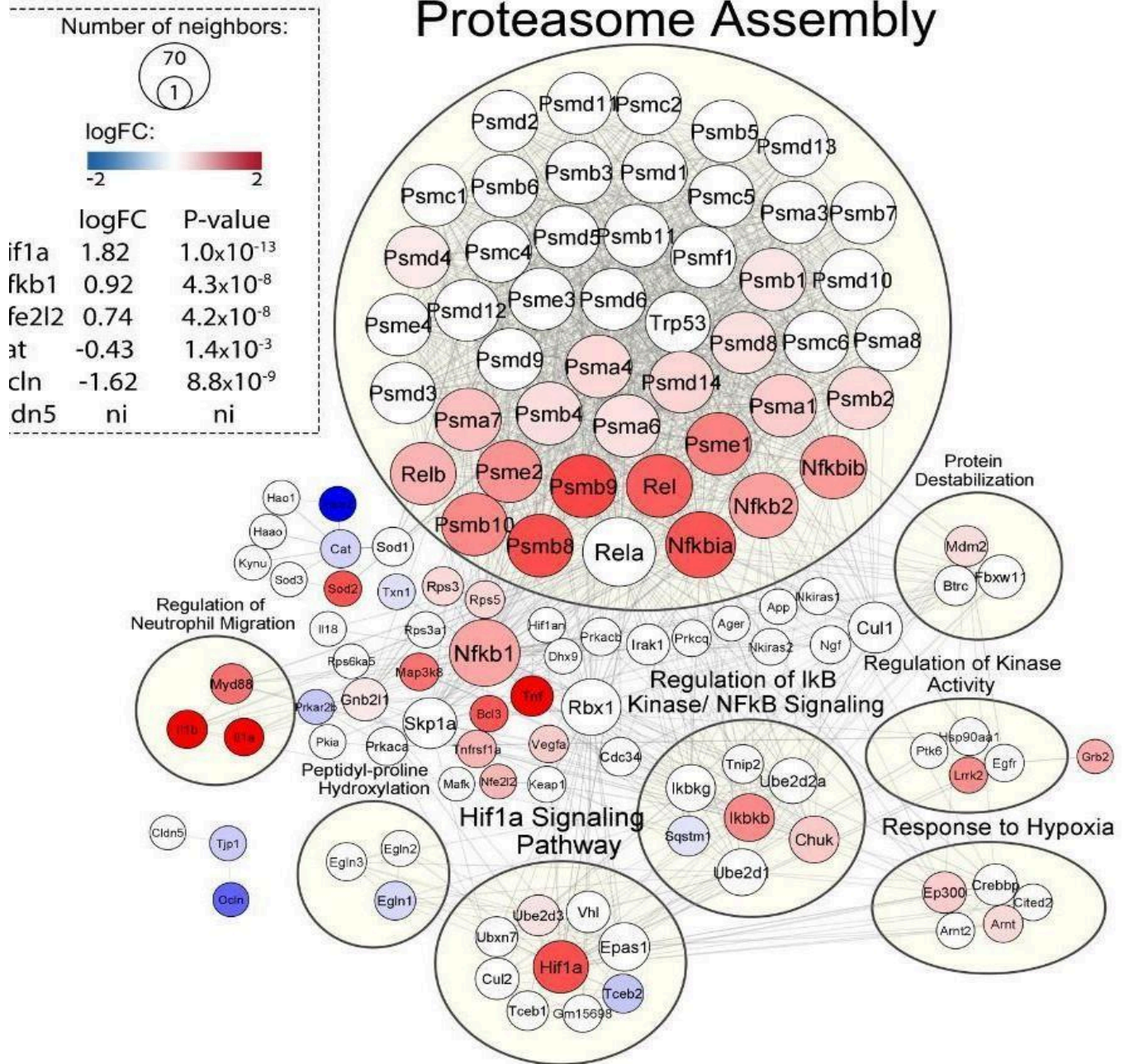


Figure 12. Functional protein association network.

4. Discussion

4.1 Butyrate attenuates UC severity

Butyrate ability to decrease Disease Activity Index (DAI) is probably related to anti-inflammatory local effects in the colon. Butyrate was also described as an energetic source for colonocytes, which may contribute to epithelial integrity. Some of butyrate's beneficial effects is linked to its ability to modulate energy metabolism and mitochondrial function by decreasing glycolysis, increasing β -oxidation, and enhancing the tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation (Xing et al., 2016).

4.2 Butyrate protects against oxidative damage by UC in Colon and Liver

Nrf2 is a key transcription factor in antioxidant defense by promoting the transcription of genes associated with antioxidant defense. Nuclear activation of Nrf2 occurs mainly due to the oxidation of Keap1 in the cytosol, which causes the dissociation between these proteins and allows Nrf2 nuclear translocation.

BUT+DSS group presented a decreased Keap1 content when compared to DSS group, which suggests that Nrf2 is being more translocated to the nucleus in BUT+DSS group and could explain decreased oxidative damage in BUT+DSS when compared to DSS group. Butyrate can reduce oxidative stress by promoting nuclear translocation of Nrf2 in HepG2 cell culture challenged with H₂O₂ (Xing et al., 2016). Butyrate modulates oxidative stress in human colonic cell culture by increasing catalase and decreasing COX-2 expression (Sauer et al., 2007). COX-2, involved in inflammatory response and NF- κ B, that were used for bioinformatic network are also involved in ulcerative colitis, in further studies the evaluation of these factor could be helpful to uncover butyrate in vivo effects.. DSS group presented a decrease in SOD activity when compared to BUT+DSS group. This increase in SOD activity can be explained by the differences in Nrf2 pathway activation by Butyrate in stress conditions. Superoxide dismutase plays an important role in antioxidant defenses, it is responsible for the dismutation of superoxide anion to hydrogen peroxide.

Hydrogen peroxide needs to be further neutralized by other antioxidant defenses, like CAT or other peroxidases. SOD and CAT work together for complete neutralization of superoxide anion and these two enzymes are regulated by Nrf2 activation, which appears to be more translocated to the nucleus in BUT+DSS group.

Systemic effects of Butyrate administration are more likely to be responsible for its positive effects in UC. In fact, Butyrate administration via enema did not affect oxidative damage in UC patients' colons (Hamer et al., 2010). Oral butyrate provides more beneficial effects than enema administration, probably due to the presence of specific receptors in tissues besides the gut.

In a similar way, propionate, another circulating abundant SCFA, was shown to ameliorate intestinal barrier function and reduce oxidative damage and inflammation in DSS colitis model (Tong et al., 2016). The mechanisms behind this effect could be similar since Butyrate and Propionate can bind to the same receptor.

4.4 Butyrate restores the levels of proteins essential to intestinal barrier integrity

Claudin-5 and Occludin are two tight junction proteins associated with intestinal barrier permeability. Claudin-5 is the most abundant claudin in humans and its immuno-content is extremely important to maintain the intestinal barrier fully functional. UC is characterized by colonic inflammation and epithelial degeneration, which leads to increased intestinal permeability. Butyrate was able to return these two tight junction proteins content back to control levels, suggesting that barrier disruption observed in this UC model is attenuated (Fig. 6). Barrier integrity is essential to maintaining intestinal health. Microbe-derived molecules from the lumen's gut are often harmful when they enter in host's circulation. The leaky gut phenomenon is observed when the intestinal barrier is disrupted, and its harmful effects can extend to other parts, including the brain. We hypothesize that lower levels of tight junction proteins in DSS group may lead to increased intestinal permeability, affecting the whole body, especially the brain.

4.5 Butyrate increases HIF-1 α and decreases TNF- α content in UC.

HIF-1 α plays a key factor in IBDs, since inflammation in intestinal tissue leads to hypoxia conditions due to immune cells metabolism, activating the HIF-1 α cascade (Kerber et al., 2020). HIF-1 α is also involved in infection response, promoting intestinal barrier integrity (Manresa and Taylor, 2017). Since Butyrate treatment alone did not alter HIF-1 α concentrations in colonic tissue of healthy animals, but Butyrate treatment in colitis induced group was able to increase HIF-1 α back to control levels (Fig 7A). This up-regulation of HIF-1 α by butyrate under an inflammatory context is essential to promote butyrate's beneficial effects (Vinolo et al 2019). This up-regulation of HIF-1 α by butyrate under an inflammatory context is essential to promote butyrate's beneficial effects (Vinolo et al 2019).

HIF-1 α activation also promotes protection against oxidative stress, by targeting the mitochondria, decreasing reactive species production and oxidative stress induced-apoptosis (Li et al., 2019). In addition to HIF-1 α protection against oxidative stress, HIF-1 α is also essential to stabilising tight junctions, helping to maintain intestinal barrier integrity. In HIF-1 α K.O animals, butyrate could not protect against increased intestinal permeability in UC (Fachi et al., 2019).

4.6 Butyrate protects the Prefrontal cortex against neuroinflammation

DSS group exhibited higher IBA1 content in comparison to the control group. Moreover, no effects of butyrate treatment were observed regarding the IBA1 content in the prefrontal cortex (Figure 8). DSS-treated animals presented increased neuroinflammation markers in the prefrontal cortex as compared to the control group. Butyrate treatment in the DSS+Butyrate group returned IBA-1 to control levels in the prefrontal cortex. We hypothesized that neuroinflammation could be triggered by peripheral chronic inflammation and increased intestinal barrier disruption, observed in DSS-treated animals. Butyrate ameliorates UC severity by promoting intestinal barrier integrity through tight junction protein synthesis and local anti-inflammatory effects (Fachi et al., 2019). The leaky-brain phenomenon may be occurring, leading to increased blood-brain barrier permeability, allowing an increased influx of

microbe-derived proinflammatory molecules from the gut to the brain. The augmented influx of proinflammatory molecules causes increased immunoreactivity of microglia, leading to neuroinflammation (Evrensel et al., 2020).

Upon UC installation, stress pathways such as inflammatory and antioxidant responses are enriched (Figure 12). HIF-1 α is upregulated in our network, but we observed the opposite in DSS-treated animals compared to the control. We hypothesise that this could occur because the HIF-1 α role in colitis appears to be cell-dependent. Previous authors have reported that HIF-1 α in myeloid cells can increase disease severity but has a protective role in dendritic cells and intestinal epithelial cells, so the exact mechanism behind the HIF-1 α effect on intestinal epithelium needs further research (Kim et al., 2018). Proteasome assembly cluster appears to be upregulated by DSS treatment since protein traffic for renovation is required in tissue repair.

DSS triggered pro-inflammatory pathways in the network. Nfkb isoforms (Nfkb1, Nfkb2, Nfkbia, Nfkbib) and TNF- α are upregulated in UC animals (Fig. 7). Moreover, the upregulated Map3k8 is upstream of several pathways related to the immune system, such as cytokine production, neutrophil migration, leukocyte activation and others (Ren et al., 2021). Regulation of neutrophil migration is upregulated in the network since UC triggers immune cell migration toward the colon (Fig. 8).

4.7 Protein Network

Tight junction protein Occludin is downregulated in the network since UC animals presented increased intestinal permeability, which was in accordance with our results (Fig. 6). Catalase is downregulated in our network (Fig.12), but we observed increased Catalase quantification in DSS group (Fig 5A). NRF2 pathway is also affected in our network analysis, encoded by Nfe2l2 gene, which is upregulated in the network. We also observed an increase in NRF2 immune content in DSS group, BUT+DSS group presented an even increased NRF2 content, which could explain oxidative damage protection in the colon. Also noteworthy, COX-2 appears upregulated in our protein assembly network. Previous studies reported that COX-2 is closely related to inflammatory response in ulcerative colitis ([Li et al. 2018](#)). so we expect to evaluate this

parameter in further studies. NF- κ B is also involved in stress response, including oxidative stress, so we believe that quantification of the transcript factor could also help to better understand molecular mechanism involved in butyrate treatment.

Altogether, the mechanisms triggered by DSS may remain unclear and need further investigation. However, the results are in accordance with the fact that Nrf2 and HIF-1 α pathways mediate stress response in this context.

5. Conclusion

Taken together, our results suggest that sodium butyrate oxidative damage protection goes through Nrf2, HIF-1 α and Catalase regulation. Butyrate also augments tight junction proteins immunocontent associated with intestinal barrier integrity. Systemic inflammation and intestinal barrier disruption in UC lead to neuroinflammation in the prefrontal cortex, which was attenuated by butyrate treatment.

Data Availability link: <https://github.com/alexandre-silveira1/Butyrate-Neuro.git>

Bibliography

- Bader, G. D. and Hogue, C. W. V.** (2003). An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics* **4**, 2.
- Belarbi, K., Arellano, C., Ferguson, R., Jopson, T. and Rosi, S.** (2012). Chronic neuroinflammation impacts the recruitment of adult-born neurons into behaviorally relevant hippocampal networks. *Brain Behav. Immun.* **26**, 18–23.
- Bian, F., Xiao, Y., Zaheer, M., Volpe, E. A., Pflugfelder, S. C., Li, D.-Q. and de Paiva, C. S.** (2017). Inhibition of NLRP3 inflammasome pathway by butyrate improves corneal wound healing in corneal alkali burn. *Int. J. Mol. Sci.* **18**,.
- Bonaz, B. L. and Bernstein, C. N.** (2013). Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **144**, 36–49.
- Chen, Y.-E., Xu, S.-J., Lu, Y.-Y., Chen, S.-X., Du, X.-H., Hou, S.-Z., Huang, H.-Y. and Liang, J.** (2021). Asperuloside suppressing oxidative stress and inflammation in DSS-induced chronic colitis and RAW 264.7 macrophages via Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathways. *Chem. Biol. Interact.* **344**, 109512.
- Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S. and Sedergran, D. J.** (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* **69**, 238–249.
- Dou, X., Gao, N., Yan, D. and Shan, A.** (2020). Sodium butyrate alleviates mouse colitis by regulating gut microbiota dysbiosis. *Animals (Basel)* **10**,.
- Draper, H. H. and Hadley, M.** (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* **186**, 421–431.
- Ellman, G. L.** (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70–77.
- Evrensel, A., Ünsalver, B. Ö. and Ceylan, M. E.** (2020). Neuroinflammation, Gut-Brain Axis and Depression. *Psychiatry Investig.* **17**, 2–8.
- Fachi, J. L., Felipe, J. de S., Pral, L. P., da Silva, B. K., Corrêa, R. O., de Andrade, M. C. P., da Fonseca, D. M., Basso, P. J., Câmara, N. O. S., de Sales E Souza, É. L., et al.** (2019). Butyrate Protects Mice from *Clostridium difficile*-Induced Colitis through an HIF-1- Dependent Mechanism. *Cell Rep.* **27**, 750-761.e7.
- Gasparotto, J., Petiz, L. L., Girardi, C. S., Bortolin, R. C., de Vargas, A. R., Henkin, B. S., Chaves, P. R., Roncato, S., Matté, C., Zannotto-Filho, A., et al.** (2015). Supplementation with vitamin A enhances oxidative stress in the lungs of rats submitted to aerobic exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **40**, 1253–1261.
- Gasparotto, J., Ribeiro, C. T., Bortolin, R. C., Somensi, N., Fernandes, H. S., Teixeira, A. A., Guasselli,**

- M. O. R., Agani, C. A. J. O., Souza, N. C., Grings, M., et al.** (2017). Anti- RAGE antibody selectively blocks acute systemic inflammatory responses to LPS in serum, liver, CSF and striatum. *Brain Behav. Immun.* **62**, 124–136.
- Gasparotto, J., Ribeiro, C. T., da Rosa-Silva, H. T., Bortolin, R. C., Rabelo, T. K., Peixoto, D. O., Moreira, J. C. F. and Gelain, D. P.** (2019). Systemic Inflammation Changes the Site of RAGE Expression from Endothelial Cells to Neurons in Different Brain Areas. *Mol. Neurobiol.* **56**, 3079–3089.
- Hamer, H. M., Jonkers, D. M. A. E., Vanhoutvin, S. A. L. W., Troost, F. J., Rijkers, G., de Bruijne, A., Bast, A., Venema, K. and Brummer, R.-J. M.** (2010). Effect of butyrate enemas on inflammation and antioxidant status in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis in remission. *Clin. Nutr.* **29**, 738–744.
- Ho, Y.-T., Shimbo, T., Wijaya, E., Kitayama, T., Takaki, S., Ikegami, K., Miyashita, K., Ouchi, Y., Takaki, E., Yamamoto, R., et al.** (2021). Longitudinal Single-Cell Transcriptomics Reveals a Role for Serpina3n-Mediated Resolution of Inflammation in a Mouse Colitis Model. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 547–566.
- Jena, G., Trivedi, P. P. and Sandala, B.** (2012). Oxidative stress in ulcerative colitis: an old concept but a new concern. *Free Radic. Res.* **46**, 1339–1345.
- Kerber, E. L., Padberg, C., Koll, N., Schuetzhold, V., Fandrey, J. and Winning, S.** (2020). The Importance of Hypoxia-Inducible Factors (HIF-1 and HIF-2) for the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **21**,.
- Kim, Y.-E., Lee, M., Gu, H., Kim, J., Jeong, S., Yeo, S., Lee, Y. J., Im, S.-H., Sung, Y.-C., Kim, H. J., et al.** (2018). HIF-1 α activation in myeloid cells accelerates dextran sodium sulfate-induced colitis progression in mice. *Dis. Model. Mech.* **11**,.
- Kovac, S., Angelova, P. R., Holmström, K. M., Zhang, Y., Dinkova-Kostova, A. T. and Abramov, A. Y.** (2015). Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1850**, 794–801.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S. and Stadtman, E. R.** (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.* **186**, 464–478.
- Li, H.-S., Zhou, Y.-N., Li, L., Li, S.-F., Long, D., Chen, X.-L., Zhang, J.-B., Feng, L. and Li, Y.-P.** (2019). HIF-1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria. *Redox Biol.* **25**, 101109.
- Manresa, M. C. and Taylor, C. T.** (2017). Hypoxia inducible factor (HIF) hydroxylases as regulators of intestinal epithelial barrier function. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 303– 315.
- Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X. and Thomas, P. D.** (2019). PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **47**, D419–D426.
- Pryde, S. E., Duncan, S. H., Hold, G. L., Stewart, C. S. and Flint, H. J.** (2002). The microbiology of

butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol. Lett.* **217**, 133–139.

Ren, J., Xu, Y., Liu, J., Wu, S., Zhang, R., Cao, H. and Sun, J. (2021). MAP3K8 is a prognostic biomarker and correlated with immune response in glioma. *Front. Mol. Biosci.* **8**, 779290.

Rogler, G. (2014). Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Lett.* **345**, 235–241.

Sauer, J., Richter, K. K. and Pool-Zobel, B. L. (2007). Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *J. Nutr. Biochem.* **18**, 736–745.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N.,

Schwikowski, B. and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504.

Spichak, S., Donoso, F., Moloney, G. M., Gunnigle, E., Brown, J. M., Codagnone, M., Dinan, T. G. and Cryan, J. F. (2021). Microbially-derived short-chain fatty acids impact astrocyte gene expression in a sex-specific manner. *Brain Behav. Immun. Health* **16**, 100318.

Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., et al. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* **49**, D605–D612.

Tong, L.-C., Wang, Y., Wang, Z.-B., Liu, W.-Y., Sun, S., Li, L., Su, D.-F. and Zhang, L.-C.

(2016). Propionate Ameliorates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis by Improving Intestinal Barrier Function and Reducing Inflammation and Oxidative Stress. *Front. Pharmacol.* **7**, 253.

Wardyn, J. D., Ponsford, A. H. and Sanderson, C. M. (2015). Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 621–626.

Xing, X., Jiang, Z., Tang, X., Wang, P., Li, Y., Sun, Y., Le, G. and Zou, S. (2016). Sodium butyrate protects against oxidative stress in HepG2 cells through modulating Nrf2 pathway and mitochondrial function. *J. Physiol. Biochem.* **73**, 405–414.

Yang, T., Rodriguez, V., Malphurs, W. L., Schmidt, J. T., Ahmari, N., Sumners, C., Martyniuk, C. J. and Zubcevic, J. (2018). Butyrate regulates inflammatory cytokine expression without affecting oxidative respiration in primary astrocytes from spontaneously hypertensive rats. *Physiol. Rep.* **6**, e13732.

Youm, Y.-H., Nguyen, K. Y., Grant, R. W., Goldberg, E. L., Bodogai, M., Kim, D.,

D'Agostino, D., Planavsky, N., Lupfer, C., Kanneganti, T. D., et al. (2015). The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat. Med.* **21**, 263–269.

4. Discussão

4.1 O tratamento com butirato atenua a severidade da UC.

Como podemos observar a partir dos resultados, a administração de DSS na água por 7 dias funcionou como um modelo de UC, comprovado pela diminuição do peso dos animais, aumento do score histológico e diminuição do tamanho do cólon. A inflamação constante do cólon gera o encurtamento dessa porção intestinal, sendo uma das características da UC. Também podemos observar a eficácia do modelo quando observamos a diferença nas avaliações histológicas do cólon, na figura 2 do artigo. O tratamento com butirato atenuou a severidade da colite, através de mecanismos anti-inflamatórios, comprovado pela diminuição de TNF- α circulante e pela promoção da integridade da barreira intestinal, comprovado pela recuperação do imuno conteúdo das proteínas de junção e oclusão Claudina-5 e Ocludina. O efeito direto no cólon é um dos principais mecanismos pelo qual o butirato é capaz de atenuar a severidade da colite, visto que sua ligação com os receptores de ácidos graxos intestinais promove a recuperação do epitélio.

4.2 Estresse oxidativo e a regulação das enzimas antioxidantes na colite ulcerativa

O teste TBARS é utilizado como um marcador clássico de lipoperoxidação, ele mede a quantidade de malondialdeído (MDA), que é um dos subprodutos da lipoperoxidação. Apesar de observarmos a formação de MDA em outras rotas metabólicas, a presença aumentada desse marcador, aliado com outras técnicas que mensuram moléculas oxidadas, nos dá um indício do balanço redox celular. Também utilizamos as técnicas Carbonil e Sulfidril (SH) para medir estresse oxidativo, ambas as técnicas mensuram principalmente proteínas oxidadas. O teste de sulfidril também leva em consideração a glutathione, que pode estar na sua forma oxidada ou reduzida, dependendo do balanço redox da célula. Observamos um

aumento em todos os marcadores de estresse oxidativo no intestino dos animais que receberam DSS. Esse aumento do estresse oxidativo é demonstrado pelo aumento dos marcadores de moléculas oxidadas, TBARS e CARBONIL. O ensaio SH é uma técnica que mensura a quantidade de grupamentos tióis reduzidos, então quanto maior a marcação de grupamentos reduzidos, menor será o estresse oxidativo. Observamos uma diminuição de grupamentos reduzidos no grupo DSS, também indicando um desbalanço redox desse órgão.

Nossos resultados evidenciaram que a atividade das enzimas antioxidantes está diretamente relacionada com a severidade das doenças inflamatórias intestinais. Visto que as enzimas antioxidantes devem atuar juntas para completar a detoxificação de alguns radicais livres, como é o caso do superóxido, falhas na regulação da produção de enzimas de defesa acarreta numa pior progressão da doença.

A deficiência de SOD1, por exemplo, piora o quadro de colite ulcerativa em camundongos. Essa piora no quadro é revertida quando administrada SOD bacteriana por gavagem ([Hwang et al. 2020](#)). A produção de SOD afeta também a infiltração de células imunes no epitélio intestinal, que é responsável pela inflamação do tecido na colite ulcerativa ([Hwang et al. 2020](#)).

Quando olhamos para a rede de proteínas na figura 12 do artigo, podemos observar que a SOD2, mas não a SOD1, é a mais afetada pela administração de DSS. A SOD2, por estar presente na matriz mitocondrial da célula, tem um papel mais importante na via de estresse oxidativo e inflamação no modelo de DSS para DIIs (figura 12 do artigo). No ensaio enzimático realizado, não diferenciamos as atividades específicas para cada tipo de SOD. Quando observarmos um aumento na atividade da enzima no grupo DSS+Butirato, os resultados da rede de proteínas sugerem que a SOD2 tenha sido a mais afetada e esse desbalanço mitocondrial esteja relacionado com um aumento de estresse oxidativo e inflamação. Nesse sentido a ativação do complexo do inflamossomo NLRP3 ajuda a elucidar parte dos resultados.

O NLRP3 é complexo proteico citosólico que está presente nos mamíferos e está associado à resposta imune inata e à mecanismos de reconhecimento molecular de patógenos (PAMPs). Sua ativação gera uma resposta inflamatória local e muitas vezes como consequência, estresse oxidativo. O estresse oxidativo

também é um gatilho para a ativação de NLRP3, previamente acreditávamos que a ativação do inflamossomo era causada pela geração de espécies reativas pela NAPH oxidase. Entretanto, artigos mais recentes trazem que a inibição de NAPH oxidase não afeta a ativação de NLRP3 ([van Bruggen et al. 2010](#)). Por outro lado, o acúmulo de espécies reativas na mitocôndria gera estresse oxidativo mitocondrial, e tanto o desbalanço de espécies reativas na mitocôndria quanto oxidação do material genético mitocondrial ativa NLRP3 ([Nakahira et al. 2011](#)).

A administração de ácidos graxos de cadeia curta também é capaz de modular a ativação do inflamossomo NLRP3. Essa capacidade anti-inflamatória provavelmente se dá através da ação dos receptores específicos para SCFA no intestino, conhecidos como GPR41 e GPR43 (também conhecidos como FFARs) ([Brown et al. 2003](#)). Trabalhos anteriores mostraram que a ativação desses receptores causa uma ação anti-inflamatória ([Sivaprakasam et al. 2016](#)). Ao encontro desse pensamento, estudos com indução de inflamação através de LPS mostraram que a administração de butirato é capaz de inibir a ativação do complexo inflamatório NLRP3 ([Feng et al. 2018](#)).

Existe também a ativação não canônica de NLRP3, que independe de TLR4. Foi demonstrado que a ativação não-canônica de NLRP3 responde à presença de bactérias gram-negativas, mas não às gram-positivas ([Hagar et al. 2013](#)). Apesar do butirato ser produzido por uma grande gama de bactérias, a maioria delas pertence ao filo *Firmicutes*, um filo de bactérias gram-positivas, o que pode explicar em parte o potencial antiinflamatório de seus metabólitos ([Zhu et al. 2021](#)).

A administração de butirato também aumentou a translocação para o núcleo do fator de transcrição Nrf2. Ao longo da evolução os organismos precisaram desenvolver ferramentas capazes de reconhecer o desbalanço redox. O Nrf2 é um fator de transcrição ativado pelo aumento de espécies reativas dentro da célula. Ele atua como um sensor de estresse oxidativo, regulando diversos genes relacionados com a resposta antioxidante, com destaque para as rotas de recuperação dos intermediários reduzidos GSH e NADPH. Tanto a Glutathione quanto o NADPH são utilizados como doadores de elétrons na reação de neutralização de radicais livres pelas enzimas antioxidantes. A relação entre esses intermediários também é importante, visto que o NAPH é utilizado como doador de elétrons para a recuperação de GSH pela Glutathione Redutase ([Lu 2013](#)).

O Nrf2 fica preso à um complexo com duas proteínas chamadas de kelch-like ECH associated protein 1 (Keap1) (Itoh et al. 1999). O complexo proteico fica localizado no citosol da célula até sofrer oxidação por um agente estressor. Após a sinalização oxidativa, esse complexo proteico é rapidamente degradado e permite a translocação do fator de transcrição até o núcleo, onde pode exercer o seu papel. O Nrf2, quando é translocado, se liga à elementos de resposta antioxidante (AREs do inglês) nas regiões promotoras responsáveis pela proteção antioxidante da célula. A maior parte dos ativadores de NRF2, endógenos e exógenos, são moléculas eletrofílicas capazes de oxidar diferentes resíduos de cisteína na estrutura da Keap1, levando a sua inativação (Hayes and Dinkova-Kostova 2014).

Como observamos nos nossos resultados, os DSS causa estresse oxidativo no cólon dos animais e altera a homeostase redox intestinal, que é diretamente afetada pela administração do butirato. O tratamento com butirato foi capaz de atenuar o estresse oxidativo no intestino através da regulação de enzimas antioxidantes e fatores de transcrição envolvidos na síntese dessas enzimas.

4.3 HIF-1 α na colite ulcerativa.

HIF-1 (Hypoxia inducible fator 1) é um fator de transcrição envolvido na resposta à hipoxia, atuando em situações de infecção e inflamação, também estando envolvido na angiogênese de tumores.

O deslocamento de células imunes para o local da inflamação acarreta num aumento na pressão intersticial no tecido. Após a mobilização, o consumo de oxigênio pelo metabolismo dessas células imunes, junto com o aumento da pressão local, contribui para a diminuição dos níveis de oxigênio do tecido.

Essa combinação de fatores causa uma hipoxia localizada que regula a ativação dos HIFs.

HIFs são heterodímeros que consistem em uma subunidade HIF-1 β , que é expressa constitutivamente, e uma subunidade HIF- α (1 α , 2 α ou 3 α) que é dependente de O₂. A regulação de HIF-1 α e HIF-2 α ocorre no nível pós- traducional

por hidroxilação específica de prolina e aspargina. Essa regulação se dá através de três isoformas de prolil hidroxilase (PHDs). A PHD2 regula predominantemente HIF-1 α , enquanto PHD1 e PHD3 mostram uma maior afinidade para HIF-2 α ([Appelhoff et al. 2004](#)).

A hidroxilação de PHDs é dependente de O₂, que inicia a degradação proteossomal da proteína HIF-1 α em condições de O₂ elevado. Em situações de hipóxia como durante a inflamação do tecido, os PHDs são inativos, o que leva a uma degradação reduzida e uma maior translocação nuclear de HIF-1 α . ([Fujita et al. 2012](#)).

No núcleo, o HIF- α forma um heterodímero com HIF-1 β e se liga aos HREs (elementos de resposta à hipóxia) do gene alvo. O complexo ativo inicia então a transcrição dos genes-alvo do HIF. Existem mais de 60 genes alvo do HIF-1a, mas a maioria dos trabalhos envolvendo esse fator de transcrição é focado na capacidade de recuperação gerada pela ativação do HIF-1a.

Utilizamos o HIF-1a na rede de interação proteica para avaliar os resultados de trabalhos prévios usando o modelo de DSS para a UC. Segundo nossa rede de interação, observamos que na maioria dos trabalhos temos uma ativação de HIF-1a após a instalação do quadro de colite ulcerativa. No nosso trabalho, observamos um resultado contrário ao esperado, de acordo com a literatura.

Apesar de contraditório numa primeira análise, outros artigos mostram a importância da ativação de HIF-1a na proteção contra o estresse oxidativo causado pela UC (Li et al., 2019). Ele também é necessário para a recuperação da barreira intestinal, promovendo sua integridade através da estimulação de proteínas de junção e oclusão (Fachi et al., 2019). Também observamos que a superexpressão de HIF-1a após a indução de colite ulcerativa é célula dependente. Em células mieloides intestinais, a ativação desse fator de transcrição causa um aumento na severidade da doença, enquanto sua ativação em células dendríticas gera um efeito protetor contra a UC (Kim et al. 2018).

4.4 Neuroinflamação

Nossos resultados sugerem que, no modelo de UC utilizado, houve um aumento na permeabilidade intestinal,, o que ocasiona um aumento na entrada de bactérias, antígenos e toxinas do lúmen para a circulação, fenômeno conhecido como Leaky Gut ([Camilleri 2019](#)). Esse aumento da permeabilidade é observado na diminuição das proteínas Claudina-5 e Ocludina no tecido do cólon. A entrada de moléculas inflamatórias e imunomodulatórias é a causa mais provável da neuroinflamação observada no cérebro dos animais que receberam DSS.

IBA-1 (do ingles ionized calcium-binding adapter molecule 1), também conhecido como AIF-1, é uma proteína que está presente no citoplasma de macrófagos e células da microglia e está superexpresso quando temos a ativação dessas células. A proteína IBA-1 é amplamente utilizada como marcador neuroinflamação, já que está diretamente relacionada com a infiltração das células imunes em tecidos periféricos ou com a ativação da microglia no tecido neural. Apesar desse marcador ser expresso homogeneamente no citosol da célula e estar presente tanto na microglia ativa quanto inativa, sabemos que quando ocorre o processo inflamatório no SNC temos a superexpressão de IBA-1 pelas células gliais ([Calcia et al. 2016](#)).

O Tratamento com butirato foi capaz de atenuar a neuroinflamação, observado na diminuição do marcador de ativação microglial IBA-1 na região do cortex prefrontal. Os mecanismos dos efeitos protetores são através da regulação da barreira intestinal ([Chen et al. 2018](#)), e dos efeitos anti- inflamatórios na circulação sanguínea ([Ji et al. 2016](#)). Esses efeitos anti- inflamatórios são observados, em parte, pela regulação do inflamossomo NLRP3 ([Feng et al. 2018](#)). Nossos resultados demonstram também uma diminuição da inflamação sistêmica, observados na diminuição da citocina proinflamatória TNF- α nos animais do grupo Butirato+DSS comparados com os animais do grupo DSS, essa redução na inflamação sistêmica atenua o aumento de permeabilidade da BHE, podendo ser um mecanismo de diminuição da neuroinflamação do cortex prefrontal.

4.5 RAGE e a Neuroinflamação

o RAGE (do inglês receptor for advanced glycation end products) é um receptor transmembrana da família das imunoglobulinas, ele possui uma parte localizada na porção extracelular, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática intracelular ([Sessa et al. 2014](#)). Estudos anteriores demonstraram que o RAGE possui uma ampla diversidade de ligantes, mas sua caracterização é como um receptor de produtos de glicação avançada (AGEs). A glicação é um processo de ligação de um açúcar com uma proteína, que acontece de maneira não enzimática, diferente da glicosilação.

A ligação do RAGE com seus ligantes gera uma resposta de ativação em várias vias de sinalização, como MAPKs (do inglês Mitogen Activated Protein Kinases), JAK (Janus Kinase), e STATs (do inglês: signal transducers and activators of transcription).

A proteína Stat-3 é um fator de transcrição envolvido em vias de sinalização antiapoptóticas e promotoras de crescimento (JAK-STAT). Além de suas atividades como fator de transcrição, o Stat3 está presente nas mitocôndrias, onde é necessário para a atividade ótima da cadeia transportadora de elétrons e protege contra a disfunção mitocondrial induzida pelo estresse oxidativo ([Han and Theiss 2014](#)). Esse fator de transcrição é ativado por diversas interleucinas (IL-6, IL-17, IL-22) e está associado à uma resposta inflamatória. A ativação crônica dessa via em células epiteliais intestinais está associada aos casos de IBDs. Sua ativação é necessária para o reparo do epitélio intestinal e animais K.O para Stat3 são mais suscetíveis à modelos de UC ([Pickert et al. 2009](#)).

A via de resposta inflamatória NF- κ B/c-Jun/MAPK, que é ativada pelo RAGE também é importante na progressão e severidade dos casos de UC. O modelo de DSS por causar intensa inflamação epitelial ativa essa via de sinalização, e tratamentos capazes de atenuar a severidade da doença passam pela inibição dessa via ([Sharma et al. 2020; Sánchez-Fidalgo et al. 2014](#)).

Fizemos uma análise qualitativa da imunorreatividade RAGE no córtex pré-frontal. Os grupos controle, butirato e DSS mostraram conteúdo semelhante de

vasos com marcação positiva para RAGE. Aparentemente, os animais do grupo DSS+BUT apresentaram uma maior marcação para RAGE nos vasos sanguíneos, principalmente no córtex pré-frontal. Além disso, em nenhum dos grupos tivemos a marcação de RAGE em células com morfologia neuronal (Figura 2 anexo 1).

A comunicação do RAGE com as vias inflamatórias acontece por diversos caminhos, e a regulação dessas vias influencia diretamente DIIs. A neuroinflamação que ocorre nos animais que receberam DSS passa pelo RAGE, porém ainda não sabemos exatamente quais os mecanismos por trás disso. Apesar da análise utilizada ser qualitativa, podemos ver claramente uma marcação diferente de RAGE, nos animais que receberam DSS e principalmente nos que receberam DSS+Butirato. O aumento da permeabilidade de barreiras, tanto intestinal quanto hemato encefálica, permite que o butirato interaja diretamente com o SNC, aumentando também os seus efeitos no SNC.

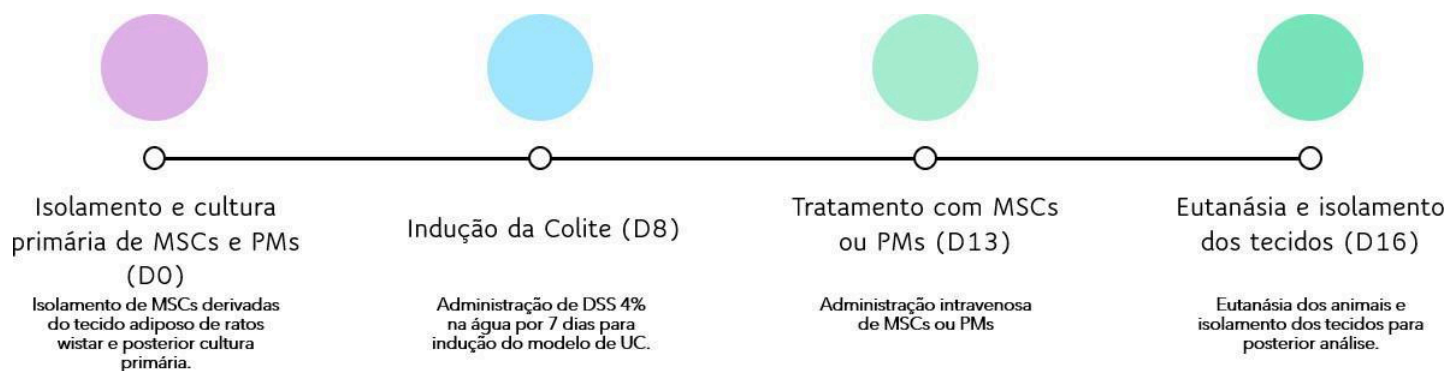
Sabemos que o RAGE está associado com modelos de neuroinflamação, a inflamação sistêmica aumenta a marcação de RAGE e muda a localização do receptor de células endoteliais para neurônios, incluindo o cortex prefrontal e o hipocampo ([Gasparotto et al. 2019](#)). Apesar do resultado intrigante, mais estudos serão necessários para elucidar o papel do RAGE nas DIIs.

Parte II

5.1 Artigo em português a ser submetido:

6. Materiais e Métodos:

6.1 Desenho experimental



6.2 Cultura Primária, Administração e Dose MSCs e PMs:

A cultura de células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cells* - MSC) foi realizada a partir de células do tecido adiposo oriundas da gordura epididimal. Foram utilizados 6 ratos Wistar de 60 dias para o isolamento das MSCs. Os animais foram eutanasiados por overdose de Isoflorano seguido de deslocamento cervical. Os animais foram banhados em álcool 70% e dissecados dentro do fluxo laminar. O tecido removido foi coletado em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco, NM, EUA) suplementado com 100 IU/ml penicilina, 100 mg/ml streptomicina (P/S) (Gibco) e 2 mM L-glutamina (Gibco).

Em seguida, a amostra foi mecanicamente cortada em pequenos pedaços com lâmina de bisturi e, após duas lavagens com solução salina (*phosphate-buffered saline* - PBS), foi digerida enzimaticamente com 1 mg/ml colagenase tipo I (Gibco) em DMEM por 30 min a 37°C sob agitação contínua. Para cessar a atividade da enzima, foi adicionado meio de cultura com soro, seguido de centrifugação a 600 x g por 10 min para sedimentação do tecido.

Sequencialmente, as células foram ressuspensas em DMEM com 15% soro fetal bovino (*fetal bovine serum* – FBS; Gibco) e 1% P/S, filtrado através de 70 µm de filtro celular, e transferidas para frasco de cultura de 175 cm² (Greiner Bio-one, Essen, Alemanha). As culturas foram mantidas a 37°C, 5% CO₂, e 95% de umidade; e o meio de cultura, DMEM suplementado com 1% P/S e 15% FBS, trocado uma vez por semana. Quando as culturas atingiram 90% de confluência, as células aderentes foram removidas dos frascos de cultura com 0.05% tripsina-EDTA (Gibco) a 37°C. Para os experimentos, foram utilizadas passagens celulares entre 2-5.

6.2.2 Grupos experimentais:

Grupo Controle: Injeção de Salina Estéril (NaCl 0.9%) via veia caudal. Administração de água *ad libitum*.

Grupo DSS: Administração de Salina (NaCl 0.9%) via veia caudal. Administração de DSS 2% na água *ad libitum*.

Grupo MSCs: Injeção de MSCs (6 x 10⁹) via veia caudal. Administração de água *ad libitum*.

Grupo PMs: Injeção de PMs (6×10^9) via veia caudal. Administração de água *ad libitum*.

Grupo MSCs + DSS: Injeção de MSCs (6×10^9) via veia caudal. Administração de DSS 2% na água *ad libitum*.

Grupo PMs + DSS: Injeção de PMs (6×10^9) via veia caudal. Administração de DSS 2% na água *ad libitum*.

6.3 Indução de colite:

Foi induzida inflamação intestinal nos animais através da adição de 4% Sulfato de Sódio de Dextran (DSS; peso molecular 36 000 – 50 000 Da) na água (Martin *et al.*, 2016). Brevemente, esse modelo consiste na adição de um detergente na água. O DSS forma nano-lipocomplexos associados com ácidos graxos de cadeia média que estão presentes no lúmen, principalmente do cólon intestinal. Esses complexos são capazes de se fundir com a membrana plasmática dos colonócitos. Essa fusão gera um sinal inflamatório exacerbado no cólon, mimetizando doenças inflamatórias intestinais (Laroui *et al.*, 2012).

6.4 Avaliações Clínicas

Os animais foram observados diariamente em relação aos parâmetros perda de peso, consistência das fezes, e presença de sangue nas fezes e nos anus. Para cada parâmetro foi atribuído um escore de 0 a 4, resultando na pontuação total do IAD de 0 (não afetado) a 12 (doença severa). O índice de atividade da doença (IAD) foi determinado por investigadores que desconhecem a composição dos grupos experimentais. Caso algum animal apresentasse IAD igual a 12 durante o experimento, seria induzida a morte humanitária utilizando-se a sobredose anestésica de isoflurano (isoflurano 5% vaporizado em 100% O₂ 0.5 l/min), nenhum animal atingiu IAD igual à 12 durante o experimento.

6.5 Análise Histológica

Os cólons foram fixados em 10 % formalina tamponada por 24h, processados e incluídos em parafina para que fossem obtidos cortes mediais longitudinais de 4 µm de espessura. As amostras foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E), e foi utilizada a escala de Dieleman (Dieleman *et al.*, 1998) para a avaliação histológica, com os seguintes critérios:

- A. Gravidade da inflamação (0-3)
- B. Profundidade 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), profundidade 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.

6.6 Local, forma de confinamento e tratamento dos animais

Os animais deste estudo foram obtidos do CREAL, e mantidos sob condições padrão especificadas pelo *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*, pelas diretrizes de bem-estar em animais de laboratório e de biossegurança em experimentação animal da Sociedade Brasileira de Experimentação Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e de acordo com a Lei Federal n. 11794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o uso de animais em pesquisa. Os animais de forma humanitária pelos executores, sempre respeitando a resolução nº 879, de 15 de fevereiro de 2008, seguindo os 3 “R’s” da experimentação animal. Os profissionais envolvidos no projeto têm experiência no manejo de animais de

experimentação e tem capacidade comprovada para exercer tal função.

O biotério onde os animais ficaram alojados dispõe de um veterinário, e possui condições de manter os animais de acordo com a espécie, garantindo que o espaço físico e as condições de higiene e saúde sejam respeitados. A proteção contra predadores, vetores, vermes e outras pragas é garantida através de barreiras sanitárias apropriadas para cada tipo de alojamento e de modelo animal. As necessidades ambientais, como temperatura, iluminação, ventilação, interação social, higiene e controle de ruído e odor serão atendidas de acordo com a espécie. Os animais receberam nutrição adequada, não contaminada e de procedência controlada, diariamente em quantidade e qualidade apropriadas para garantir sua saúde e bem-estar

O trabalho foi realizado levando em consideração as normas estabelecidas pelo comitê de ética para pesquisa em modelos animais, levando em consideração a utilização do menor número de animais por grupo para manejo da dor e sofrimento durante os procedimentos do estudo e eutanásia (SBCAL, 2009; COBEA, 1996).

Todos os animais foram mantidos em caixas de propileno (30x20x13cm) com ciclo claro-escuro (12h), com acesso livre a água e dieta padrão comercial. Estas condições serão mantidas ao longo de todo o experimento.

Essas indicações seguem as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do §1º do artigo 225 da Constituição Federal, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais em pesquisa. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e usar o mínimo de camundongos necessário para obter resultados científicos confiáveis.

6.7 Sequenciamento e Análises de Bioinformática:

Foi coletado o conteúdo fecal dos animais e extraído DNA. Para análise metagenômica os fragmentos dos genes 16S foram submetidos ao sequenciamento de alto desempenho. Os dados obtidos foram analisados com a pipeline DADA2 e através de pacotes de ecologia no R.

7. Resultados e Discussão

7.1 Cultura primária de MSCs

Foram utilizados 6 animais de 60 dias para a cultura primária de MSCs, cada animal com aproximadamente 4g de gordura epididimal.

Tubo	Número de células
Tubo 1	$3,25 \times 10^6$ cells
Tubo 2	$3,10 \times 10^6$ cells
Tubo 3	$2,95 \times 10^6$ cells

Tabela 2. Rendimento de células a partir de tecido adiposo epididimal de Ratos.

Para o tratamento com PMs, utilizamos a mesma quantidade de células, porém fracionadas por ultracentrifugação.

7.2 Ganho de Peso, DAI e Avaliação histológica do cólon:

Não houve diferença estatística entre os grupos no ganho de peso. Entretanto, podemos observar que o único grupo que apresentou perda de peso foi o grupo DSS (Fig 6A). A administração de DSS por 7 dias foi suficiente para causar um quadro de UC, demonstrado pela avaliação clínica (DAI) dos animais e pela avaliação histológica da porção do cólon. O tratamento com MSCs e PMs foi capaz de atenuar o quadro de UC, reduzindo o DAI e atenuando o dano epitelial observado pela avaliação histológica do intestino (Fig 7).

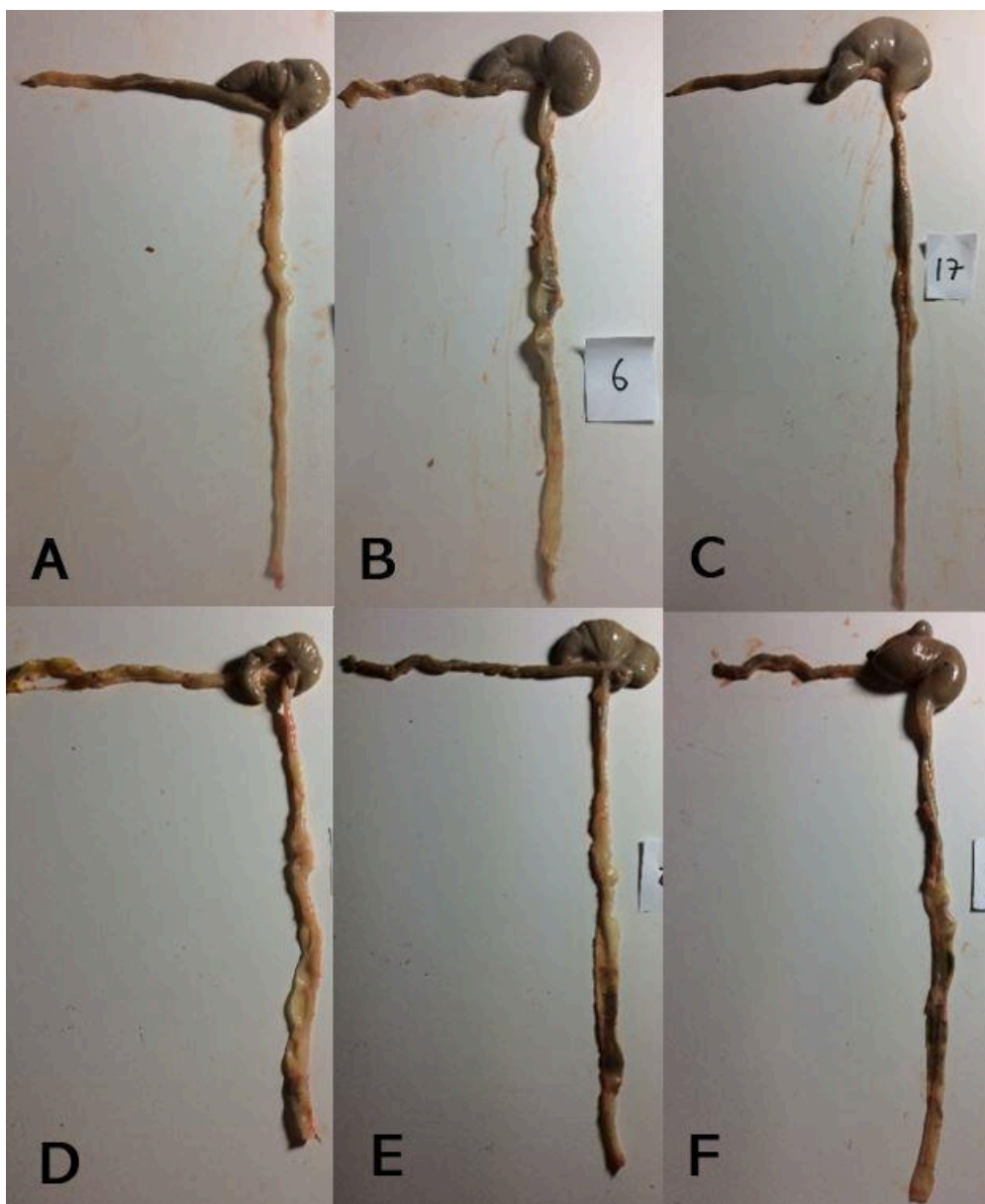


Figura 5. Foto representativa do Intestino dos animais. (A) Controle. (B) H2O +MSCs. (C) H2O + PMs. (D) DSS. (E) DSS+MSCs. (F) DSS + PMs

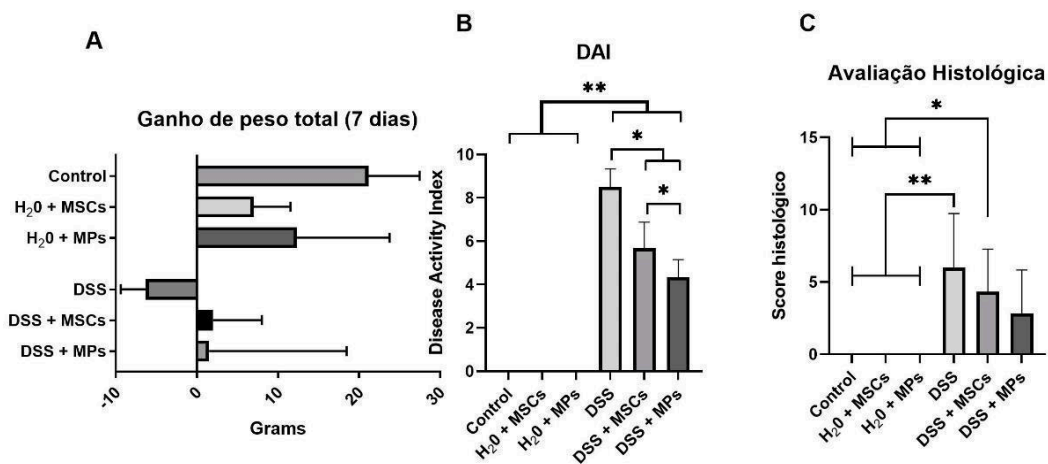


Figura 6. (A) Ganho de peso ao longo do tratamento com DSS. **(B) Disease activity Score (DAI)** dos grupos ao final do tratamento. **(C) Avaliação histológica** do colon dos animais tratados. (* = $p < 0.05$) (** = $p < 0.01$) $n = 6$.

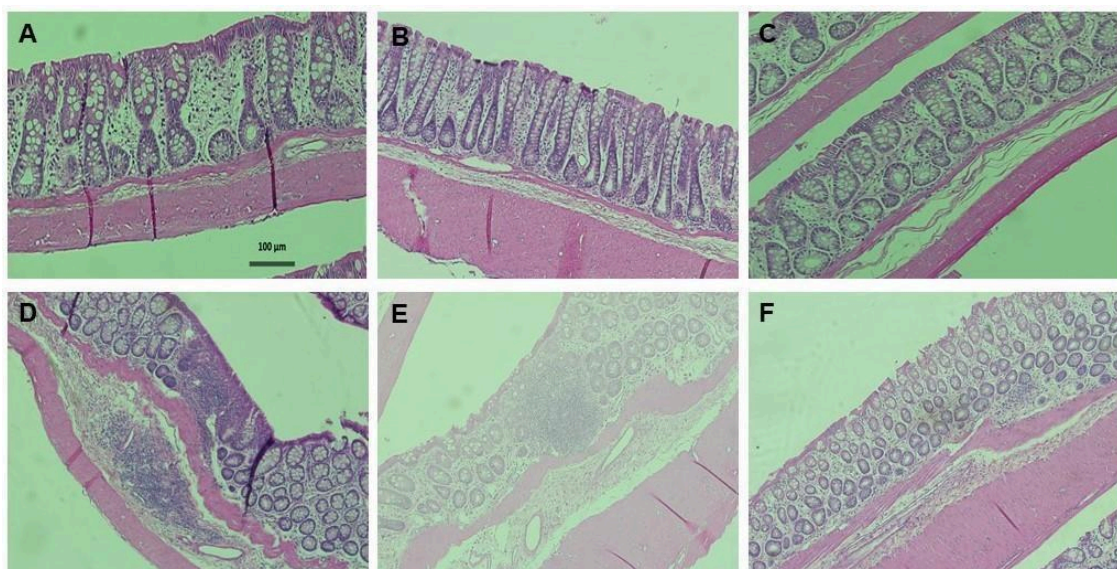


Figura 7. Lâminas representativas da Avaliação Histológica do Colon dos animais. (A) Controle. (B) H₂O + MSCs. (C) H₂O + PMs. (D) DSS. (E) DSS + MSCs. (F) DSS + PMs

7.3 Citocinas Proinflamatórias:

Foram quantificadas duas citocinas proinflamatórias no soro dos animais. Podemos observar que o grupo DSS apresentou um aumento nas quantidades de TNF- α circulantes quando comparamos com todos os outros grupos. O tratamento com MSCs ou com PMs reverteu o quadro proinflamatório causado pelo DSS, retornando ao nível do controle essa citocina (Figura 8). Esse efeito era esperado, tanto pelas MSCs quanto pelas PMs, segundo suas propriedades anti-inflamatórias em um ambiente pro- inflamatório. O tratamento apenas com as PMs das células mesenquimais possui um efeito semelhante ao tratamento com as células inteiras, isso se dá pela capacidade das células imunes de se ligar com as PMs, sem precisar da célula intacta para que isso ocorra.

Trabalhos anteriores reportaram que a administração de MSCs pode induzir a produção de IL-1 β pelos monócitos ([de Witte et al. 2018](#)), entretanto, não observamos diferença estatística entre os grupos na quantidade de IL-1 β no soro dos animais.

Citocinas proinflamatórias no Soro

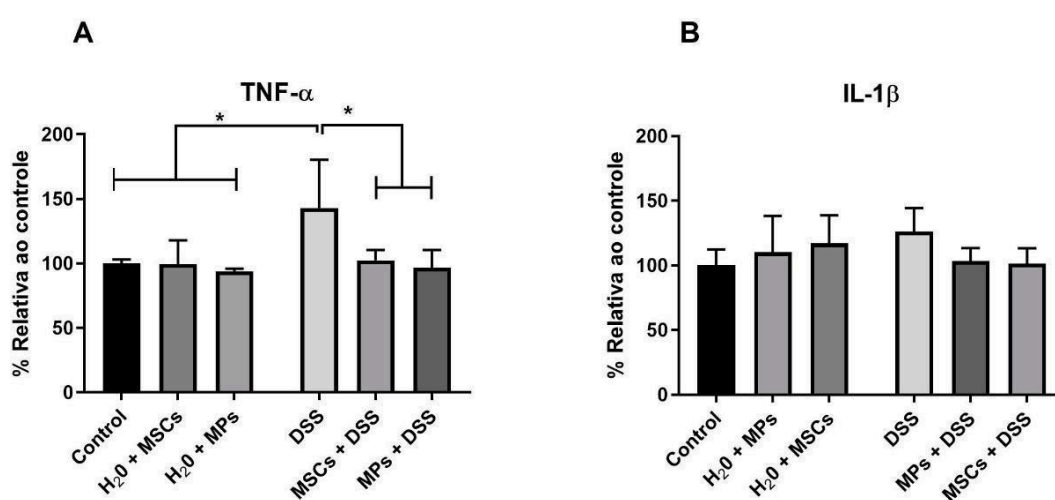


Figura 8. Citocinas proinflamatórias no soro dos animais. (A) TNF- α .(B) IL-1 β .

7.4 Sequenciamento do Microbioma:

7.4.1 Riqueza e Diversidade do Microbioma Intestinal:

Para medir a diversidade e a riqueza do ecossistema microbiano, utilizamos o pacote VEGA, no R. Esse pacote é comumente utilizado para avaliarmos mais de um teste ecológico no mesmo grupo de amostragem. Trabalhos recentes demonstraram que o índice Shannon é um dos mais adequados quando se trata de diversidade microbiana ([Feranchuk et al. 2018](#)). Já o índice Chao1 é um dos mais utilizados na literatura para avaliar a riqueza da comunidade microbiana. A riqueza da comunidade leva em consideração apenas o número de espécies e clados diferentes dentro de um ecossistema. Já diversidade é um índice que leva em consideração a riqueza e a abundância das espécies em determinado ecossistema. Pacientes humanos e modelos murinos de UC apresentam reduções significativas na diversidade da microbiota gastrointestinal, necessária para manutenção da homeostase imune ([Wang et al. 2019](#)). Tanto riqueza quanto diversidade são indicativos do balanço ecológico do microbioma intestinal, sabemos que doenças e condições que possuem um forte viés microbiano geralmente causam uma perda desses dois parâmetros em indivíduos afetados. Um ótimo exemplo disso é que os pacientes com colite ulcerativa apresentam uma perda de diversidade no microbioma intestinal e tratamentos focados nesse parâmetro como o transplante de microbioma e tratamentos com probióticos tem um grande potencial terapêutico em DIIs ([Gong et al. 2016](#)).

Podemos observar uma diminuição na riqueza e na diversidade microbiana no grupo DSS, quando comparado com o grupo controle, no teste de Shannon e no teste Chao1 (Fig. X). Não observamos diferença no índice Simpson, que também é utilizado em estudos de ecologia microbiana. Os tratamentos com MSCs e com PMs são capazes de atenuar a perda de diversidade no microbioma dos animais que receberam DSS, apontando o potencial terapêutico do tratamento.

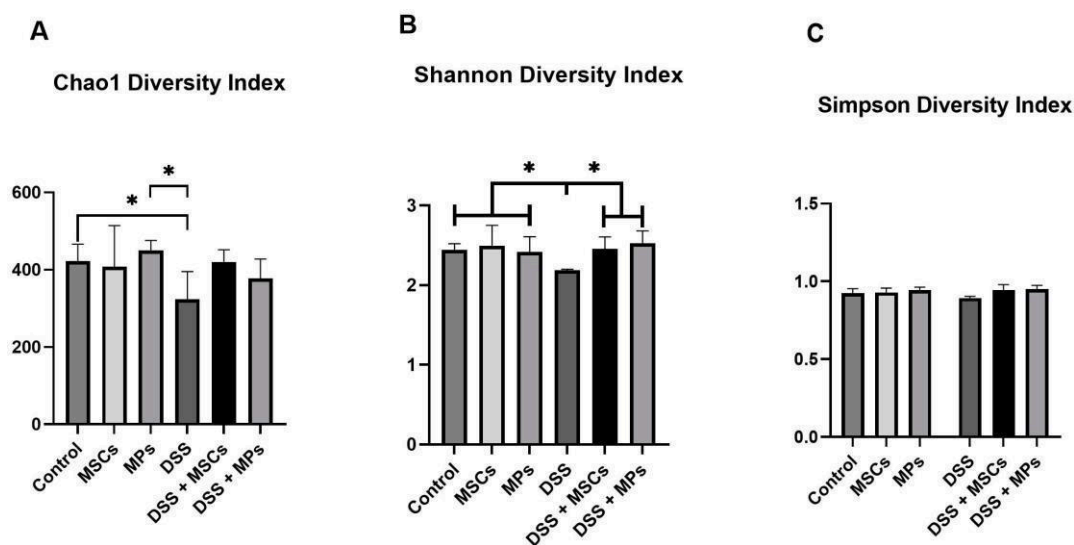


Figura 9. Análises de Diversidade e Riqueza microbiana no ecossistema intestinal.

Alterações no Microbioma Intestinal:

Proteobacteria

Observamos um aumento na abundância do filo Proteobactéria no grupo DSS quando comparado com o grupo controle. Não houve diferença entre o grupo DSS e os grupos tratados com DSS+MSCs e DSS+PMs, porém também não houve diferença entre esses dois últimos grupos e o controle (Figura 10).

Trabalhos anteriores já descreveram um aumento na abundância do filo das Proteobactérias em pacientes com DIIs, principalmente com um quadro inflamatório ativo. Esse filo de bactérias agrupa muitas bactérias patogênicas, associadas com um pior quadro de inflamação intestinal ([Vester-Andersen et al. 2019](#)). Nossos resultados indicam que o tratamento com MSCs ou PMs foi capaz de impedir parcialmente o aumento na abundância desse filo nos animais que receberam DSS.

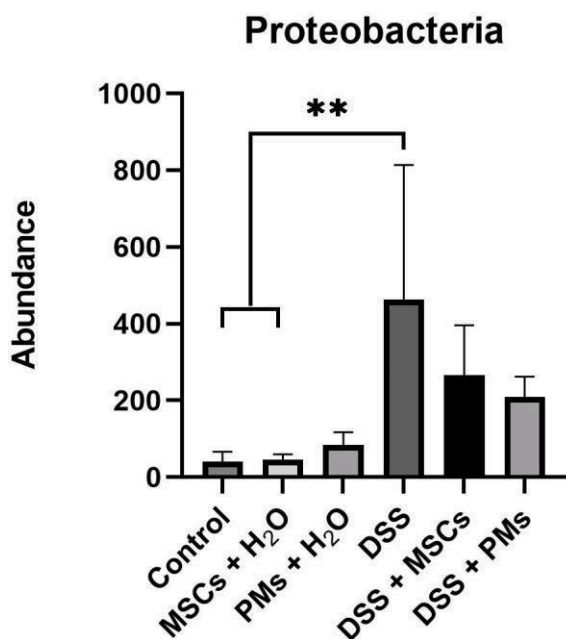


Figura 10. Abundancia do filo Proteobactéria no microbioma intestinal dos animais.

Firmicutes

Observamos uma diminuição significativa do filo *Firmicutes* no grupo DSS quando comparado com o controle. O tratamento com MSCs não foi capaz de atenuar a perda de abundância do filo *Firmicutes* nos animais que receberam DSS, já o tratamento com PMs retornou os níveis desse Filo a valores semelhantes ao Controle (Figura 11).

O filo *Firmicutes* agrupa muitas bactérias probióticas, inclusive diversas produtoras de SCFA. A diminuição dessa população de bactérias é associada com a reincidência de crises em pacientes com DIIs que descontinuaram o uso de inibidores de TNF- α (Rajca et al. 2014). A diminuição da citocina pro inflamatória TNF- α na circulação não parece estar relacionada com a abundância do filo *Firmicutes*, já que observamos uma diminuição de TNF- α também nos animais que tratados com DSS+MSCs e esse tratamento não foi capaz de recuperar os níveis de abundância desse filo no microbioma intestinal.

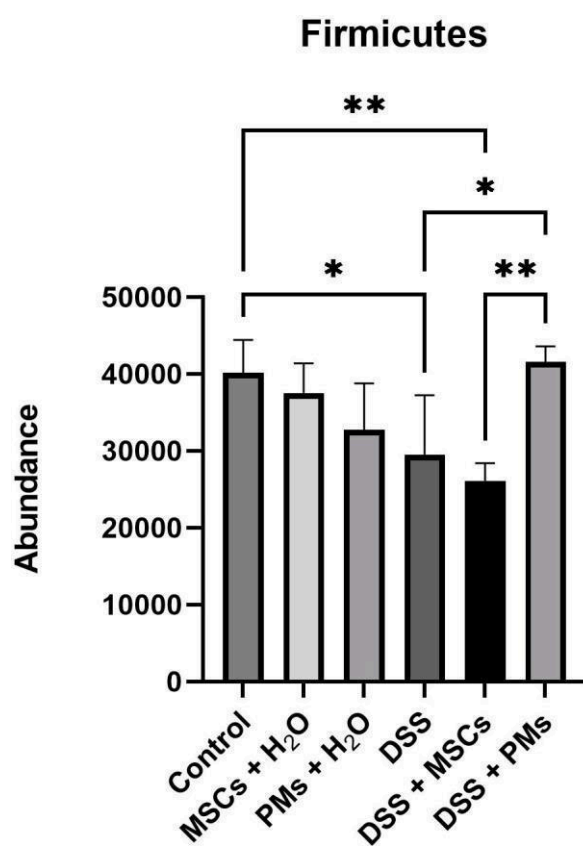


Figura 11. Abundância do filo Firmicutes no microbioma intestinal dos animais.

Escherichia/Shigela

Quando analisamos o microbioma até gênero, podemos ver um aumento significativo das bactérias do gênero *Escherichia/Shigela* (Figura 12). Esse gênero de bactérias é amplamente conhecido por suas espécies patogênicas e pacientes com DIIs apresentam uma maior abundância de *E.coli* patogênicas no microbioma intestinal ([Martinez-Medina et al. 2009](#)). O aumento da permeabilidade intestinal causada pela UC gera um aumento no aporte de bactérias e antígenos advindos do lúmen, esse efeito favorece a entrada de bactérias patogênicas oportunistas na circulação. Estudos anteriores observaram uma maior presença de *E. coli* no sangue de pacientes com DIIs internados em hospitais. Devido à rápida colonização e ampla presença desse grupo de bactérias no microbioma é comum observamos quadros de bacteremia causada por *E. coli* em pacientes com DIIs ([Gruszecka and Filip 2021](#)).

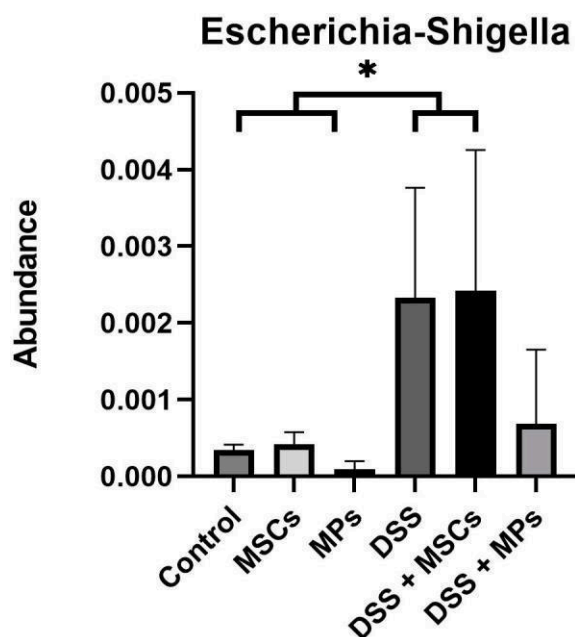


Figura 12. Abundancia do genero Escherichia/Shigella no microbioma intestinal dos animais.

Roseburia

O gênero *Roseburia* foi descrito anteriormente como um clado importante em DIIs, visto que esse gênero é um produtor de Butirato e é capaz de melhorar o quadro inflamatório intestinal em modelos de DIIs ([Ruan et al. 2022](#)). Nós observamos uma diminuição da população de *Roseburia* nos animais tratados com DSS, e o tratamento com PMs, mas não MSCs, foi capaz de retornar os níveis desse gênero para o controle (Figura 13). A presença desse grupo de bactérias é extremamente importante para a regulação da inflamação intestinal, tendo um potencial terapêutico como probiótico ([Ruan et al. 2022](#)).

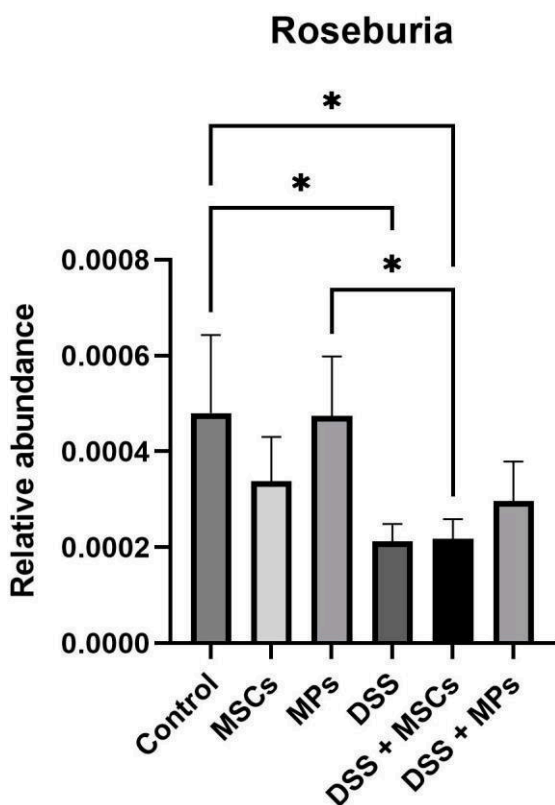


Figura 13. Abundância do gênero *Roseburia* no microbioma intestinal dos animais.

8. Conclusões:

8.1 Geral:

Animais que receberam DSS apresentam um aumento de permeabilidade intestinal e um maior estresse oxidativo no intestino. O modelo de UC também causa neuroinflamação no córtex pré-frontal, além de gerar disbiose e perda de diversidade no microbioma intestinal. O tratamento com butirato protege o intestino do estresse oxidativo através da ativação de defesas de fase II, e evita a perda de proteínas de junção associadas com a integridade do epitélio. Como consequência, o tratamento com butirato também protege o CNS da neuroinflamação observada na UC, através de mecanismos antiinflamatórios e de regeneração da integridade da barreira intestinal. Já o tratamento com MSCs é capaz de atenuar a perda de diversidade e melhorar a disbiose causada pela UC.

8.2 Específicas:

A administração de DSS aumenta o estresse oxidativo no intestino. Esse estresse oxidativo é causado por uma diminuição nas enzimas antioxidantes intestinais, que acontece a nível transcricional.

A UC causa um aumento de permeabilidade intestinal, que gera um maior aporte de moléculas próinflamatórias do lúmen para a circulação. Essa permeabilidade aumentada acarreta na neuroinflamação, demonstrada pela maior ativação da micróglia no córtex pré-frontal dos animais que receberam DSS. O tratamento com butirato é capaz de atenuar essa ativação, além de promover a integridade da barreira intestinal e a redução da inflamação sistêmica. O butirato também é capaz de proteger o intestino contra o estresse oxidativo, através da ativação do Nrf2, promovendo sua translocação para o núcleo e consequente ativação. O modelo de DSS causa disbiose, além de perda de diversidade microbiana no ecossistema intestinal. O tratamento com MSCs e PMs é capaz de atenuar a severidade da doença em ratos, assim como recuperar a diversidade e atenuar a disbiose observada.

9 Perspectivas futuras

- Avaliar os efeitos de um co-tratamento com butirato e PMs no modelo de DSS.
- Desvendar a aparente ativação do RAGE pela administração de butirato nos animais que receberam DSS.
- Realizar análises de metaboloma microbiano e avaliar o perfil do microbioma dos animais tratados com butirato.

Anexo 1 – Figuras complementares

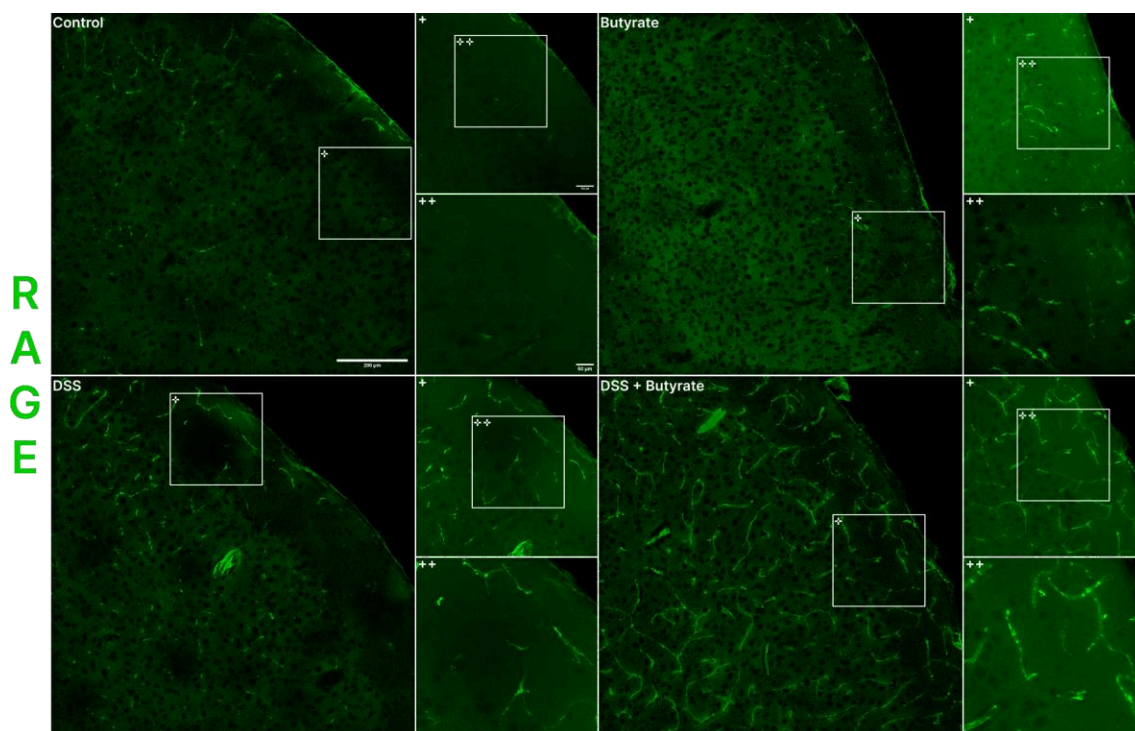


Figure 2 - Expression of RAGE in the prefrontal cortex. Representative images of RAGE labeling on prefrontal cortex slices (n=4-5 per group). Images were acquired using a laser-scanning Olympus®FV1000 confocal microscope. Scale bars = 200µm for 20x objective images, 100µm for 40x objective images (represented in the figure by +), and 50µm for digital zoom images (illustrated in the figure by ++).

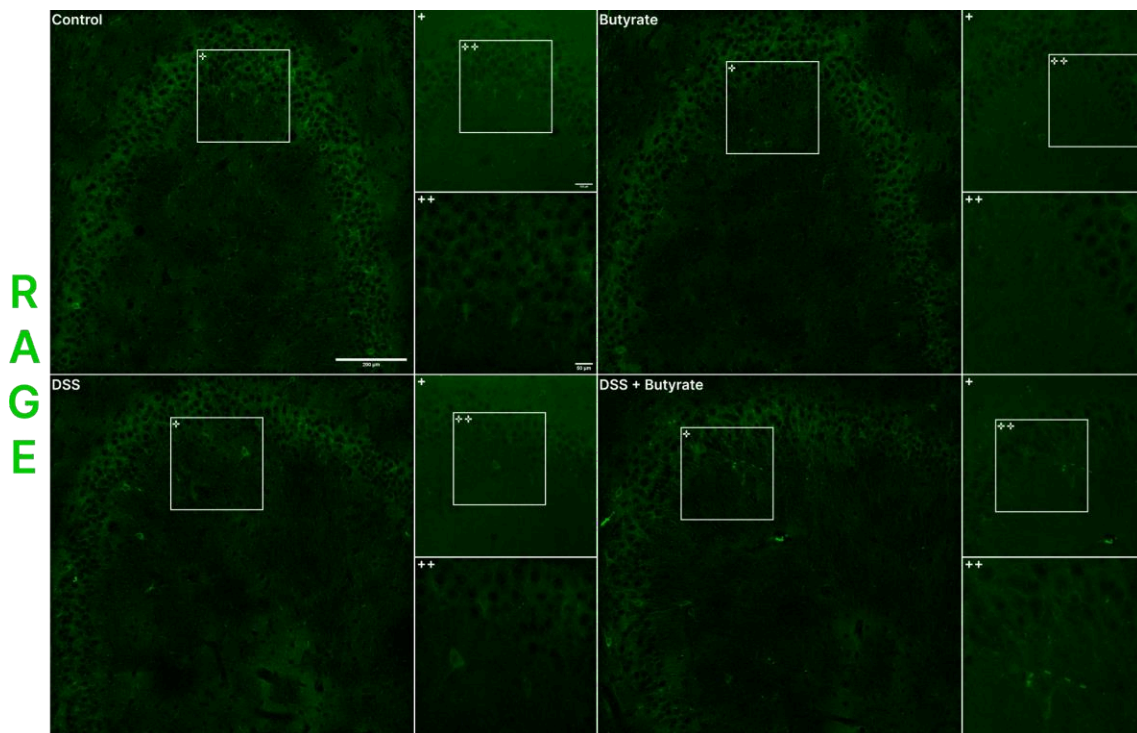


Figure 3 - Expression of RAGE in the CA3 region of the hippocampus. Representative images of RAGE labeling on the CA3 region of hippocampus slices (n=4-5 per group). Images were acquired using a laser- scanning Olympus®FV1000 confocal microscope. Scale bars = 200µm for 20x objective images, 100µm for 40x objective images (represented in the figure by +), and 50µm for digital zoom images (illustrated in the figure by ++).

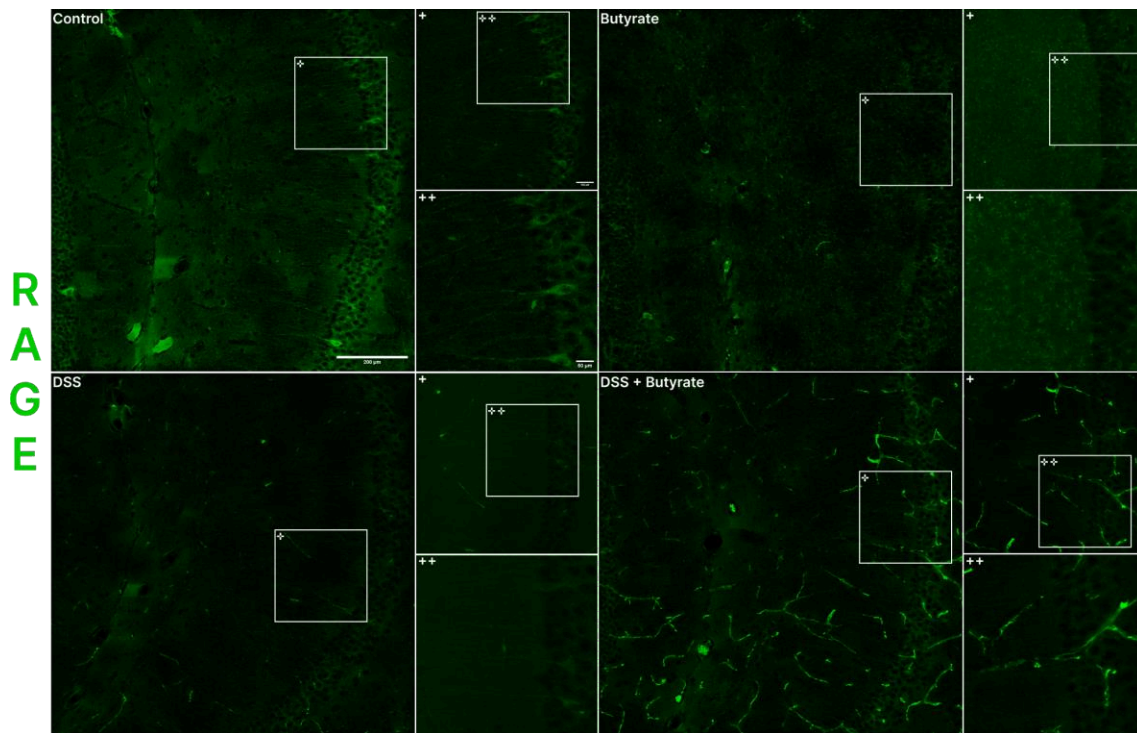


Figure 4 - Expression of RAGE in the CA1 region of the hippocampus. Representative images of RAGE labeling on the CA1 region of hippocampus slices (n=4-5 per group). Images were acquired using a laser- scanning Olympus®FV1000 confocal microscope. Scale bars = 200µm for 20x objective images, 100µm for 40x objective images (represented in the figure by +), and 50µm for digital zoom images (illustrated in the figure by ++).

Anexo II – Outras publicações durante o período do doutorado como autor ou coautor

Artigos Científicos

1. **Kleber Silveira, A.**, Moresco, K.S., Mautone Gomes, H., da Silva Morrone, M., Kich Grun, L., Pens Gelain, D., de Mattos Pereira, L., Giongo, A., Rodrigues De Oliveira, R., and Fonseca Moreira, J.C. (2018). Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) alters gut microbiota and modulates redox status, partially via caffeine in Wistar rats. *Phytother. Res.* 32, 2466–2474. 10.1002/ptr.6185.
2. Jantsch, J., Rodrigues, F. da S., Fraga, G. de F., Eller, S., **Silveira, A.K.**, Moreira, J.C.F., Giovenardi, M., and Guedes, R.P. (2023). Calorie restriction mitigates metabolic, behavioral and neurochemical effects of cafeteria diet in aged male rats. *J. Nutr. Biochem.* 119, 109371. 10.1016/j.jnutbio.2023.109371.
3. Mautone Gomes, H., **Silveira, A.K.**, Gasparotto, J., Bortolin, R.C., Terra, S.R., Brum, P.O., Gelain, D.P., and Fonseca Moreira, J.C. (2023). Effects of coconut oil long-term supplementation in Wistar rats during metabolic syndrome - regulation of metabolic conditions involving glucose homeostasis, inflammatory signals, and oxidative stress. *J. Nutr. Biochem.* 114, 109272. 10.1016/j.jnutbio.2023.109272.
4. Squizani, S., Jantsch, J., Rodrigues, F. da S., Braga, M.F., Eller, S., de Oliveira, T.F., **Silveira, A.K.**, Moreira, J.C.F., Giovenardi, M., Porawski, M., et al. (2022). Zinc supplementation partially decreases the harmful effects of a cafeteria diet in rats but does not prevent intestinal dysbiosis. *Nutrients* 14. 10.3390/nu14193921.
5. de Lima, A.M.D.L., de Lima Rosa, G., Müller Guzzo, E.F., Padilha, R.B., Costa da Silva, R., **Silveira, A.K.**, de Lima Morales, D., Conci de Araujo, M., Fonseca Moreira, J.C., Barth, A.L., et al. (2022). Gut microbiota modulation by prednisolone in a rat kindling model of pentylentetrazol (PTZ)-induced seizure. *Microb. Pathog.* 163, 105376. 10.1016/j.micpath.2021.105376.
6. Tiefensee Ribeiro, C., Peixoto, D.O., Santos, L., Saibro-Girardi, C., Brum, P.O., Carazza-Kessler, F.G., Somensi, N., Behrens, L.M.P., Bittencourt, R.R., Soares, L.S., **Silveira, A.K.** et al. (2021). Intranasal HSP70 administration protects against dopaminergic denervation and modulates neuroinflammatory response in the

- 6-OHDA rat model. *Brain Behav. Immun. Health* 14, 100253. 10.1016/j.bbih.2021.100253.
7. Bortolin, R.C., Vargas, A.R., de Miranda Ramos, V., Gasparotto, J., Chaves, P.R., Schnorr, C.E., da Boit Martinello, K., **Silveira, A.K.**, Gomes, H.M., Rabelo, T.K., et al. (2019). Guarana supplementation attenuated obesity, insulin resistance, and adipokines dysregulation induced by a standardized human Western diet via brown adipose tissue activation. *Phytother. Res.* 33, 1394–1403. 10.1002/ptr.6330.
8. Espitia-Pérez, P., Albino, S.M., Espitia-Pérez, L., Brango, H., da Rosa, H., **Kleber Silveira, A.**, Moraes, D.P., Cerveira, C., Mingori, M., Tiefensee Ribeiro, C., et al. (2018). Neurobehavioral and oxidative stress alterations following methylmercury and retinyl palmitate co-administration in pregnant and lactating rats and their offspring. *Neurotoxicology* 69, 164–180. 10.1016/j.neuro.2018.10.004.
9. Espitia-Pérez, P., Albino, S.M., da Rosa, H.T., **Silveira, A.K.**, Espitia-Pérez, L., Brango, H., Moraes, D.P., Hermann, P.R.S., Mingori, M., Barreto, F., et al. (2018). Effects of methylmercury and retinol palmitate co-administration in rats during pregnancy and breastfeeding: Metabolic and redox parameters in dams and their offspring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 162, 603–615. 10.1016/j.ecoenv.2018.06.093.
10. Pinto, C. F. D. ; **Kleber Silveira, A.**, et al. (2021). Short-term changes in the oral microbiota of dogs after chewing different types of autoclaved bones. *Veterinarski Arhiv*, v. 91, p. 277-285, 2021.

Capítulo de Livro

Silveira, A.K., Gasparotto, J., and Moreira, J.C.F. (2022). Probiotics and the gut-brain axis. In *Probiotics* (Elsevier), pp. 451–466. 10.1016/B978-0-323-85170-1.00001-4.

10 Referências

1. Gajendran M, Loganathan P, Jimenez G, Catinella AP, Ng N, Umapathy C, et al. A comprehensive review and update on ulcerative colitis. Dis Mon. 2019 Dec;65(12):100851.
2. GBD 2017 Inflammatory Bowel Disease Collaborators. 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;5(1):17–30.
3. Quaresma AB, Damiao AOMC, Coy CSR, Magro DO, Hino AAF, Valverde DA, et al. Temporal trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases in the public healthcare system in Brazil: A large population-based study. Lancet Reg Health Am. 2022 Sep;13:100298.
4. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. Lancet. 2017 Dec 23;390(10114):2769–78.
5. Saavedra PHV, Huang L, Ghazavi F, Kourula S, Vanden Berghe T, Takahashi N, et al. Apoptosis of intestinal epithelial cells restricts Clostridium difficile infection in a model of pseudomembranous colitis. Nat Commun. 2018 Nov 19;9(1):4846.
6. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell. 1993 Oct 22;75(2):263–74.
7. Wilk JN, Bilsborough J, Viney JL. The mdr1a^{-/-} mouse model of spontaneous colitis: a relevant and appropriate animal model to study inflammatory bowel disease. Immunol Res. 2005;31(2):151–9.
8. Yu J, Zhou Z, Tay-Sontheimer J, Levy RH, Ragueneau-Majlessi I. Intestinal drug interactions mediated by oatps: A systematic review of preclinical and clinical findings. J Pharm Sci. 2017 Sep;106(9):2312–25.
9. Resta-Lenert S, Smitham J, Barrett KE. Epithelial dysfunction associated with the development of colitis in conventionally housed mdr1a^{-/-} mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005 Jul;289(1):G153-62.
10. Johansson MEV, Gustafsson JK, Holmén-Larsson J, Jabbar KS, Xia L, Xu H, et al.

- Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. Gut. 2014 Feb;63(2):281–91.
11. Ikeda M, Takeshima F, Isomoto H, Shikuwa S, Mizuta Y, Ozono Y, et al. Simvastatin attenuates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis, but not oxazolone-induced colitis. Dig Dis Sci. 2008 Jul;53(7):1869–75.
 12. Antoniou E, Margonis GA, Angelou A, Pikouli A, Argiri P, Karavokyros I, et al. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. Ann Med Surg (Lond). 2016 Nov;11:9–15.
 13. Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. Immunity. 2002 Nov;17(5):629–38.
 14. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. Korean J Physiol Pharmacol. 2014 Aug 13;18(4):279–88.
 15. Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental models of inflammatory bowel diseases. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2015 Mar 1;1(2):154–70.
 16. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Ciralik H, Kantarceken B, Buyukbese MA. Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. Tohoku J Exp Med. 2005 Jun;206(2):131–9.
 17. Kobayashi T, Siegmund B, Le Berre C, Wei SC, Ferrante M, Shen B, et al. Ulcerative colitis. Nat Rev Dis Primers. 2020 Sep 10;6(1):74.
 18. Patil DT, Moss AC, Odze RD. Role of histologic inflammation in the natural history of ulcerative colitis. Gastrointest Endosc Clin N Am. 2016 Oct;26(4):629–40.
 19. Dignass A, Lindsay JO, Sturm A, Windsor A, Colombel JF, Allez M, et al. [Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis Part 2: Current management (Spanish version)]. Rev Gastroenterol Mex. 2015 Mar 10;80(1):32–73.
 20. Colombel JF, Rutgeerts P, Reinisch W, Esser D, Wang Y, Lang Y, et al. Early mucosal healing with infliximab is associated with improved long-term clinical outcomes in ulcerative colitis. Gastroenterology. 2011 Oct;141(4):1194–201.

21. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. Lancet. 2012 Nov 3;380(9853):1606–19.
22. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford, UK: Oxford University Press; 2015.
23. Lu SC. Glutathione synthesis. Biochim Biophys Acta. 2013 May;1830(5):3143– 53.
24. Piotrowska M, Swierczynski M, Fichna J, Piechota-Polanczyk A. The Nrf2 in the pathophysiology of the intestine: Molecular mechanisms and therapeutic implications for inflammatory bowel diseases. Pharmacol Res. 2021 Jan;163:105243.
25. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. Nat Rev Drug Discov. 2021 Sep;20(9):689– 709.
26. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. Nature. 2009 Oct 29;461(7268):1282–6.
27. Mar JS, Nagalingam NA, Song Y, Onizawa M, Lee JW, Lynch SV. Amelioration of DSS-induced murine colitis by VSL#3 supplementation is primarily associated with changes in ileal microbiota composition. Gut Microbes. 2014 Jul 1;5(4):494–503.
28. Wang H-G, Liu S-P, Ma T-H, Yan W, Zhou J-F, Shi Y-T, et al. Fecal microbiota transplantation treatment for refractory ulcerative colitis with allergy to 5-aminosalicylic acid: A case report. Medicine (Baltimore). 2018 May;97(19):e0675.
29. Celiberto LS, Graef FA, Healey GR, Bosman ES, Jacobson K, Sly LM, et al. Inflammatory bowel disease and immunonutrition: novel therapeutic approaches through modulation of diet and the gut microbiome. Immunology. 2018 Sep;155(1):36–52.
30. Stilling RM, van de Wouw M, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut- brain axis? Neurochem Int. 2016 Oct;99:110–32.
31. Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael J-Y, Lannoy V, Decobecq M-E, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. J Biol Chem. 2003 Jul 11;278(28):25481–9.
32. Zhang Z, Zhang H, Chen T, Shi L, Wang D, Tang D. Regulatory role of short- chain

- fatty acids in inflammatory bowel disease. Cell Commun Signal. 2022 May 11;20(1):64.
33. Gershon MD. The enteric nervous system: a second brain. Hosp Pract (Minneap). 1999 Jul 15;34(7):31–2, 35.
34. Kaelberer MM, Buchanan KL, Klein ME, Barth BB, Montoya MM, Shen X, et al. A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. Science. 2018 Sep 21;361(6408).
35. Kim CH. Immune regulation by microbiome metabolites. Immunology. 2018 Jun;154(2):220–9.
36. Sivaprakasam S, Prasad PD, Singh N. Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. Pharmacol Ther. 2016 Aug;164:144–51.
37. Wilson QN, Wells M, Davis AT, Sherrill C, Tsilimigras MCB, Jones RB, et al. Greater microbial translocation and vulnerability to metabolic disease in healthy aged female monkeys. Sci Rep. 2018 Jul 27;8(1):11373.
38. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of parkinson's disease. Cell. 2016 Dec 1;167(6):1469-1480.e12.
39. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. Neurobiol Dis. 2004 Jun;16(1):1– 13.
40. Daneman R, Rescigno M. The gut immune barrier and the blood-brain barrier: are they so different? Immunity. 2009 Nov 20;31(5):722–35.
41. Scalise AA, Kakogiannos N, Zanardi F, Iannelli F, Giannotta M. The blood-brain and gut-vascular barriers: from the perspective of claudins. Tissue Barriers. 2021 Jul 3;9(3):1926190.
42. Obrenovich MEM. Leaky gut, leaky brain? Microorganisms. 2018 Oct 18;6(4).
43. Liang S, Wu X, Jin F. Gut-Brain Psychology: Rethinking Psychology From the Microbiota-Gut-Brain Axis. Front Integr Neurosci. 2018 Sep 11;12:33.
44. Fiorentino M, Sapone A, Senger S, Camhi SS, Kadzielski SM, Buie TM, et al. Blood-brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum

disorders. Mol Autism. 2016 Nov 29;7:49.

45. Kang D-W, Adams JB, Coleman DM, Pollard EL, Maldonado J, McDonough- Means S, et al. Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. Sci Rep. 2019 Apr 9;9(1):5821.
46. Byrne G, Rosenfeld G, Leung Y, Qian H, Raudzus J, Nunez C, et al. Prevalence of Anxiety and Depression in Patients with Inflammatory Bowel Disease. Can J Gastroenterol Hepatol. 2017 Oct 18;2017:6496727.
47. 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. 2022 Jan 4;19(1):4.
48. Aubin MR, Paz AH, Araújo AB. The impact of mesenchymal stromal cells on neutrophils: A concise review. Curr Stem Cell Res Ther. 2023;18(7):878–91.
49. 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. 2017 Apr;39(4):613–22.
50. Gong W, Guo M, Han Z, Wang Y, Yang P, Xu C, et al. Mesenchymal stem cells stimulate intestinal stem cells to repair radiation-induced intestinal injury. Cell Death Dis. 2016 Sep 29;7(9):e2387.
51. Wang Y, Yin Y, Chen X, Zhao Y, Wu Y, Li Y, et al. Induction of intestinal th17 cells by flagellins from segmented filamentous bacteria. Front Immunol. 2019 Nov 22;10:2750.
52. da Costa Gonçalves F, Korevaar SS, Ortiz Virumbrales M, Baan CC, Reinders MEJ, Merino A, et al. Mesenchymal Stromal Cell Derived Membrane Particles Are Internalized by Macrophages and Endothelial Cells Through Receptor- Mediated Endocytosis and Phagocytosis. Front Immunol. 2021 Mar 15;12:651109.
53. Luk F, de Witte SFH, Korevaar SS, Roemeling-van Rhijn M, Franquesa M, Strini T, et al. Inactivated mesenchymal stem cells maintain immunomodulatory capacity. Stem Cells Dev. 2016 Sep 15;25(18):1342–54.
54. Sheehan D, Moran C, Shanahan F. The microbiota in inflammatory bowel disease. J Gastroenterol. 2015 May;50(5):495–507.

55. Hwang J, Jin J, Jeon S, Moon SH, Park MY, Yum D-Y, et al. SOD1 suppresses pro-inflammatory immune responses by protecting against oxidative stress in colitis. Redox Biol. 2020 Oct 15;37:101760.
56. van Bruggen R, Köker MY, Jansen M, van Houdt M, Roos D, Kuijpers TW, et al. Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent. Blood. 2010 Jul 1;115(26):5398–400.
57. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. Nat Immunol. 2011 Mar;12(3):222–30.
58. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. J Biol Chem. 2003 Mar 28;278(13):11312–9.
59. Feng Y, Wang Y, Wang P, Huang Y, Wang F. Short-Chain Fatty Acids Manifest Stimulative and Protective Effects on Intestinal Barrier Function Through the Inhibition of NLRP3 Inflammasome and Autophagy. Cell Physiol Biochem. 2018 Aug 23;49(1):190–205.
60. Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK, Miao EA. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. Science. 2013 Sep 13;341(6151):1250–3.
61. Zhu L-B, Zhang Y-C, Huang H-H, Lin J. Prospects for clinical applications of butyrate-producing bacteria. World J Clin Pediatr. 2021 Sep 9;10(5):84–92.
62. Appelhoff RJ, Tian Y-M, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. J Biol Chem. 2004 Sep 10;279(37):38458–65.
63. Fujita N, Markova D, Anderson DG, Chiba K, Toyama Y, Shapiro IM, et al. Expression of prolyl hydroxylases (PHDs) is selectively controlled by HIF-1 and HIF-2 proteins in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: distinct roles of PHD2 and PHD3 proteins in controlling HIF-1 α activity in hypoxia. J Biol Chem. 2012 May 11;287(20):16975–86.
64. Li H-S, Zhou Y-N, Li L, Li S-F, Long D, Chen X-L, et al. HIF-1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria. Redox Biol. 2019 Jul;25:101109.

65. Camilleri M. Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. Gut. 2019 Aug;68(8):1516–26.
66. Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. Psychopharmacology (Berl). 2016 May;233(9):1637–50.
67. Chen G, Ran X, Li B, Li Y, He D, Huang B, et al. Sodium Butyrate Inhibits Inflammation and Maintains Epithelium Barrier Integrity in a TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease Mice Model. EBioMedicine. 2018 Apr;30:317–25.
68. Ji J, Shu D, Zheng M, Wang J, Luo C, Wang Y, et al. Microbial metabolite butyrate facilitates M2 macrophage polarization and function. Sci Rep. 2016 Apr 20;6:24838.
69. Sessa L, Gatti E, Zeni F, Antonelli A, Catucci A, Koch M, et al. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is only present in mammals, and belongs to a family of cell adhesion molecules (CAMs). PLoS ONE. 2014 Jan 27;9(1):e86903.
70. Han J, Theiss AL. Stat3: friend or foe in colitis and colitis-associated cancer? Inflamm Bowel Dis. 2014 Dec;20(12):2405–11.
71. Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. J Exp Med. 2009 Jul 6;206(7):1465–72.
72. Sharma A, Tirpude NV, Kulurkar PM, Sharma R, Padwad Y. Berberis lycium fruit extract attenuates oxi-inflammatory stress and promotes mucosal healing by mitigating NF- κ B/c-Jun/MAPKs signalling and augmenting splenic Treg proliferation in a murine model of dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis. Eur J Nutr. 2020 Sep;59(6):2663–81.
73. Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, Rosillo MÁ, Aparicio-Soto M, de la Lastra CA. Dietary squalene supplementation improves DSS-induced acute colitis by downregulating p38 MAPK and NF κ B signaling pathways. Mol Nutr Food Res. 2015 Feb;59(2):284–92.
74. Gasparotto J, Ribeiro CT, da Rosa-Silva HT, Bortolin RC, Rabelo TK, Peixoto DO, et al. Systemic Inflammation Changes the Site of RAGE Expression from Endothelial Cells to Neurons in Different Brain Areas. Mol Neurobiol. 2019 May;56(5):3079–89.

75. de Witte SFH, Luk F, Sierra Parraga JM, Gargasha M, Merino A, Korevaar SS, et al. Immunomodulation by therapeutic mesenchymal stromal cells (MSC) is triggered through phagocytosis of MSC by monocytic cells. Stem Cells. 2018 Apr;36(4):602–15.
76. Feranchuk S, Belkova N, Potapova U, Kuzmin D, Belikov S. Evaluating the use of diversity indices to distinguish between microbial communities with different traits. Res Microbiol. 2018 May 23;169(4–5):254–61.
77. Gong D, Gong X, Wang L, Yu X, Dong Q. Involvement of reduced microbial diversity in inflammatory bowel disease. Gastroenterol Res Pract. 2016 Dec 15;2016:6951091.
78. Vester-Andersen MK, Mirsepasi-Lauridsen HC, Prosberg MV, Mortensen CO, Träger C, Skovsen K, et al. Increased abundance of proteobacteria in aggressive Crohn's disease seven years after diagnosis. Sci Rep. 2019 Sep 17;9(1):13473.
79. Rajca S, Grondin V, Louis E, Vernier-Massouille G, Grimaud J-C, Bouhnik Y, et al. Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2014 Jun;20(6):978–86.
80. Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M, González-Huix F, López-Oliu C, Dahbi G, et al. Molecular diversity of Escherichia coli in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. coli (AIEC) in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2009 Jun;15(6):872–82.
81. Gruszecka J, Filip R. Are hospitalized patients with inflammatory bowel disease at increased risk of invasive bacterial infections? Results from POLIBD 3-year cohort study. Gut Pathog. 2021 Feb 22;13(1):12.
82. Ruan G, Chen M, Chen L, Xu F, Xiao Z, Yi A, et al. Roseburia intestinalis and Its Metabolite Butyrate Inhibit Colitis and Upregulate TLR5 through the SP3 Signaling Pathway. Nutrients. 2022 Jul 25;14(15).