

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

GABRIEL DE MENEZES VIANNA

**O PAPEL DA NEURITINA EM ALTERAÇÕES INTESTINAIS E
COMPORTAMENTAIS EM UM MODELO CRÔNICO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA
INTESTINAL**

RIO DE JANEIRO

2025

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”
UNIGRANRIO

GABRIEL DE MENEZES VIANNA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Luiz Eduardo Baggio Sávio
Coorientador: Vinícius Santos Alves

RIO DE JANEIRO

2025

GABRIEL DE MENEZES VIANNA

**O PAPEL DA NEURITINA EM ALTERAÇÕES INTESTINAIS E
COMPORTAMENTAIS EM UM MODELO CRÔNICO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA
INTESTINAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Luiz Eduardo Baggio Sávio
Coorientador: Vinícius Santos Alves

Aprovada em:

Duque de Caxias, _____ de _____ de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Luiz Eduardo Baggio Savio (orientador)

Prof. Lorraine Oliveira da Cruz

Prof. Monique de Souza Zezza Ramalho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, queria agradecer a Deus por me dar força, resiliência, sabedoria e discernimento para conseguir chegar até aqui. Sei que em todos os momentos que pensei em desistir, ou não me senti suficiente, o Senhor estava lá presente para me iluminar e me ajudar com quaisquer problemas que eu estivesse enfrentando.

Quero agradecer à minha família por todo apoio, esporto, amor e carinho que me deram nessa caminhada. Sem vocês eu sei que não seria capaz de me reerguer dia após dia para enfrentar o leão da vez.

À minha mãe Denise, por sempre orar por mim, lutar por mim e ser sempre minha linha de frente. Mãe você é uma guerreira como nunca antes vista e vira uma leoa quando se trata dos seus filhos.

Ao meu pai Sérgio, por cada puxão de orelha seguido de uma história da época em que prestava concurso da polícia que eu com certeza já decorei todas nessa altura do campeonato.

À minha querida irmã Patrícia, por cada conselho, afago, e por sempre me fazer sair das minhas crises de ansiedade e dizer que “vai dar certo”. Você não sabe o quanto eu te amo e o quão importante é para mim.

Aos meus amigos, minha segunda família, por serem como irmãos para mim. Cada abraço, risada, conselho e saidinhas para descontrair deram certo no final. Muito obrigado por sempre estarem do meu lado mesmo quando quem era para estar não esteve.

À incrível equipe do Laboratório de Imunofisiologia (LIF) que por dois anos virou minha segunda casa. Muito obrigado por agregarem não só intelectualmente, mas também por virarem meus amigos. Saibam que nossos caminhos ainda irão se cruzar e esse não é o fim.

Ao meu orientador Dr. Luiz Eduardo, por toda paciência que teve comigo, pelo empenho em querer me ensinar e tirar minhas dúvidas. Muito obrigado por ter me dado a oportunidade de fazer este trabalho e fazer parte da família LIF. Sou muito grato por tudo.

Ao meu coorientador Dr. Vinícius Santos Alves, pelos ensinamentos, pela paciência e pelas inúmeras correções. Se estou aqui hoje foi pelo seu nível de exigência.

À minha cantora favorita Taylor Swift, cujas canções foram o motor para que eu pudesse fazer todo esse trabalho. Sem elas a tristeza teria me consumido junto à ansiedade que vem junto de sempre me cobrar ao máximo de maneiras, as vezes, não tão saudáveis.

E, por fim, um agradecimento especial aos meus entes queridos que já se foram e infelizmente não conseguirão me ver formado. Vó Olympia, vó Haide e meu tio Agostinho. Cada um de vocês foi essencial na minha caminhada. Obrigado, vós, pelos ensinamentos, pelas risadas mais sinceras e gostosas que eu tanto sinto falta. Ao meu tio agostinho, que infelizmente partiu tão cedo. Muito obrigado por todo apoio que você e minha madrinha Tânia deram à minha família desde que eu não era nem nascido. Vocês dois sempre foram e sempre vão ser muito especiais na minha vida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Caracterização das diferenças entre a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU).	10
Figura 2: Esquema representativo da indução da colite e do tratamento com a neuritina recombinante por via intravenosa.	13
Figura 3: O tratamento com a neuritina recombinante previne parcialmente a perda de peso em animais tratados com DSS.	17
Figura 4: A neuritina recombinante por via intravenosa diminuiu os danos causados pela colite no intestino.	18
Figura 5: A neuritina recombinante foi capaz de evitar o comportamento do tipo depressivo causado pela colite crônica.	19

SUMÁRIO

Sumário

RESUMO 7

ABSTRACT 8

1 INTRODUÇÃO 9

2 METODOLOGIA 12

3. RESULTADOS 17

4 DISCUSSÃO 19

5 CONCLUSÃO 22

REFERÊNCIAS..... 22

O PAPEL DA NEURITINA EM ALTERAÇÕES INTESTINAIS E COMPORTAMENTAIS EM UM MODELO CRÔNICO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Gabriel de Menezes Vianna¹

Luiz Eduardo Baggio Sávio¹

Vinícius Santos Alves²

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) são condições crônicas e multifatoriais caracterizadas por sintomas como diarreia, perda de peso, dor abdominal e presença de sangue nas fezes. Essas doenças afetam tanto a mucosa intestinal quanto o sistema nervoso entérico devido à resposta inflamatória exacerbada. Apesar dos avanços terapêuticos, muitas abordagens não são eficazes ao longo do tempo, o que exige intervenções inovadoras e individualizadas. A neuritina, um fator neurotrófico associado à sobrevivência e à homeostase neuronais, tem ganhado destaque por seu envolvimento em processos inflamatórios, especialmente por sua expressão em células T regulatórias e por sua capacidade de modular esse tipo celular. Nesse contexto, torna-se relevante investigar os efeitos da neuritina em alterações intestinais e extra-intestinais em um modelo crônico de DII. Para isso, camundongos C57BL/6 machos adultos foram submetidos à indução de colite crônica por dois ciclos de administração oral de DSS a 2% por 7 dias, intercalados por 10 dias de descanso. O tratamento consistiu na administração intravenosa de neuritina recombinante (1 µg/40 µL), três vezes por semana, durante quatro semanas. Dez dias após o final do segundo ciclo foram realizados os testes comportamentais e então procedeu-se a eutanásia e coleta do intestino para análises histológicas. Os resultados histopatológicos revelaram que os animais tratados com a neuritina mantiveram a arquitetura original da mucosa e atenuaram a perda de células epiteliais e calciformes. Ela também foi capaz de mitigar a perda de peso observada nesses modelos. Além disso, os testes comportamentais sugerem que a neuritina impediu o comportamento depressivo dos animais decorrente da manifestação crônica da DII.

Palavras-chave: Doenças inflamatórias intestinais, neuritina, colite crônica.

¹ Gabriel de Menezes Vianna Graduando do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBDs) are chronic and multifactorial conditions characterized by symptoms such as diarrhea, weight loss, abdominal pain, and the presence of blood in the stool. These diseases affect both the intestinal mucosa and the enteric nervous system due to an exacerbated inflammatory response. Despite therapeutic advances, many approaches lose effectiveness over time, underscoring the need for innovative and individualized interventions. Neuritin, a neurotrophic factor associated with neuronal survival and homeostasis, has attracted attention for its role in inflammatory processes, particularly for its expression in regulatory T cells and its ability to modulate this cell type. In this context, it becomes relevant to investigate the effects of neuritin on intestinal and extra-intestinal alterations in a chronic IBD model. For this purpose, adult male C57BL/6 mice were subjected to chronic colitis induction through two cycles of oral administration of 2% DSS for 7 days, interspersed with 10 days of recovery. The treatment consisted of intravenous administration of recombinant neuritin (1 μ g/40 μ L), three times per week for four weeks. Ten days after the end of the second cycle, behavioral tests were performed, followed by euthanasia and intestinal collection for histological analyses. Histopathological results revealed that neuritin-treated animals preserved the original mucosal architecture and showed reduced loss of epithelial and goblet cells. Neuritin also mitigated the weight loss observed in these models. Furthermore, behavioral tests suggest that neuritin prevented the depressive-like behavior resulting from chronic IBD manifestation.

Keywords: Inflammatory Bowel Diseases. Neuritin. Chronic colitis.

1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas não infecciosas que afetam o trato gastrointestinal e são de cunho multifatorial. Os fatores de risco associados às DIIs são: fatores genéticos, ambientais e estilo de vida, como dieta, tabagismo e alcoolismo. Sintomas como perda de peso, dor abdominal, diarreia e sangue nas fezes são comuns em pacientes com esta condição (Amodeo *et al.*, 2023). Dentre as doenças que compõem as DIIs, a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU) são as que se destacam por sua maior prevalência em escala global, chegando a atingir 1% da população mundial (Kaplan G., 2015). No Brasil, o acesso a essas informações é escasso, porém, recentemente foi relatado que tanto a incidência quanto a prevalência de DIIs no país aumentaram de 2012 a 2020. A incidência de DII aumentou de 9,4 em 2012 para 9,6 por 100.000 habitantes em 2020, enquanto a prevalência da DII aumentou de 30,0 em 2012 para 100,1 por 100.000 habitantes em 2020 (Quaresma *et al.*, 2020). Na DC, além dos sintomas citados acima, a inflamação é transmural atingindo diversas camadas do epitélio gastrointestinal promovendo o surgimento de diversas lesões espaçadas por todo trato gastrointestinal (da boca ao ânus), além do surgimento de acúmulo de gordura ao redor do segmento intestinal inflamado, presença de fissuras, espessamento da parede intestinal e alteração da arquitetura intestinal, que passa a adquirir um aspecto semelhante a paralelepípedos. Já na RCU as lesões são mais superficiais, contínuas e as úlceras se restringem ao cólon intestinal e, em alguns casos, no reto. Há também formação de pseudopólipos e perda das pregas intestinais. (Amodeo *et al.*, 2023; Seyedian *et al.*, 2019). O mecanismo por trás das DIIs ainda não foi completamente elucidado na literatura, mas o que se sabe é que, em indivíduos pré-dispostos, um dano irresolúvel à mucosa é característico dessa doença, levando à ativação da resposta imune. A imunidade inata é a primeira a atuar e é capaz de induzir uma reação rápida e inespecífica à entrada de patógenos e/ou microrganismos intestinais excessivos. O desequilíbrio causado por neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células linfoides e células natural killer é característico da inflamação intestinal pelas DII (NG *et al.*, 2011).

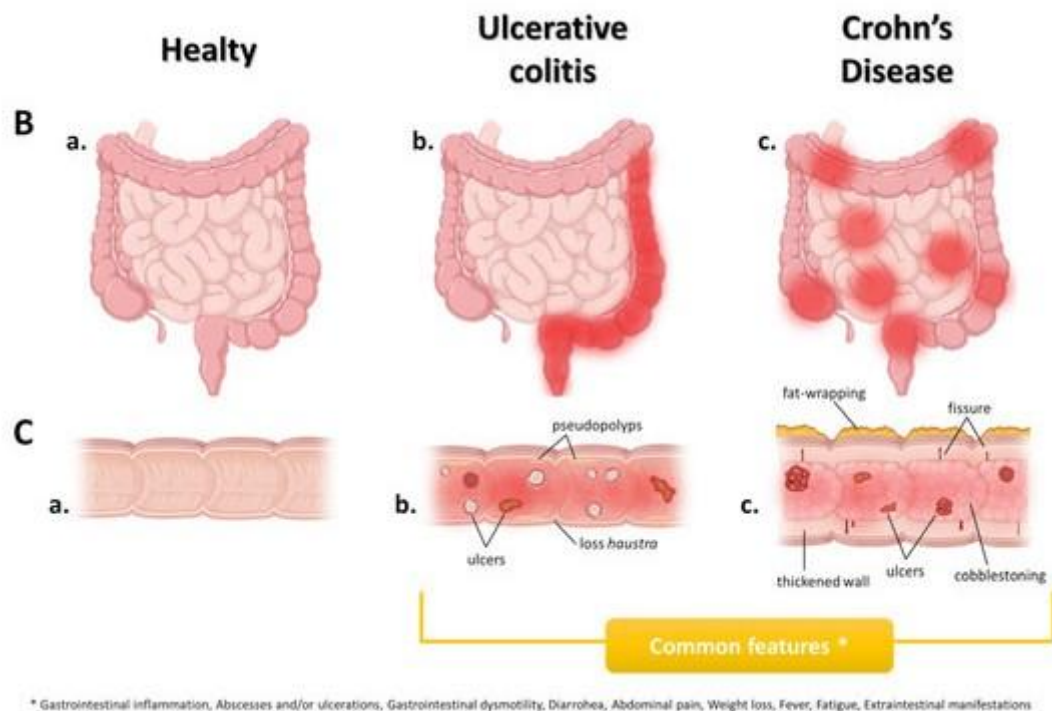


Figura 1: Caracterização das diferenças entre a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU).

Representação dos principais subtipos das doenças inflamatórias intestinais. A colite ulcerativa caracteriza-se por inflamação contínua e áreas ulceradas limitadas ao cólon. Já a doença de Crohn apresenta inflamação em segmentos alternados, podendo envolver qualquer parte do trato gastrointestinal, além de provocar espessamento da parede intestinal, aspecto em “paralelepípedo” e formação de fístulas (Adaptado de Amodeo et al., 2023).

A imunidade inata intestinal constitui a primeira linha de defesa, atuando rapidamente e de forma inespecífica diante da entrada de patógenos ou do excesso de microrganismos residentes. Quando o equilíbrio desse sistema é comprometido, envolvendo neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células linfoides e células natural killer, ocorre uma desregulação que contribui para o estabelecimento da inflamação intestinal característica das DII (NG *et al.*, 2011). A etiologia desse dano inicial pode estar associada a agentes infecciosos, substâncias químicas ou alterações metabólicas, que podem decorrer de disbiose induzida pela dieta (Schmitz H *et al.*, 1999). A progressão da doença, por sua vez, pode resultar de uma resolução ineficaz da resposta inflamatória desencadeada por essa lesão primária (Qiu P *et al.*, 2022). Nesse contexto, os receptores do tipo toll (TLRs) expressos nas células apresentadoras de antígeno (APCs) presentes na lâmina própria são ativados e passam a secretar citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-18 e TNF- α e quimiocinas, promovendo inicialmente a ativação da cascata do complemento e da fagocitose, seguidas pela ativação da resposta imune adaptativa, o que sustenta o estado

inflamatório. Considerando as expressivas semelhanças clínicas e morfológicas entre a colite ulcerativa e a doença de Crohn, propôs-se que seus gatilhos possam ser induzidos por mediadores solúveis produzidos durante processos inflamatórios. Assim, as alterações imunológicas associadas às DII seriam potenciais causas, e não meras consequências, do desenvolvimento dessas patologias (Amodeo *et al.*, 2023; Macdermott *et al.*, 1988).

A exacerbação dessa resposta inflamatória pode alterar a estrutura neuronal do sistema nervoso entérico (SNE) afetando o funcionamento normal do intestino, além de promover o aumento da permeabilidade entre a barreira intestino-sangue, o que causa a liberação desses mediadores inflamatórios na corrente sanguínea permitindo a ocorrência de diversas manifestações extraintestinais (EIMs) (De Giorgio, *et al.*, 2004; Geboes; Collins, 1998; Bauer KC, *et al.*, 2022; Harbord M, *et al.*, 2016). Durante a vida, aproximadamente 50% dos pacientes com DII desenvolvem manifestações extraintestinais (EIMs), que afetam diversas partes do nosso corpo, como o fígado, pele, olhos, sistema nervoso central e periférico. As manifestações extraintestinais da DII podem ser devidas a complicações nutricionais e metabólicas, a um estado pró-trombótico, efeitos adversos de medicamentos, mas seu principal mecanismo é imunológico decorrente da liberação dos mediadores inflamatórios na corrente sanguínea o que causa uma inflamação sistêmica. (Harbord M, *et al.*, 2016; Vavricka SR, *et al.*, 2015; Ferro, José M *et al.*, 2021).

A neuritina é um fator neurotrófico, ancorado à membrana plasmática por glicosilfosfatidilinositol. Esse fator é predominantemente expresso no cérebro, em especial no córtex, hipocampo e tálamo, mas também é expresso na retina e no fígado. Além de estar ancorada à membrana plasmática, a neuritina pode ser encontrada solúvel (Yao JJ *et al.*, 2018). Suas funções são a promoção da sobrevivência neuronal e o crescimento de neuritos, ou seja, qualquer projeção do corpo celular do neurônio. Em alguns modelos de disfunção cognitiva, já foi relatado que essa proteína é capaz de reestabelecer a plasticidade sináptica e inibir a astrogliose, melhorando a perda neuronal e a disfunção cognitiva (Zhang Z *et al.*, 2021). No entanto, recentemente ela tem sido associada a doenças autoimunes e inflamatórias, por conta de sua possível relação com as células Treg, uma vez que foi reportado que a liberação desse fator neurotrófico por células T foliculares regulatórias permite que se liguem a células B do centro germinativo reprimindo a formação de

células plasmáticas e por sua vez a produção de IgE (Gonzalez-Figueiroa *et al.*, 2021). Estudos preliminares constataram que a expressão da neuritina pelas células Treg é capaz de promover a manutenção e função desse tipo celular suportando sua expansão e expressão de FoxP3, importante gene relacionado a imunotolerância. O que evidencia seu papel regulatório na inflamação e em alergias (Hong Yu *et al.*, 2024)

Em síntese, a neuritina apresenta propriedades que abrangem tanto a imunorregulação por meio de sua expressão em células T foliculares regulatórias, onde atua nos centros germinativos inibindo a formação de plasmócitos autorreativos e a produção de IgE, quanto a promoção da regeneração neuronal e da plasticidade sináptica no sistema nervoso central e entérico. Diante desse panorama funcional, nosso estudo propõe avaliar os efeitos da administração de neuritina recombinante em modelo animal de doença inflamatória intestinal crônica sobre alterações intestinais e cerebrais decorrentes da doença.

2 METODOLOGIA

2.1 Animais

Para este estudo, foram utilizados camundongos machos adultos (8-10 semanas) C57BL/6 selvagens (WT). Os animais tiveram livre acesso à água e comida e foram mantidos em um ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas a uma temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Os protocolos experimentais foram submetidos e realizados conforme o número A57/24-124-21 do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEUA) da UFRJ. Os procedimentos experimentais foram realizados conforme as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Antes de todos os procedimentos, os animais serão aclimatados por 15 dias no mesmo biotério de experimentação animal.

2.2 Indução da Doença Inflamatória Intestinal por DSS

Para a indução do modelo crônico da colite por DSS, os camundongos receberam 2% de sulfato de sódio dextrano (Peso molecular: 36,000-50,000; MP Biomedicals, No. Cat. 9011-18-1) em água. O protocolo consistiu na divisão em 2 ciclos de DSS, onde o primeiro ciclo foi feito durante 7 dias com a administração oral

do DSS, seguido de um período de descanso de 10 dias em que foi retirado o DSS e os animais receberam água e alimento *ad libitum*. Em seguida, foi realizado o segundo ciclo, seguindo os mesmos parâmetros do anterior. Durante todo o experimento, as manifestações clínicas, como diarreia, presença de sangue nas fezes, mudanças de peso, foram recordadas.

2.3 Tratamento Farmacológico

Para o tratamento farmacológico os camundongos foram injetados por via intravenosa com a neuritina recombinante (1µg/40µL) por animal (Cat. No 450-36D, Peprotech) ou com controle de veículo (PBS) 3 vezes na semana por 4 semanas.

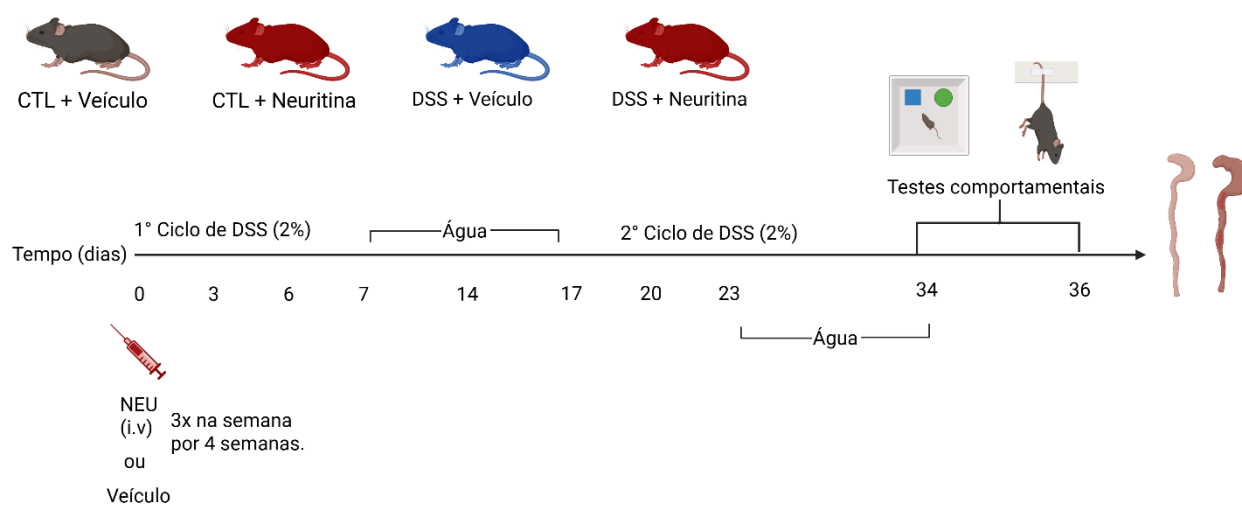


Figura 2: Esquema representativo da indução da colite e do tratamento com a neuritina recombinante por via intravenosa.

A colite crônica foi induzida por meio da administração de DSS 2% na água dos animais. A administração foi feita em 2 ciclos com 7 dias de duração e 10 dias de intervalo entre eles, em que os animais bebiam apenas água. Durante todo o experimento, os animais receberam veículo (PBS) ou a neuritina recombinante na dose de 1 µg/40 µL por animal, por via intravenosa, na cauda, 3x por semana. No trigésimo quarto dia de experimento, os animais foram submetidos a testes comportamentais de reconhecimento de objetos e no trigésimo quinto dia ao teste de suspensão pela cauda. Ao fim do protocolo experimental, no trigésimo sexto dia, os animais foram eutanasiados e tiveram seus cólons coletados para posterior análise.

2.4 Experimentos comportamentais

Foi feita a avaliação dos padrões comportamentais dos animais afim de analisar os parâmetros de locomoção, memória, ansiedade e depressão. Para isso, foram

realizados testes de campo aberto, suspensão pela cauda e reconhecimento de objetos de acordo com os protocolos previamente publicados (De Sousa, V.L. *et al.*, 2021).

2.4.1 Teste de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado em uma arena de 30 x 30 x 45 cm para avaliar o índice de memória dos animais. Os objetos-teste foram fixados no chão da caixa com fita adesiva para evitar o deslocamento causado pelos animais (De Sousa, V.L. *et al.*, 2021). Os animais foram habituados e submetidos a uma sessão de treinamento e outra de teste, sendo cada sessão de 5 minutos cada. O treino foi realizado colocando o animal no centro da arena na presença de dois objetos idênticos. O tempo que cada animal passou explorando os objetos foi registrado. Foi considerado um comportamento exploratório quando o animal farejou e tocou o objeto. Após a sessão de treinamento, os objetos foram limpos com etanol a 70% para eliminar as pistas olfativas. Uma hora após o treinamento, os animais foram colocados na mesma arena para a sessão de teste, e um dos objetos anteriores foi substituído por um novo. O tempo gasto explorando o objeto, familiar e novo, foi analisado. Os resultados foram expressos como uma porcentagem do tempo gasto na exploração do objeto familiar e novo durante o treino e teste. O teste t de Student será usado para comparar o tempo médio de exploração de cada objeto com o valor fixo de 50%. Os animais que aprendem a tarefa exploram o novo objeto por mais de 50% do tempo total.

2.4.2 Teste de suspensão pela cauda

O teste de suspensão pela cauda consiste na avaliação do comportamento do tipo depressivo que os animais possam apresentar. Para este teste, os camundongos foram suspensos pela cauda em um aparato de forma cilíndrica utilizando uma fita adesiva para que ocorra a fixação de sua cauda 50 centímetros acima de uma plataforma de madeira. Os animais foram avaliados durante 5 minutos e foi quantificado o tempo de imobilidade, que consiste no tempo em que o animal fica pendurado de forma passiva, ou seja, não apresentam nenhuma tentativa de escapar do aparato nem liberar sua cauda da respectiva fita adesiva.

2.5 Preparo do tecido para avaliação histológica

Ao final do procedimento experimental realizou-se uma laparotomia nos camundongos longitudinalmente, após a realização da assepsia com álcool 70% para a obtenção do cólon. O cólon foi retirado e o conteúdo fecal foi aspirado do intestino por meio de lavagem com PBS. Em seguida, o órgão foi fixado em paraformaldeído (PFA) 4% por 24h e então lavado novamente com PBS após a fixação de 24h para dar seguimento ao processamento. O tecido foi processado seguindo as etapas de desidratação em série crescente de álcool etílico: 70%, 90% e 100%, com permanência de 40 minutos em cada concentração. Ao final desta etapa, o tecido foi colocado em álcool 100% duas vezes por 40 minutos e a última vez durante a noite. No dia seguinte, foram feitas a clarificação e remoção dos álcoois realizando 3 banhos de xilol consecutivos, o primeiro durando 10 min, o segundo 20 min e o último 30 min. O tecido clarificado foi então incluído em parafina histológica, sendo imerso em dois banhos consecutivos de parafina fundida, cada um com duração de 1 hora, a 60°C. Em seguida, os blocos de parafina foram resfriados e posteriormente seccionados em micrótomo manual Leica RM2125 RTS, obtendo-se cortes histológicos de 6 µm de espessura. As lâminas contendo os cortes foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em série decrescente de álcoois (100%, 90% e 70%), e, em seguida, coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação morfológica.

2.6 Avaliação histopatológica

As lâminas foram montadas em lamínula utilizando meio de montagem sintético Entellan e analisadas em microscópio óptico invertido Motic AE31 Elite para avaliação das estruturas histológicas do cólon. O score foi feito de acordo com Erben Ulrike (Ulrike E, et al., 2014) e os parâmetros (Tabela 1) foram analisados nos aumentos de 10X, 20X e 40X.

Tabela 1: Escore histopatológico para severidade da colite

Parâmetros	Descrição	Pontuação
Processo inflamatório	Inexistente	0
	Leve (pequeno infiltrado leucocitário restrito à lâmina própria)	1

Parâmetros	Descrição	Pontuação
Lesão epitelial	Moderado (infiltrado celular denso na mucosa, sem atingir a submucosa)	2
	Acentuado (infiltrado transmural alcançando submucosa e/ou camada muscular)	3
	Inexistente	0
	Perda parcial de células epiteliais	1
	Erosão ampla da mucosa	2
Arquitetura críptica	Ulceração total da mucosa com destruição completa das criptas	3
	Preservada	0
	Alteração leve (redução ou dilatação discreta das criptas)	1
	Alteração moderada (desorganização parcial das criptas)	2
	Alteração severa (ausência ou colapso das criptas)	3
Infiltrado inflamatório	Normal	0
	Discreto (pequeno acúmulo de neutrófilos/linfócitos)	1
	Moderado (infiltrado difuso em toda a mucosa)	2
	Intenso (infiltrado acometendo toda a parede intestinal)	3
Ulceração, edema e alterações na submucosa	Ausente	0
	Leve	1
	Moderado	2
	Severo	3

2.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). A análise estatística será realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via ou de duas vias. O teste de reconhecimento de objetos será analisado através de teste t de uma amostra (One-sample t test) comparando o tempo médio de exploração para cada objeto com o valor fixo de 50%. Valores de P inferiores a 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados indicativos de significância. Os gráficos foram elaborados no software GraphPad Prism® 8.00.

3. RESULTADOS

3.1. Os animais com colite tratados com a neuritina recombinante conseguiram recuperar parte do peso perdido.

Ao longo do experimento, os animais foram pesados diariamente para registrar a perda de peso decorrente da colite. Dessa forma, observou-se menor perda de peso nos animais do grupo DSS tratados com a neuritina recombinante, o que sugere um efeito protetor da neuritina nessa patologia (Figura 3, $p < 0,05$).

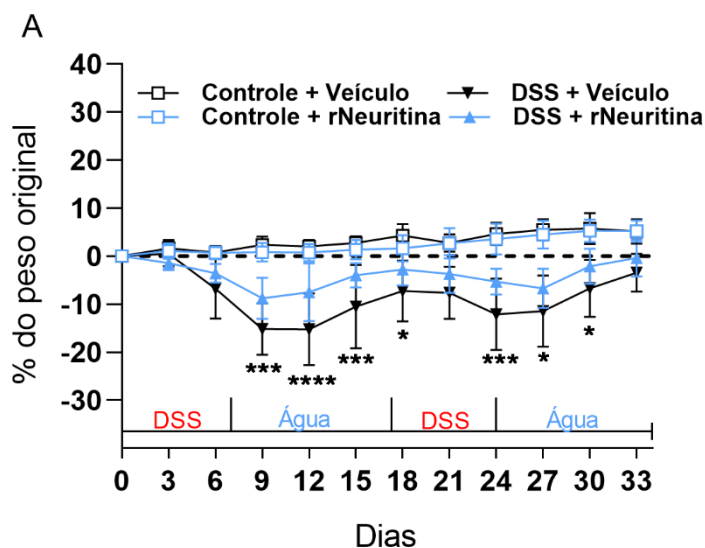


Figura 3: O tratamento com a neuritina recombinante previne parcialmente a perda de peso em animais tratados com DSS.

Avaliação da progressão da colite através da análise do peso dos camundongos durante o curso da doença. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM; Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos DSS + Veh e DSS + Neuritina são representadas por asteriscos (* $p < 0,05$);. A análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey, foi utilizada na avaliação dos pesos. Comparações foram feitas em relação ao grupo Ctrl + Veh. (N = 7-12).

3.2. A neuritina recombinante, por via intravenosa, diminuiu os danos causados pela colite no intestino.

As lâminas com o tecido do cólon dos animais foram analisadas com o auxílio de um microscópio invertido nos aumentos de 10X, 20X e 40X, com o objetivo de identificar os danos causados pela colite nos camundongos. Enquanto os animais que não receberam o tratamento com a neuritina recombinante apresentaram perda de criptas, infiltrado inflamatório denso e ulceração, os animais tratados apresentaram menor infiltração de células inflamatórias e conseguiram manter a sua estrutura original. De acordo com os resultados, a neuritina recombinante por via intravenosa reverteu parcialmente os danos causados pela colite no intestino. Na Figura 4A é apresentado fotografias histológicas do intestino dos camundongos tratados e não tratados e na Figura 4B é apresentado o escore histopatológico dessas histologias ($p < 0,05$).

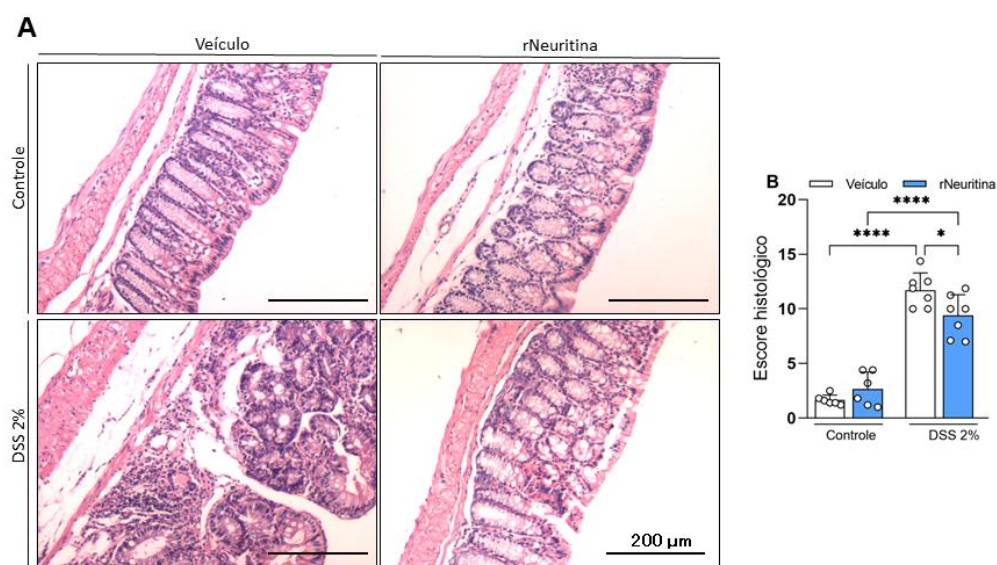


Figura 4: A neuritina recombinante por via intravenosa diminuiu os danos causados pela colite no intestino.

(A) Fotos representativas do intestino dos grupos CTL + Veículo, CTL + rNeuritina, DSS + Veículo e DSS + rNeuritina; (B) escore histopatológico feito com base nas histologias analisadas do intestino dos camundongos. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM; Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Ctrl + Veículo e DSS + Veículo, assim como entre os grupos DSS + Veículo e DSS + rNeuritina, são representadas por asteriscos, assim como as diferenças (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$) (N=6-7).

3.3. Animais com colite tratados com a neuritina recombinante apresentaram melhora nos testes comportamentais.

Foram realizados os testes de suspensão pela cauda e reconhecimento de objetos para avaliar se houve algum dano cognitivo nos animais ou se estão apresentando um comportamento do tipo ansioso/depressivo. No teste de suspensão pela cauda nota-se uma diminuição no tempo de imobilidade do grupo tratado em relação ao grupo não tratado, o que sugere que a neuritina exerceu um papel protetor evitando o comprometimento neurológico derivado da doença inflamatória intestinal (Figura 5A, $p < 0,05$). No teste de reconhecimento de objetos foi observado que a colite não foi capaz de causar danos cognitivos relacionados à memória declarativa (Figura 5B, $p < 0,05$).

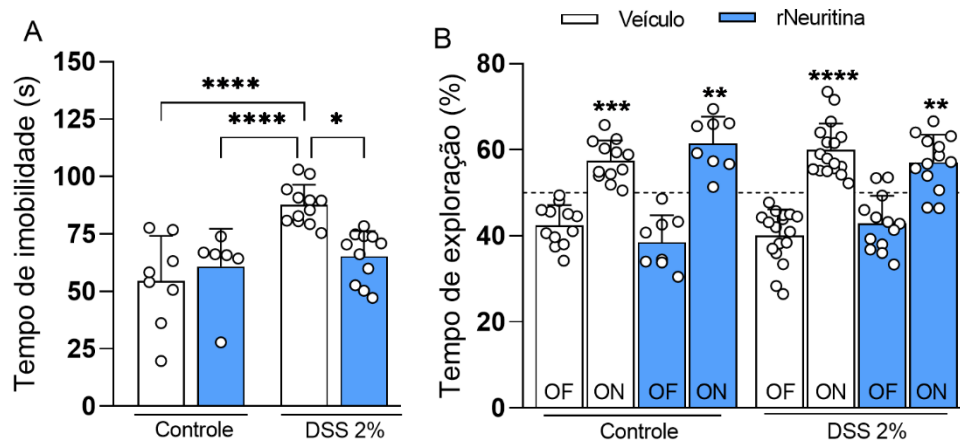


Figura 5: A neuritina recombinante foi capaz de evitar o comportamento do tipo depressivo causado pela colite crônica.

Os animais foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda e reconhecimento de objetos a fim de avaliar o comportamento do tipo depressivo e a memória declarativa. No teste de suspensão pela cauda é avaliado o tempo de imobilidade dos animais (A). Em seguida foi avaliada a memória declarativa destes animais no teste de reconhecimento de objetos (B). Os dados são expressos como média $\pm$ SEM. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos são representadas por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$). Os círculos representam um animal individualmente (N = 6-12). Análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey foi utilizada no teste. No teste de reconhecimento de objetos foi utilizado o teste t de uma amostra comparada a chance de 50% [one sample t test compared to chance levels 50%].

4 DISCUSSÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são condições crônicas caracterizadas por inflamação recorrente do trato gastrointestinal, apresentando ciclos de exacerbação e remissão. As duas formas mais comuns são a DC e RCU, que

juntas representam a maior parte dos casos. A prevalência dessas doenças varia conforme a região, sendo mais elevada na América do Norte e na Europa (Kaplan GG, 2015). A etiologia das DIIs é multifatorial, envolvendo susceptibilidade genética, fatores ambientais, alterações da microbiota e desregulação da resposta imune mucosa. Entre os fatores ambientais, destacam-se o tabagismo, padrões alimentares ricos em gorduras e ultraprocessados, uso frequente de antibióticos e alcoolismo (Amodeo, et al., 2023).

Além das manifestações gastrointestinais, como a diarreia e presença de sangue nas fezes na RCU, distúrbios psicológicos, como depressão e ansiedade, também estão associados às DIIs devido ao quadro inflamatório crônico e às consequências sistêmicas. Os fatores associados a essas alterações neuropsiquiátricas decorrem da resposta imune desregulada característica das DIIs (Bernstein et al., 2019).

Há diversos modelos de indução de DIIs utilizando químicos como TNBS, DSS, DNBS, Oxazolona, dentre outros), porém o modelo de indução por DSS é o que mais mimetiza características semelhantes às da doença em humanos como perda de peso, diarreia contendo sangue, perda de células epiteliais intestinais e infiltração de células imunes e por isso foi o modelo escolhido para esse estudo. (Kolios, 2016; Wirtz et al., 2017).

As células T regulatórias (Tregs) desempenham um papel central na contenção de respostas inflamatórias exacerbadas, atuando na manutenção da tolerância imunológica e na prevenção de danos teciduais decorrentes da ativação imune descontrolada (Lee SH et al., 2018). Por meio da expressão do fator de transcrição FoxP3 e da liberação de mediadores imunossupressores, as Tregs modulam a proliferação de células efectoras e limitam a progressão de processos inflamatórios crônicos (Yan JB et al., 2020). Nesse contexto, a neuritina tem emergido como um elemento relevante para a estabilidade e a funcionalidade dessas células. Inicialmente descrita como um fator neurotrófico envolvido na plasticidade sináptica, a neuritina também exerce funções imunológicas ao promover a manutenção fenotípica das Tregs e favorecer sua expansão, garantindo a expressão sustentada de FoxP3 e potencializando sua capacidade supressora (Hou Yu et al., 2024). Além disso, a neuritina contribui para a regulação da resposta humoral nos centros germinativos, inibindo a geração de plasmócitos produtores de anticorpos autorreativos (Gonzalez-Figueroa et al., 2021). Considerando esse conjunto de propriedades, avaliamos os

efeitos da administração intravenosa de neuritina recombinante em um modelo de doença inflamatória intestinal crônica, buscando explorar seu potencial terapêutico na modulação da inflamação intestinal.

A avaliação da perda de peso dos animais submetidos a modelos de colite ulcerativa é uma maneira eficaz de quantificar o grau de severidade da doença. Benoit Chassaing e colaboradores em 2014 mostraram que essa perda em modelos agudos de indução da colite é esperada e então é observada a recuperação desse peso. No entanto, estudos como o de Chan Hyung Lee e colaboradores, em 2023, revelam que, em modelos crônicos, essa recuperação do peso perdido pode ser parcial devido a processos como a deposição de fibras característico do processo de cicatrização de inflamações crônicas, além da má absorção de nutrientes decorrente da perda de células epiteliais e caliciformes presentes no intestino e a alteração da motilidade intestinal. Porém, foi observado nessa pesquisa que, apesar da inflamação crônica estabelecida, os animais tratados com a rNeuritina tiveram menor perda de peso nos períodos de indução da colite e posteriormente conseguiram recuperar parte do peso perdido, evidenciando que ela pode ter tido um papel protetor nesse contexto, provavelmente devido à sua capacidade de expandir e suportar as células T regs que desempenham um importante papel no controle de inflamações.

Quanto à análise histopatológica, Ulrike e colaboradores, em 2014, criaram uma maneira de quantificar o dano tecidual causado pela colite avaliando diversos parâmetros como: grau de inflamação, a arquitetura da mucosa e mudanças no epitélio intestinal. Logo, aplicamos o score desenvolvido por eles nesse estudo para avaliar o dano causado pela colite crônica nos animais e entender o papel da neuritina no quadro inflamatório. Foi observado que os animais que receberam o tratamento com a neuritina recombinante tiveram a arquitetura da mucosa, as células caliciformes e epiteliais parcialmente preservadas, corroborando a hipótese de um possível papel protetor da neuritina, devido às suas propriedades de imunorregulação.

Os resultados obtidos nos testes comportamentais corroboram evidências anteriores de que a colite crônica pode induzir alterações emocionais e motivacionais em modelos murinos (Mitchell *et al.*, 2022; Sotelo-Parrilla *et al.*, 2024). A presença de comportamento do tipo depressivo em animais submetidos a colite crônica induzida por DSS reforça a participação do eixo intestino-cérebro na mediação de efeitos neurocomportamentais associados à inflamação intestinal persistente. Isso pode se dar devido à chegada de diversos mediadores inflamatórios na barreira hemato-

encefálica, induzindo sua disfunção e aumento de permeabilidade (Mitchell *et al.*, 2022).

Nesse contexto, nossos achados demonstram que o tratamento com neuritina recombinante atenuou o comportamento do tipo depressivo nos animais com colite crônica, sem alterar o desempenho no teste de reconhecimento de objetos. A melhora observada no comportamento depressivo após o tratamento, junto a recuperação parcial do peso perdido e a atenuação da severidade da colite, sugere que os efeitos neuroprotetores da neuritina se somam às suas propriedades imunomodulatórias previamente descritas, indicando uma possível atuação integrativa no eixo intestino-cérebro, indicando que a neuritina pode ser uma possível alternativa para o tratamento dessa comorbidade. Assim, nossos dados sustentam a hipótese de que a neuritina desempenha papel relevante não apenas na atenuação da inflamação intestinal, mas também na mitigação de suas repercussões neurocomportamentais.

5 CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados deste estudo indicam que a neuritina recombinante exerce efeitos benéficos tanto sobre parâmetros inflamatórios quanto sobre as alterações comportamentais associadas à colite crônica. A redução do comportamento do tipo depressivo, aliada à ausência de prejuízo cognitivo, sugere que a neuritina pode modular circuitos neurais sensíveis à inflamação sistêmica, possivelmente por meio de sua reconhecida capacidade neuroprotetora. Paralelamente, a melhora histopatológica observada reforça seu potencial papel imunomodulatório no tecido intestinal.

Assim, nossos achados destacam a neuritina como um candidato promissor para estratégias terapêuticas voltadas não apenas ao controle da inflamação intestinal, mas também à mitigação de suas consequências neurocomportamentais. Estudos adicionais serão necessários para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos e determinar a aplicabilidade translacional desses efeitos.

REFERÊNCIAS

Amodeo, G.; Franchi, S.; Galimberti, G.; Riboldi, B.; Sacerdote, P. The Prokineticin System in Inflammatory Bowel Diseases: A Clinical and Preclinical Overview. **Biomedicines** **2023**, *11*, 2985.

<https://doi.org/10.3390/biomedicines11112985>

Bauer KC, Littlejohn PT, Ayala V, Creus-Cuadros A, Finlay BB. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Gut-Liver Axis: Exploring an Undernutrition Perspective.

Gastroenterology. 2022 Jun;162(7):1858-1875.e2. doi:

10.1053/j.gastro.2022.01.058. Epub 2022 Mar 3. PMID: 35248539

BERNSTEIN, Charles N. et al. Increased Burden of Psychiatric Disorders in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 25, n. 2, p. 360–368, 2019.

Cai Z, Wang S, Li J. Tratamento da doença inflamatória intestinal: uma revisão abrangente. **Front Med (Lausanne)**. 20 de dezembro de 2021;8:765474. DOI: 10.3389/fmed.2021.765474. PMID: 34988090; PMCID: PMC8720971.

Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*. 2014 Feb 4;104:15.25.1-15.25.14. doi: 10.1002/0471142735.im1525s104. PMID: 24510619; PMCID: PMC3980572.

CHOI, Hyun B. et al. Modulation of the purinergic P2X7 receptor attenuates lipopolysaccharide mediated microglial activation and neuronal damage in inflamed brain. *Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 18, p. 4957–4968, 2007.

GEBOES, K.; COLLINS, S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 10, n. 3, p. 189–202, 1998.

GONZALEZ-FIGUEROA, Paula *et al.* Follicular regulatory T cells produce neuritin to regulate B cells. **Cell**, v. 184, n. 7, p. 1775- 1789.e19, 2021.

Harbord M, et al. The first european evidence-based consensus on extra-intestinal manifestations in inflammatory bowel disease. **J. Crohns Colitis**. 2016;10:239–254. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv213.

20;13:RP96812. doi: 10.7554/eLife.96812. PMID: 38352414; PMCID: PMC10862906.

- Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. 2015 Dec;12(12):720-7. doi: 10.1038/nrgastro.2015.150. Epub 2015 Sep 1. PMID: 26323879.
- KOLIOS, George. Animal models of inflammatory bowel disease: How useful are they really? *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 32, n. 4, p. 251–257, 2016.
- Lee CH, Koh SJ, Radi ZA, Habtezion A. Animal models of inflammatory bowel disease: novel experiments for revealing pathogenesis of colitis, fibrosis, and colitis-associated colon cancer. *Intest Res*. 2023;21(3):295-305. doi: 10.5217/ir.2023.00029
- Lee SH, Kwon JE, Cho ML. Patogênese imunológica da doença inflamatória intestinal. *Resolução Intest*. 2018 Jan; 16(1):26-42. doi: 10.5217/ir.2018.16.1.26. Epub 2018 Jan 18. PMID: 29422795; PMCID: PMC5797268.
- experimental intracerebral hemorrhage in mice. *Neurobiology of Disease*, v. 156, p. 105407, 2021.
- colitis and Crohn's disease. *Adv. Immunol*. **1988**, 42, 285–328.
- MITCHELL, Jonathon et al. Chronic Intestinal Inflammation Suppresses Brain Activity by Inducing Neuroinflammation in Mice. *American Journal of Pathology*, v. 192, n. 1, p. 72–86, 2022.
- Mou Y, Du Y, Zhou L, Yue J, Hu X, Liu Y, Chen S, Lin X, Zhang G, Xiao H, Dong B. Gut Microbiota Interact With the Brain Through Systemic Chronic Inflammation: Implications on Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Aging. **Front Immunol**. 2022 Apr 7;13:796288. doi: 10.3389/fimmu.2022.796288. PMID: 35464431; PMCID: PMC9021448.
- MOWAT, C. et al. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. **Gut**, v. 60, n. 5, p. 571–607, 2011
- NG, S. C. et al. Relationship between human intestinal dendritic cells, gut microbiota, and disease activity in Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 10, p. 2027–2037, 2011.
- PRASAD, S. et al. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. **Laboratory Investigation**, v. 85, n. 9, p. 1139–1162, 2005.
- Qiu P, Ishimoto T, Fu L, Zhang J, Zhang Z, Liu Y. A microbiota intestinal na doença inflamatória intestinal. *Células Frontais Infectam o Microbiol*. 22 de fevereiro de 2022;12:733992. doi: 10.3389/fcimb.2022.733992. PMID: 35273921; PMCID: PMC8902753.

Quaresma AB, Damiao AOMC, Coy CSR, Magro DO, Hino AAF, Valverde DA, Panaccione R, Coward SB, Ng SC, Kaplan GG, Kotze PG. 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 Jun 9;13:100298. doi: 10.1016/j.lana.2022.100298. PMID: 36777324; PMCID: PMC9903988.

SCHMITZ, H. et al. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 116, n. 2, p. 301–309, 1999.

Seyedian SS, Nokhostin F, Malamir MD. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. **J Med Life**. 2019 Apr-Jun;12(2):113-122. doi: 10.25122/jml-2018-0075. PMID: 31406511; PMCID: PMC6685307.

SOTELO-PARRILLA, Gema et al. Motor, mood, and memory impairments persist during remission periods in chronic colitis and are influenced by neuroinflammation and sex. *FASEB Journal*, v. 38, n. 20, p. 1–17, 2024.

The Lancet Regional Health – Americas, Volume 13, 100298

Vavricka SR, et al. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. **Inflamm. Bowel Dis**. 2015;21:1982–1992. doi: 10.1097/MIB.0000000000000392.

WIRTZ, Stefan et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nature Protocols*, v. 12, n. 7, p. 1295–1309, 2017.

Yan JB, Luo MM, Chen ZY, He BH. A função e o papel do equilíbrio das células Th17/Treg na doença inflamatória intestinal. *J Immunol Res*. 2020 15 de dez; 2020:8813558. doi: 10.1155/2020/8813558. PMID: 33381606; PMCID: PMC7755495.

Yao JJ, Zhao QR, Lu JM, Mei YA. Functions and the related signaling pathways of the neurotrophic factor neuritin. **Acta Pharmacol Sin**. 2018 Sep;39(9):1414-1420. doi: 10.1038/aps.2017.197. Epub 2018 Mar 29. PMID: 29595190; PMCID: PMC6289377.

Yu H, Nishio H, Barbi J, Mitchell-Flack M, Vignali PDA, Zheng Y, Lebid A, Chang KY, Fu J, Higgins M, Huang CT, Zhang X, Li Z, Blosser L, Tam A, Drake CG, Pardoll DM. Neurotrophic factor Neuritin modulates T cell electrical and metabolic state for the

balance of tolerance and immunity. bioRxiv [Preprint]. 2024 Aug 7:2024.01.31.578284. doi: 10.1101/2024.01.31.578284. Update in: Elife. 2024 Nov ZHANG, Zuo; ZHOU, Hongli; ZHOU, Jiyin. Neuritin inhibits astrogliosis to ameliorate diabetic cognitive dysfunction. Journal of Molecular Endocrinology, v. 66, n. 4, p. 259–272, 2021.