



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO FISILOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

HUMBERTO BARBOSA DA COSTA FILHO

**TOFACITINIBE, UM INIBIDOR DE JAK, ATENUA A INFLAMAÇÃO E A PERDA
DA INTEGRIDADE EPITELIAL EM MODELO DE COLITE POR TNBS EM RATOS**

FORTALEZA - CE

2023

HUMBERTO BARBOSA DA COSTA FILHO

**TOFACITINIBE, UM INIBIDOR DE JAK, ATENUA A INFLAMAÇÃO E A
PERDA DA INTEGRIDADE EPITELIAL EM MODELO DE COLITE POR TNBS
EM RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza

FORTALEZA-CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C872t Costa Filho, Humberto Barbosa da.
Tofacitinibe, um inibidor de JAK, atenua a inflamação e a perda da integridade epitelial em modelo de colite por TNBS em ratos / Humberto Barbosa da Costa Filho. – 2023.
94 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza.
1. Colite . 2. Tofacitinibe. 3. Inflamação. 4. Permeabilidade. I. Título.

CDD 615.1

HUMBERTO BARBOSA DA COSTA FILHO

TOFACITINIBE, UM INIBIDOR DE JAK, ATENUA A INFLAMAÇÃO E A
PERDA DA INTEGRIDADE EPITELIAL EM MODELO DE COLITE POR TNBS
EM RATOS

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Farmacologia da
Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Marcellus
Henrique Loiola Ponte de Souza

Aprovada em: 14/08/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)
(Orientador)

Prof. Dr. Heitor Siffert Pereira de Souza
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Prof^a. Dr^a. Raquel Franco Leal
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAR)

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao meu irmão, Jones Barbosa Lima Neto

A minha esposa, Nayla Barbosa.

Aos meus pais, Humberto e Ilze.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Jeová, pelo dom da vida e por me dar forças para sempre suportar momentos de aflições e por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho.

A meus pais, Humberto e Ilze, pela educação, carinho e segurança. Pela fé que demonstram em mim e por sempre me ajudarem em momentos difíceis sendo sempre meu porto seguro.

A minha esposa, Nayla, por sempre me apoiar, me fazer sorrir e a encarar sempre o lado bom das coisas. Por dar razão a minha vida e fazê-la mais feliz.

Ao meu irmão, Jones, pela grande amizade, exemplo e incentivo de sempre. Por ter sido um grande irmão e espelho para mim. Todas as minhas conquistas são para ele.

Ao meu orientador, prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza, por todos os ensinamentos e pela oportunidade que me deu em me orientar. Pela dedicação em suas orientações prestadas na elaboração deste trabalho, incentivando-me e colaborando no desenvolvimento das pesquisas.

Ao prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa, pela ajuda, pelas suas correções, disponibilidade quando sempre precisei e por todo o apoio nesta minha caminhada.

Ao prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares, pela atenção que demonstra a todos os alunos do LEFFAG e cordialidade de sempre.

Ao prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, por toda ajuda, pela disponibilidade e atenção em todos os momentos.

Ao prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos, pela cordialidade de sempre, por todo apoio e determinação de sempre querer ajudar.

Ao Thiago Meneses, pela amizade, companheirismo, parceria nos experimentos e por ajudar a fazer o dia a dia no laboratório mais alegre.

Ao Genilson Júnior, pela amizade e conversas sábias e edificantes, tornando o ambiente da pesquisa mais alegre.

A Suliana, pela amizade, grandes ajudas nos cálculos e experimentos e pelo apoio emocional no ramo da pesquisa.

A Marcia, por toda ajuda com os experimentos de Western Blotting.

Ao Carlos e ao Álvaro pelas ajudas em testes bioquímicos e conversas agradáveis no laboratório.

A todos os componentes do LEFFAG que ajudaram diretamente ou indiretamente no curso do meu Doutorado.

Ao apoio do Éwerton e da Luciana, do Laboratório Multiusuário do Departamento da Farmácia, por toda ajuda nas revelações das membranas de Wester Blotting.

A todos os funcionários do Centro de Biomedicina da UFC.

A UFC e a Pós-Graduação em Farmacologia, por terem me dado a chance e todos os instrumentos que me possibilitaram chegar ao final desse ciclo.

A FUNCAP, pelo incentivo à pesquisa e suporte financeiro que me ofereceu durante o meu Doutorado.

RESUMO

Introdução: As Doenças inflamatórias intestinais (DII) podem ser desencadeadas por distúrbios na integridade da mucosa intestinal, levando a transmigração bacteriana. É essencial que o tratamento das DIIs vise não apenas reduzir a inflamação, mas também atenuar os danos da função da barreira mucosa. A inibição das Janus quinases (JAK) tem sido alvo para o tratamento de doenças inflamatórias, inclusive de colite ulcerativa. Entretanto, pouco se sabe sobre a capacidade dessa classe de fármacos em atenuar a perda da integridade da mucosa. **Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tofacitinibe, um inibidor da via JAK, sobre a inflamação e a integridade da mucosa cólica no modelo de colite induzida por TNBS em ratos. **Metodologia:** A colite foi induzida em ratos Wistar pela administração retal de TNBS (20 mg + etanol 50%). O grupo controle recebeu apenas soro fisiológico. Os animais foram pré-tratados com tofacitinibe (15 mg/kg) ou solução salina 30 minutos antes da indução e duas vezes ao dia. Após 7 dias da indução, os animais foram eutanasiados, o cólon removido e avaliada a atividade de mieloperoxidase, resistência elétrica transepitelial (RET) basal, RET após 1h e permeabilidade à fluoresceína. Além disso, RT-PCR e Western Blotting para junções estreitas no cólon (ZO-1, Ocludina, Claudina-2, Claudina-15 e Tricellulin). **Resultados:** O tratamento com tofacitinibe reduziu significativamente ($p < 0,05$) os parâmetros inflamatórios avaliados. Além disso, preservou a integridade da barreira epitelial intestinal quando comparado ao grupo colite ($p < 0,05$), aumentando os níveis de RET basal, reduzindo a queda da RET após 1 hora e a permeabilidade paracelular à fluoresceína, por meio do aumento da expressão relativa de Ocludina e da redução da expressão de Claudina-2 e de Claudina-15. **Conclusão:** Concluímos que a inibição da JAK pelo tofacitinibe foi capaz de reduzir não só o processo inflamatório, mas também a perda da integridade da mucosa em modelo de colite experimental.

Palavras-chave: Colite; Inibidor de JAK; Inflamação; Permeabilidade.

ABSTRACT

TOFACITINIB, A JAK INHIBITOR, ATTENUATES INFLAMMATION AND LOSS OF EPITHELIAL INTEGRITY IN A TNBS COLITIS MODEL IN RATS

Introduction: IBDs can be triggered by disturbances in the integrity of the intestinal mucosa, leading to bacterial transmigration. It is essential that the treatment of IBD aims not only to reduce inflammation, but also to reduce the damage to the mucosal barrier function. Inhibition of Janus kinases (JAK) has been targeted for the treatment of inflammatory diseases, including ulcerative colitis. However, little is known about the ability of this class of drugs to reduce the loss of mucosal integrity. **Aim:** The present study aimed to evaluate the effect of tofacitinib, a JAK pathway inhibitor, on the inflammation and integrity of the colonic mucosa in a TNBS-induced colitis model in rats. **Methodology:** Colitis was induced in Wistar rats by rectal administration of TNBS (20 mg + 50% ethanol). The control group received only saline solution. Animals were pretreated with tofacitinib (15 mg/kg) or saline 30 minutes before induction and twice daily. After 7 days of induction, the animals were euthanized, the colon removed and myeloperoxidase activity, baseline transepithelial electrical resistance (TER), TER after 1h and fluorescein permeability were evaluated. In addition, RT-PCR and Western Blotting for colon tight junctions (ZO-1, Occludin, Claudin-2, Claudin-15 and Tricellulin). **Results:** Treatment with tofacitinib significantly reduced ($p < 0.05$) the evaluated inflammatory parameters. In addition, it preserved the integrity of the intestinal epithelial barrier when compared to the colitis group ($p < 0.05$), increasing basal TER levels, reducing TER drop after 1 hour and paracellular permeability to fluorescein, by increasing the relative expression of Occludin and reduction of expression of Claudin-2 and Claudin-15. **Conclusion:** We conclude that JAK inhibition by tofacitinib was able to reduce not only the inflammatory process, but also the loss of mucosal integrity in an experimental colitis model.

Keywords: Colitis; Tofacitinib; JAK Inhibitor; inflammation; Permeability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Descobridores da colite ulcerativa e da doença de Crohn.	18
Figura 2: Manifestações da colite ulcerativa e da doença de Crohn.	19
Figura 3: Incidência e prevalência mundial das DIIs.	21
Figura 4: Pacientes com DIIs no Brasil por faixa etária e sexo.	22
Figura 5: Fatores imunológicos envolvidos na doença de Crohn.	24
Figura 6: Interação de fatores associados a causa da doença de Crohn.	25
Figura 7: Micrografia eletrônica e desenho correspondente ao complexo juncional de células epiteliais intestinais.	28
Figura 8: Estrutura molecular do tofacitinibe.	35
Figura 9: Mecanismo de ação do tofacitinibe.	36
Figura 10: Representação esquemática do estudo da RET em câmara de Üssing.	45
Figura 11: Representação esquemática do estudo da permeabilidade à fluoresceína na câmara de Üssing.	46
Figura 12: Fotografias das mucosas cólicas de ratos.	51
Figura 13: Pranchas histológicas da mucosa cólica de ratos em modelo de colite induzida por TNBS.	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Peso úmido dos cólons de ratos em modelo de colite induzida por TNBS.....	50
Gráfico 2: Escores macroscópicos de lesão da mucosa cólica de ratos em modelo de colite induzida por TNBS.	52
Gráfico 3: Teste de MPO dos cólons de ratos em modelo de colite induzida por TNBS.....	55
Gráfico 4: Dosagem de citocinas dos cólons de ratos no modelo de colite induzida por TNBS..	57
Gráfico 5: RET basal dos cólons de ratos no modelo de colite induzida por TNBS.....	58
Gráfico 6: Avaliação da queda da RET, no período de 60 minutos, no modelo de colite induzida por TNBS em ratos.	59
Gráfico 7: Avaliação da permeabilidade à Fluoresceína, no período de 90 minutos, no modelo de colite induzida por TNBS em ratos.	60
Gráfico 8: Avaliação da expressão relativa de RNA de proteínas de junção da mucosa cólica de ratos em modelo de colite por TNBS por meio da técnica de PCR.....	62
Gráfico 9: Avaliação de proteínas de junção da mucosa cólica de ratos em modelo de colite por TNBS por meio da técnica de Western Blotting.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação dos escores macroscópicos das lesões intestinais de animais com colite induzida por TNBS.....	40
Tabela 2: Escores microscópicos para avaliação de fragmentos de tecido intestinal de animais com colite induzida por TNBS em ratos.....	42
Tabela 3: Escores microscópicos de lesão em modelo de colite por TNBS em ratos.....	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DIIs: Doenças Inflamatórias Intestinais

DATA-SUS: Departamento de Informática em Saúde/Ministério da Saúde

JEs: Junções estreitas

TNBS: Ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral-alfa

IL: Interleucina

JAK: Janus quinase

APC: Células apresentadoras de antígenos

TLR: Receptores semelhantes a Toll

Th: Células T helper

Treg: Células T reguladoras

MAdCAM: Molécula de adesão celular de endereçamento da mucosa

IFN- γ : Interferon-gama

TGF- β : Fator de crescimento transformador beta

AINEs: Anti-inflamatórios não esteroidais

NOD2: Domínio 2 de oligomerização de ligação a nucleotídeos

CARD: Domínio de recrutamento de caspases

ZOs: zônulas de oclusão

JAM: Moléculas de adesão juncional

6-TGn: Nucleotídeo 6-tioguanina

ATP: Trifosfato de adenosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Visão geral sobre as DIIs	18
2.2 Epidemiologia das DIIs.....	20
2.3 Fisiopatologia da doença de Crohn	22
2.4 Causas e fatores de risco da doença de Crohn	24
2.4.1 Fatores ambientais.....	25
2.4.2 Fatores genéticos.....	26
2.4.3 Fatores microbianos intestinais	26
2.5 Permeabilidade intestinal.....	27
2.5.1 Componentes e funções fisiológicas da barreira epitelial intestinal	27
2.5.2 Barreira epitelial intestinal na doença de Crohn	29
2.6 Modelos experimentais de DIIs.....	30
2.6.1 Visão geral dos modelos experimentais de colite.....	30
2.6.2 Modelo experimental de colite induzida por TNBS	31
2.7 Via de sinalização JAK/STAT.....	32
2.8 Terapias convencionais para o tratamento de doença de Crohn.....	33
2.9 Tofacitinibe.....	35
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4 METODOLOGIA	38
4.1 Local e período	38
4.2 Animais	38
4.3 Aspectos éticos	38

4.4 Grupos experimentais	39
4.5 Indução da colite por TNBS	39
4.6 Métodos para avaliação da inflamação.....	40
4.6.1 Avaliação do peso úmido dos cólons de animais.....	40
4.6.2 Avaliação dos escores macroscópicos de lesão	40
4.6.3 Avaliação dos escores microscópicos de lesão	41
4.6.4 Ensaio de Mieloperoxidase (MPO).....	42
4.6.5 Mensuração de Citocinas (IL-6 e IL-1β).....	43
4.7 Métodos para avaliação da integridade da mucosa cólica	43
4.7.1 Protocolo executado na câmara de Üssing	43
4.7.1.1 Montagem do tecido na câmara.....	43
4.7.1.2 Avaliação da Resistência Elétrica Transepitelial (RET).....	44
4.7.1.3 Avaliação da permeabilidade à fluoresceína.....	45
4.7.2 Expressão de RNA através da técnica de PCR.....	46
4.7.3 Expressão proteica através da técnica de Western Blotting.....	47
4.8 Análises estatísticas.....	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Tofacitinibe reduz parâmetros inflamatórios induzidos na colite por TNBS.....	50
5.1.1 Tofacitinibe reduz peso úmido dos cólons em modelo de colite induzida por TNBS em ratos.	50
5.1.2 Tofacitinibe previne danos macroscópicos na mucosa cólica em modelo de colite induzida por TNBS em ratos.	51
5.1.3 Tofacitinibe atenua danos microscópicos na mucosa cólica em modelo de colite induzida por TNBS em ratos.	53
5.1.4 Tofacitinibe reduz concentração de MPO dos cólons em modelo de colite induzida por TNBS em ratos.....	55

5.1.5 <i>Tofacitinibe reduz níveis de citocinas em modelo de colite por TNBS em ratos</i>	56
5.2 <i>Tofacitinibe preserva a integridade da mucosa cólica de ratos no modelo de colite induzida por TNBS</i>	58
5.2.1 <i>Tofacitinibe preserva a RET basal no modelo de colite induzida por TNBS em ratos</i>	58
5.2.2 <i>Tofacitinibe reduz a queda da RET no modelo de colite induzida por TNBS em ratos</i>	59
5.2.3 <i>Tofacitinibe reduz a permeabilidade à fluoresceína no modelo de colite induzida por TNBS em ratos</i>	60
5.2.4 <i>Avaliação da expressão relativa de RNA de proteínas de junção da mucosa cólica de ratos em modelo de colite por TNBS por meio da técnica de PCR</i>	61
5.2.5 <i>Avaliação de proteínas de junção da mucosa cólica de ratos em modelo de colite por TNBS por meio da técnica de Western Blotting</i>	63
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS.....	78
Anexos	93

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs) são caracterizadas como uma inflamação crônica da mucosa do intestino e tem como principais representantes a doença de Crohn e a colite ulcerativa, que se diferem em diversos aspectos, como por exemplo, na localização e distribuição da inflamação e nas populações celulares da mucosa envolvidas na reação imunológica (BILLMEIER et al., 2016).

Além das manifestações intestinais, as DIIs também podem atingir outras regiões, afetando cerca de 35% dos pacientes (MUHVIĆ-UREK et al., 2016). Associado a isso, portadores dessas doenças ainda podem desenvolver distúrbios psicossociais, como estresse, ansiedade e depressão (WINTJENS et al., 2019; ANANTHAKRISHNAN et al., 2013; BERNSTEIN et al., 2019; NEUENDORF et al., 2016).

A soma desses problemas gerados pelas DIIs faz com que os seus portadores tenham baixa qualidade de vida, repercutindo em perda de produtividade e desempregos (ZHAO et al., 2021; KNOWLES et al., 2018).

Um fato que é bastante preocupante é a alta prevalência e o aumento da incidência em países recentemente industrializados, segundo Siew e colaboradores (2017).

No Brasil, esses resultados não são diferentes. Um levantamento feito no Departamento de Informática em Saúde/Ministério da Saúde (DATA-SUS) entre os anos de 2012 a 2020 mostrou que a incidência das DIIs subiu 0,80%, enquanto a prevalência teve um aumento de 14.87% da variação anual percentual média, sendo a maioria dos portadores, mulheres com idade entre 35 e 55 anos (QUARESMA et al., 2020).

Pesquisas apontam ainda que as junções estreitas (JEs) presentes nas células epiteliais intestinais são responsáveis por formar uma das estruturas fundamentais dessa barreira (HEINEMANN; SCHUETZ, 2019; CHELAKKOT et al., 2018). A principal função atribuída às JEs é a “função de portão e cerca”, que permite o transporte paracelular de alguns solutos e moléculas, mas impede o transporte intramembrana de proteínas, lipídios e peptídeos derivados de microrganismos (CHELAKKOT et al., 2018), dando assim a característica seletiva dessas proteínas.

Por outro lado, em condições patológicas, como observado nas DIIs, ocorre desequilíbrio no estado saudável da barreira do intestino, ocasionando perda da homeostase intestinal, pode ser determinado por mudanças na microbiota intestinal, um epitélio intestinal defeituoso ou pela imunidade prejudicada do hospedeiro (LIN et al., 2022).

A partir da importância que DIIs representam para a humanidade, na tentativa de busca pelo conhecimento dessas doenças e pelo aprofundamento da fisiopatologia envolvida, alguns modelos experimentais foram criados. Um exemplo disso é o modelo de indução da colite pela associação de etanol e ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS). O TNBS é um agente sensibilizador de contato que causam colite transmural mediada por células T que se assemelha à doença de Crohn em humanos (MORRIS et al., 1989).

A partir desses modelos animais de colite, foi possível associar vários fármacos ao tratamento das DIIs. Mais recentemente, surgiu para utilização de tratamento das DIIs o uso do ustekinumabe, que tem como mecanismo de ação a ligação e interferência com as citocinas pró-inflamatórias IL-12 e IL-23 (WEAVER et al., 2019; KOTZE et al., 2018).

Apesar da grande contribuição desses fármacos para a redução do quadro inflamatório, vários efeitos colaterais estão associados, além de não impedirem que haja recidiva, sendo necessário que as buscas por novos agentes terapêuticos continuem (YESHI et al., 2020; HAZEL; O'CONNOR, 2020).

Mais recentemente, o tofacitinibe, já utilizado para tratamento de artrite reumatóide e artrite psoriática, também está licenciado para o tratamento de colite ulcerativa (LIU et al., 2022). Este fármaco é um inibidor da via transdutor de sinal Janus quinase (JAK), o que impede o desencadeamento da via STAT e a sinalização a jusante das citocinas de cadeia γ IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 e IL-21 e a síntese de pró-inflamatórias proteínas que estão implicadas na inflamação da mucosa (HODGE et al., 2016).

Diante do exposto, fica claro o impacto das DIIs na vida de seus portadores. Além disso, a JAK tem sido um alvo para o tratamento de doenças inflamatórias imunes, entretanto, são necessários mais estudo sobre sua aplicabilidade no quadro inflamatório, além da avaliação da capacidade dessa classe farmacológica em atenuar a perda da integridade da mucosa.

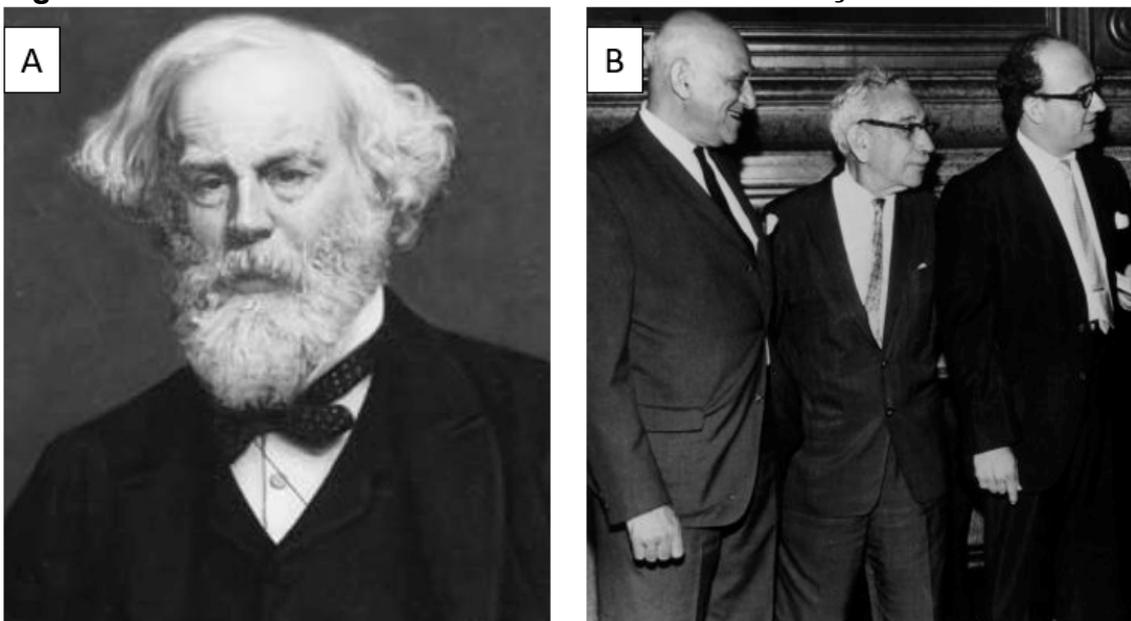
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Visão geral sobre as DIIs

As DIIs ocorrem de forma crônica e recorrente no intestino (CAI et al., 2021), tornando-se, geralmente, imprevisível e causando crises intestinais inflamatórias (FAWSON et al., 2021).

As principais representantes das DIIs são a colite ulcerativa, descrita pela primeira vez em 1859 pelo médico britânico Samuel Charles Wilks (WILKIS, 1859) (Figura 1A), e a doença de Crohn, mencionada primeiramente em 1932 pelos Doutores Burrill Crohn, Leon Ginzberg, and Gordon D. Oppenheimer (AUFSES, 2001) (Figura 1B). Essas duas doenças geralmente são consideradas juntas devido às semelhanças, incluindo inflamação gastrointestinal, gravidade e sintomas crescentes e etiologia desconhecida (NOROUZKHANI et al., 2023). Porém, elas se diferenciam devido algumas características.

Figura 1: Descobridores da colite ulcerativa e da doença de Crohn.

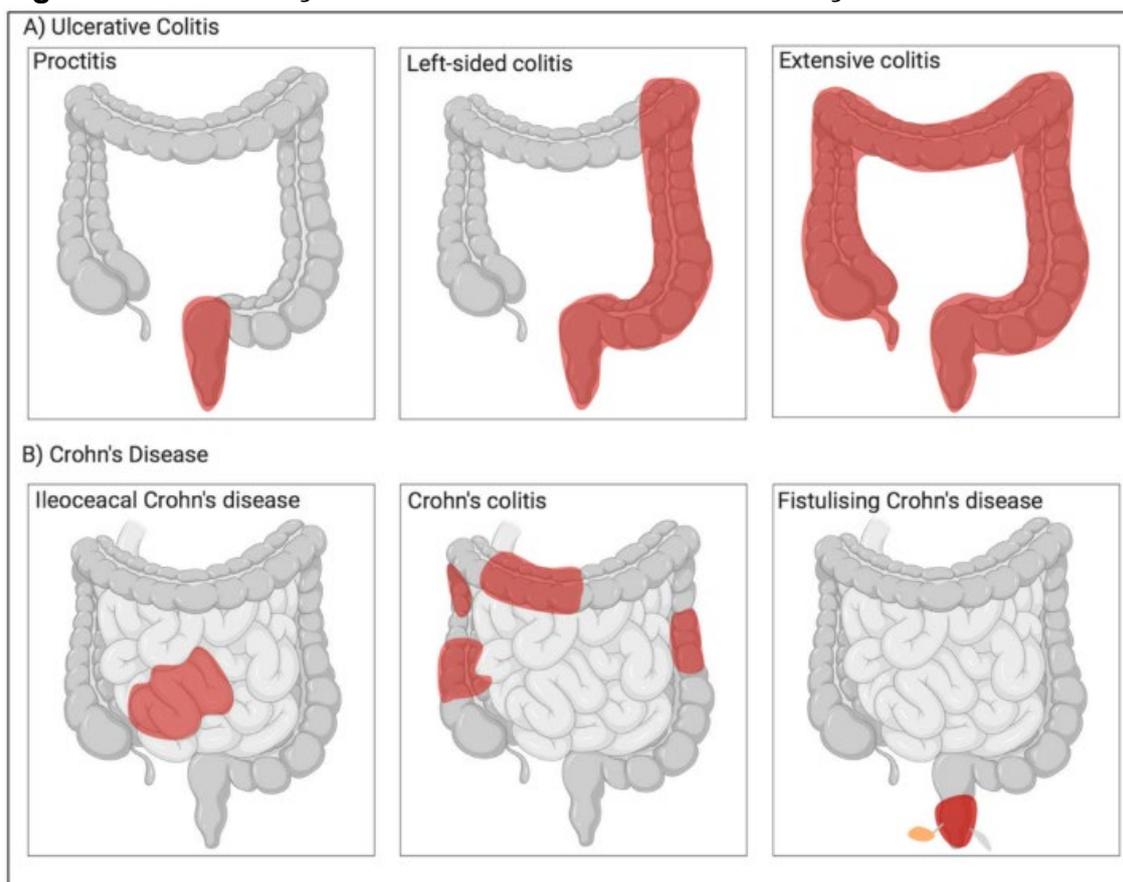


Fonte: Crohn's and Colitis Fundaction; Stone (2010).

Uma dessas diferenças está na localização e dano da inflamação. A colite ulcerativa é caracterizada por inflamação tipicamente limitada à camada mucosa, que se inicia no reto e se estende pelo cólon de forma contínua (Figura 2A) (KOBAYASHI et al., 2020; YESHI et al., 2020). Por outro lado, a inflamação na doença de Crohn (Figura 2B) é caracterizada por ser transmural, envolvendo

todas as camadas da parede intestinal, sendo responsável por ocasionar fibrose, estenose e fístula. Além disso, a doença de Crohn demonstra lesões irregulares e descontínuas que podem estar espalhadas em qualquer parte do trato gastrointestinal, desde a boca até o ânus (BAUMGART; SANDBORN, 2012; YESHI et al., 2020).

Figura 2: Manifestações da colite ulcerativa e da doença de Crohn.



Fonte: YESHI et al., 2020.

Outra característica que diferencia essas duas doenças são as características clínicas. Um exemplo disso está na presença mais comum de hematoquezia e passagem de muco ou pus na colite ulcerativa. Entretanto, a apresentação de doença perianal, fístulas e obstrução do cólon e do intestino delgado são comuns na doença de Crohn (YESHI et al., 2020).

Além das manifestações intestinais, as DIIs também podem afetar outras regiões, afetando cerca de 35% dos pacientes (MUHVÍĆ-UREK et al., 2016). Como exemplo dessas regiões extra intestinais são citadas as articulações, pele ou olhos; e, com menor frequência, fígado, pulmão e pâncreas,

ocasionando algumas manifestações, como, artrite periférica, úlceras aftosas orais, eritema nodoso, uveíte anterior, espondilite anquilosante, colangite esclerosante primária, dentre outras (ROGLER et al., 2021)

Apesar dessas diferenças existentes entre essas formas de DIIs, vale ressaltar o grande impacto que elas causam à sociedade. Além das complicações estruturais do trato gastrintestinal, estudos recentes apontam que pessoas acometidas por DIIs desenvolvem alguns distúrbios psicossociais. É descrito que pacientes com DIIs apresentam taxas mais elevadas de estresse, ansiedade e depressão, quando comparados a pessoas saudáveis (WINTJENS et al., 2019; ANANTHAKRISHNAN et al., 2013; BERNSTEIN et al., 2019; NEUENDORF et al., 2016).

Outro comprometimento ocasionado pelas DIIs é no setor econômico. Além da perda da qualidade de vida, implicando em custos indiretos substanciais, com perda de produtividade e desempregos, as DIIs apresentam altos gastos relacionados a medicamentos, com o uso crescente de terapia biológica e outros novos agentes, hospitalizações e cirurgias (ZHAO et al., 2021).

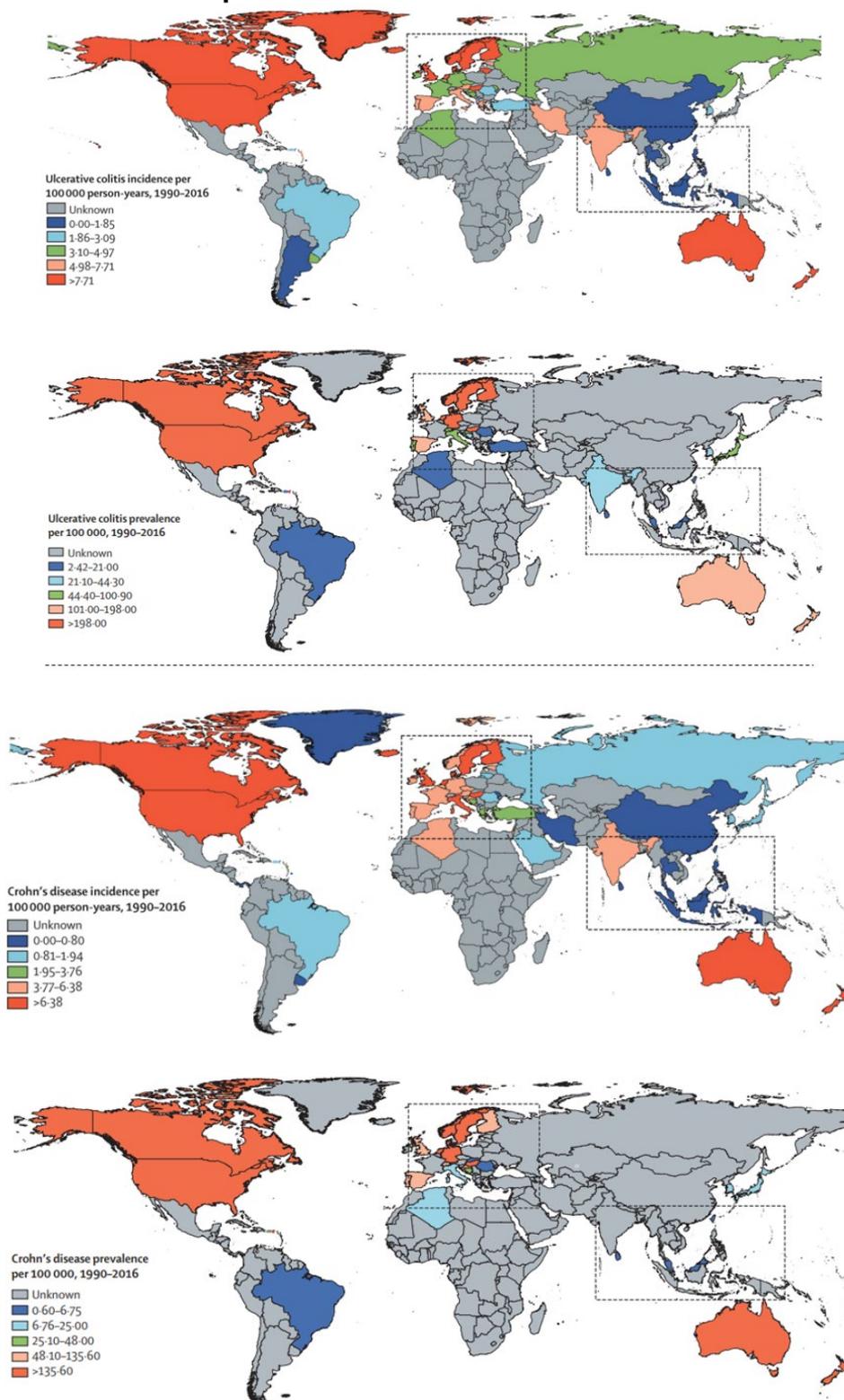
Outros estudos ainda relataram que as condições metais e físicas desfavoráveis ocasionadas pelas DIIs resulta na diminuição da qualidade de vida dos seus portadores, tanto adultos quanto para crianças (KNOWLES et al., 2018).

2.2 Epidemiologia das DIIs

As DIIs são consideradas um problema de saúde pública em muitos países. Trabalhos retrospectivos realizados sobre a epidemiologia dessas doenças demonstraram a sua importância.

Siew e colaboradores (2017) fornecem uma revisão sistemática de uma visão abrangente global da incidência e da prevalência das DIIs no período de 1990 a 2016, identificando uma mudança substancial na epidemiologia dessas doenças. Foi demonstrado nesse estudo que desde 1990, a incidência das DIIs se estabilizou no mundo ocidental, mas a prevalência permanece alta. No entanto, os países recentemente industrializados estão enfrentando uma incidência crescente, diferentemente do observado nas tendências do mundo ocidental durante a última parte do século XX (Figura 3) (SIEW et al., 2017).

Figura 3: Incidência e prevalência mundial das DIIs.



Fonte: Siew et al., 2017.

Pesquisas mais recentes ainda demonstram que o rápido aumento na incidência de DIIs no Oriente, associado ao envelhecimento da população, torna

possível que haja um aumento exponencial no número de pacientes com DIIs em todo o mundo (MAK et al., 2020).

No Brasil, uma pesquisa realizada por Quaresma e colaboradores (2020), a partir de dados que foram extraídos do Departamento de Informática em Saúde/Ministério da Saúde (DATA-SUS), entres os anos de 2012 a 2020, apontou que a incidência das DIIs subiu 0,80% e a prevalência 14,87% da variação anual percentual média. Esse estudo ainda mostrou que houve predomínio do sexo feminino, com idade entre 35 e 55 anos (Figura 4).

Figura 4: Pacientes com DIIs no Brasil por faixa etária e sexo.



Fonte: Quaresma et al., 2020.

2.3 Fisiopatologia da doença de Crohn

As respostas imunes inatas oferecem a primeira linha de defesa contra qualquer agressão e são mediadas por uma variedade de diferentes tipos celulares, incluindo células imunológicas clássicas, neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas, bem como células não imunes, como epiteliais, endoteliais e mesenquimais (SOUZA; FIOCCHI, 2016).

A doença de Crohn têm como principal característica patológica, a infiltração de neutrófilos polimorfonucleares e células mononucleares na parte afetada do intestino. Isso ocorre após haver comprometimento da integridade da barreira epitelial intestinal, aumentando, assim, a sua permeabilidade, acarretando em influxo aumentado de antígenos do lúmen. Células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos e células dendríticas,

tornam-se ativadas ao reconhecer bactérias não patogênicas (microbiota comensal) por meio de receptores semelhantes a Toll [por exemplo, receptor 2 semelhante a Toll (TLR)2 e TLR4] (UNGARO et al., 2017).

Níveis elevados de molécula de adesão celular de endereçamento da mucosa-1 (MAdCAM-1) causam aumento do recrutamento de linfócitos associados ao intestino para o trato gastrointestinal saudável e locais de inflamação, implicando seu papel na patogênese da DIIs (Figura 5). A MAdCAM-1 é abundante na mucosa inflamada da doença de Crohn, além disso, estudos apontam que as vênulas MAdCAM-1+ são mais abundantes nas camadas mais profundas do tecido intestinal de pacientes com essa afecção, podendo ainda ser responsáveis pela inflamação transmural (ARIHIRO et al., 2002).

A doença de Crohn é também caracterizada por um desequilíbrio de respostas da célula Th, com predominância de respostas Th1 e IL-17 enquanto há deficiência de respostas de Th2 e de linfócito T regulatório. Portanto, essa resposta imunitária inadequada contribui para maior atuação do sistema imune na doença de Crohn (GUO et al., 2013).

A inflamação do intestino na doença de Crohn exibe um nível aumentado de citocinas pró-inflamatórias, como interferon-gama (IFN- γ) e IL-17A (produzida por células Th1 e Th17, respectivamente). Além disso, a via Th17 (mediada pela IL-17 derivada de células Th17) por sua vez influencia a resposta Th-1 (KOLLS; LINDÉN, 2004).

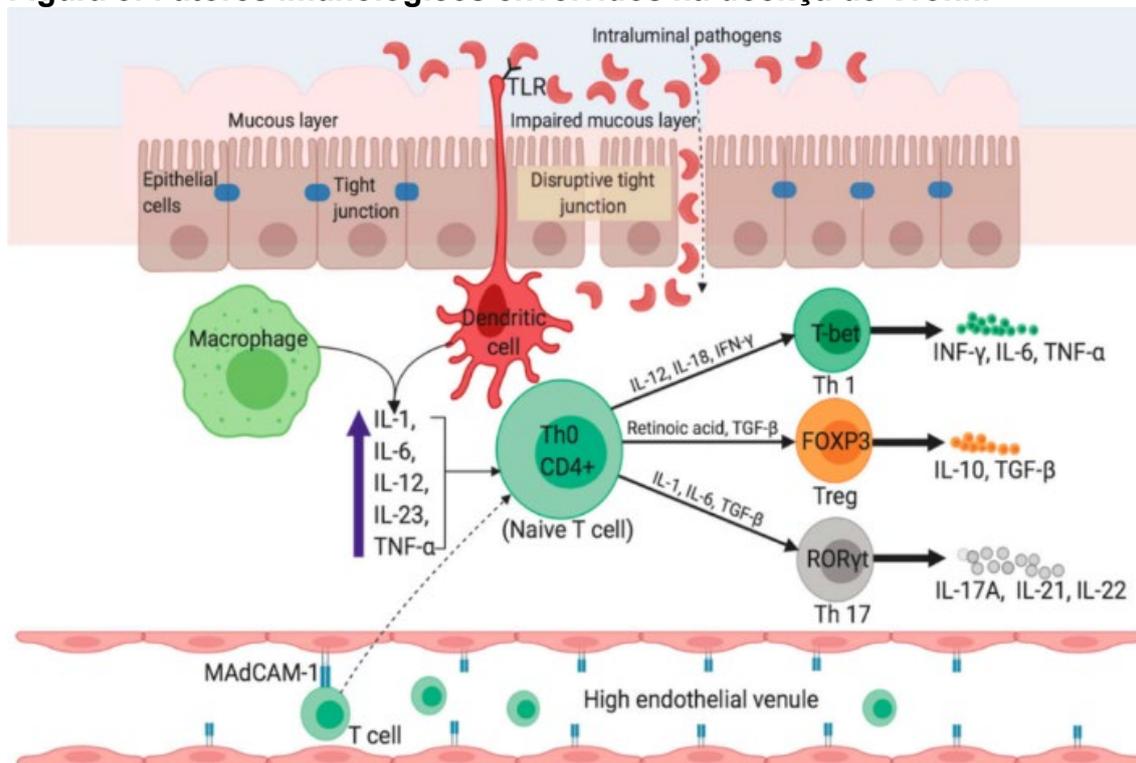
IL-6, IL-23 e fator de crescimento transformador beta (TGF- β), que são produzidos por células imunes inatas e APCs, influenciam a via da IL-17 (Figura 6). A expressão de alto nível de fatores de transcrição (por exemplo, STAT4 e T-bet) e receptores de citocinas (por exemplo, IL-12R β 2) promove a diferenciação de células Th1, que é característica da lâmina própria inflamada de pacientes com doença de Crohn (MATSUOKA et al., 2004).

As APCs ativadas derivadas de IL-12 estimulam o fator de transcrição mestre Th1 T-bet. A expressão de IL-23 por células dendríticas estimula a produção de IL-17 e, como resultado, tanto IL-17 quanto IL-23 estão presentes em níveis elevados em pacientes com doença de Crohn (SARTOR, 2006).

A sinalização de IL-23 é mediada pelo engajamento do heterodímero de IL-23 com o seu receptor heterodímero, esse engajamento ativa a via de sinalização JAK-STAT que regula a transcrição de vários genes (ABRAHAM;

CHO, 2009).

Figura 5: Fatores imunológicos envolvidos na doença de Crohn.

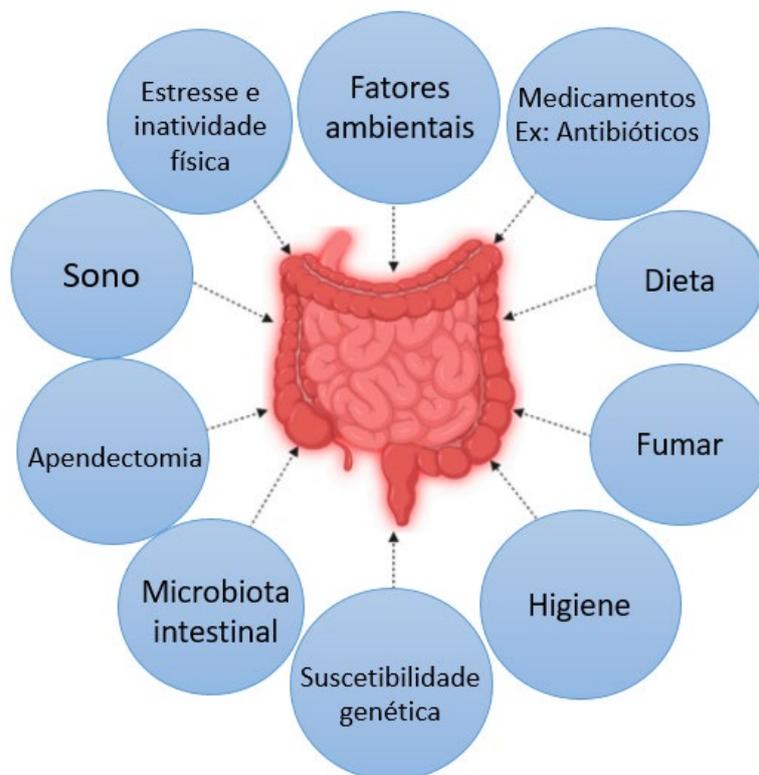


Fonte: YESHI et al., 2020.

2.4 Causas e fatores de risco da doença de Crohn

Embora a causa da doença de Crohn permaneça desconhecida, vários estudos têm contribuído para o progresso em desvendar a patogênese dessas doenças. Alguns fatores têm sido associados à suscetibilidade da doença de Crohn, por exemplo, a genética do portador, a microbiota intestinal, fatores ambientais dentre outros (YESHI et al., 2020) (Figura 6).

Figura 6: Interação de fatores associados a causa da doença de Crohn.



Fonte: Adaptado de YESHI et al., 2020.

2.4.1 Fatores ambientais

Fatores de risco ambientais de grande interesse incluem, entre outros, os seguintes: 1) tabagismo, 2) dieta, 3) disbiose de microorganismos residentes intestinais e exposição a patógenos, 4) estressores psicossociais e 5) medicamentos como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), antibióticos e contraceptivos orais (HO et al., 2019).

As práticas de produção modernas oferecem oportunidades para mudar não apenas a composição fundamental dos alimentos, mas também introduzir muitos aditivos e poluentes pouco estudados, como pesticidas, bifenilos policlorados, conservantes e metais pesados, que podem servir como desencadeadores da doença de Crohn (ALVAREZ; BOYE, 2011).

Além disso, a água e ar também se encontram cada vez mais poluídos por vários tóxicos que são potenciais desencadeadores da doença de Crohn. Até mesmo a água potável também pode conter substâncias tóxicas, incluindo metais pesados e produtos químicos introduzidos como resultado de

fraturamento hidráulico Poluição do ar (KAPLAN et al., 2012; REHMAN et al., 2018).

2.4.2 Fatores genéticos

Estudos de associação ampla do genoma, estudos de sequenciamento de próxima geração e outras análises identificaram mais de 240 loci de risco genético não sobrepostos, dos quais cerca de 30 loci genéticos são compartilhados entre a doença de Crohn e a colite ulcerativa (PETERS et al., 2017; LIU et al., 2015).

O domínio 2 de oligomerização de ligação a nucleotídeos (NOD2) é o primeiro gene associado à doença de Crohn, que é frequentemente mutado em pacientes com essa doença, ocorrendo em cerca de um terço dos pacientes (KUCHARZIK et al., 2006; BAMIAS et al., 2005).

NOD2 é um dos dois sistemas de detecção importantes e distintos para detectar invasores microbianos (YAMAMOTO; MA, 2009). Ele é considerado um receptor intracitoplasmático da família dos receptores do tipo domínio de oligomerização de nucleotídeos que se expressa principalmente em monócitos, células dendríticas e epiteliais (HUGOT et al., 2001). Este receptor é composto por três partes: um domínio C-terminal, um domínio de ligação a nucleotídeos e dois domínios N-terminais de recrutamento e ativação de caspases (CARD) (LECAT et al., 2010).

NOD2 pode reconhecer o fragmento bioativo mínimo de peptidoglicano encontrado na parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, chamado dipeptídeo muramil, além de estar envolvido na via de sinalização inflamatória NF- κ B pela indução da transcrição do gene do fator de necrose tumoral- α (TNF α) (LECAT et al., 2010). Mutações em NOD2/CARD15 implicam em uma inflamação crônica por causar uma "perda de função" da molécula, sendo essas anormalidades associadas à suscetibilidade à doença de Crohn (HUGOT et al., 2001; OGURA et al., 2001).

2.4.3 Fatores microbianos intestinais

Outro fator que é descrito na literatura como importante na fisiopatologia da doença de Crohn são os fatores microbianos intestinais.

Existem relatos na literatura indicando que a microbiota intestinal residente (que inclui bactérias, vírus, e outros organismos) é um aspecto da biologia intestinal que é influenciado pelo ambiente (HO et al., 2019). O microbioma desempenha um papel substancial no controle da função normal do intestino e contribui para a inflamação e doenças sistêmicas, bem como para doença de Crohn (STAPPENBECK; VIRGIN, 2016).

Segundo estudos realizados por Richard e Sokol (2019), os agentes microbianos intestinais são capazes de afetar os sistemas imunológicos de maneiras importantes, afetando o metabolismo do hospedeiro e o desenvolvimento gastrointestinal.

Com base nos estudos em modelos de infecção humana e animal a microbiota intestinal influencia na promoção do desenvolvimento da doença de Crohn. Por exemplo, a presença de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e a *Escherichia coli* aderente-invasiva aumentam em pacientes com doença de Crohn. Já a presença de *Clostridium difficile* é aumentada em pacientes com doença de Crohn em estados de recaída e remissão (MELGAR; SHANAHAN, 2010).

2.5 Permeabilidade intestinal

A barreira intestinal é composta por uma camada espessa de muco secretado, uma camada de células epiteliais e as células da mucosa subjacentes não epiteliais, principalmente leucócitos, com uma grande quantidade de funções, tanto reguladoras quanto efetoras. Os elementos da barreira mudam em diferentes regiões do intestino e podem responder dinamicamente aos desafios ambientais (MCGUCKIN et al., 2009).

2.5.1 Componentes e funções fisiológicas da barreira epitelial intestinal

O conjunto da camada epitelial com as junções entre as células individuais cobre toda a superfície interna do trato gastrointestinal, separando o meio extracelular dos compartimentos internos do corpo e também atuando como uma barreira contra agentes nocivos (HEMPSTOCK et al., 2023).

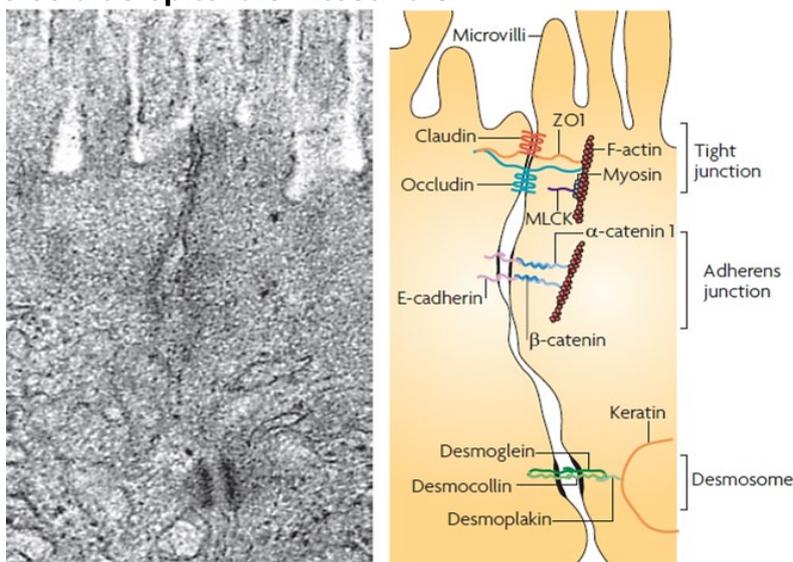
As barreiras epiteliais são seletivas e capazes de excluir conteúdos luminiais potencialmente nocivos, como ácido gástrico, bactérias cólicas e

antígenos bacterianos, ao mesmo tempo em que são capazes de absorção direcional e secreção de grandes volumes de solutos e água. O material pode passar de um lado do epitélio para o outro ao longo de uma de duas vias, através das membranas celulares ou do espaço entre elas, referidos como vias transcelular e paracelular, respectivamente (LEE, 2015).

Um dos componentes da barreira intestinal é o muco, sendo este secretado agindo como uma barreira física e química contra os micróbios. O muco também tem a função de manter a superfície da mucosa bem hidratada e fornecer lubrificação, permitindo o fluxo contínuo do conteúdo luminal (MCGUCKIN et al., 2009).

Outro componente da barreira intestinal é a JE (Figura 7). As JEs são complexos de múltiplas proteínas localizados nas extremidades apicais das membranas laterais das células epiteliais intestinais. Essas estruturas são compostas por várias proteínas transmembranares e citosólicas, incluindo ocludina, claudinas, zônulas de oclusão (ZO), cingulina, moléculas de adesão juncional (JAM) e tricellulin (proteína concentrada em JEs tricelulares) que interagem entre si, bem como com o citoesqueleto, e formam uma arquitetura complexa (HEINEMANN; SCHUETZ, 2019; CHELAKKOT et al., 2018).

Figura 7: Micrografia eletrônica e desenho correspondente ao complexo juncional de células epiteliais intestinais.



Fonte: Figura adaptada de Turner (2009).

A principal função atribuída às JEs é a “função de portão e cerca”, que permite o transporte paracelular de alguns solutos e moléculas, mas impede o transporte intramembrana de proteínas, lipídios e peptídeos derivados de microrganismos (CHELAKKOT et al., 2018), dando assim a característica seletiva dessas proteínas.

A ocludina, a primeira proteína de JE identificada, tem um papel duplo na barreira intestinal. Além dela fornecer a integridade estrutural às JEs, é também um componente integral na função de barreira (FELDMAN et al., 2005).

Outras proteínas importantes das JEs são as claudinas. Existem várias isoformas de claudina, cada uma com funções diferentes, sendo necessário que haja equilíbrio entre suas expressões para que a manutenção da integridade paracelular ocorra (HEMPSTOCK et al., 2023; CHELAKKOT et al., 2018; TSUKITA et al., 2019).

Para a permeabilidade paracelular nas JEs, dois mecanismos de claudinas foram propostos: as claudinas formadoras de canais paracelular ou poros, a qual é composta pelas claudinas -2, -10, -15, -16 e -19; e as formadoras de barreira paracelular, que compreendem as claudinas -1, -3, -4, -5, -7, -11, -14 e -18 (TSUKITA et al., 2019).

Além desses componentes, há também as proteínas andaimas periféricas associadas, ZO-1, ZO-2 e ZO-3. Essas proteínas são necessárias para a montagem das JEs. Elas conectam as proteínas das JEs com o citoesqueleto de actina e com moléculas de sinalização (VASILEVA et al., 2022). A interação entre essas proteínas mantém a estrutura e a função das JEs, mas o papel das proteínas ZO nas JEs ainda não está claro (LIN et al., 2022).

Estudos mostram que a deficiência de ZO-1 não afeta a formação inicial das JEs em células epiteliais de camundongos, no entanto, a falta de ZO-1 atrasa o recrutamento de claudinas e ocludinas, além da formação de barreiras na subsequente formação de JEs (UMEDA et al., 2004).

2.5.2 Barreira epitelial intestinal na doença de Crohn

O desequilíbrio no estado saudável da barreira do intestino, ocasionando perda da homeostase intestinal, pode ser determinado por mudanças na microbiota intestinal, um epitélio intestinal defeituoso ou pela imunidade prejudicada do hospedeiro (LIN et al., 2022).

A perda da integridade da barreira é uma característica da doença de Crohn. Um intestino com alta permeabilidade pode ser um evento inicial na patogênese de distúrbios inflamatórios intestinais, permitindo que moléculas derivadas de bactérias entrem na mucosa e desencadeiem cascatas de sinais inflamatórios incontroláveis (CHELAKKOT et al., 2018).

Pesquisas recentes demonstraram aumento da permeabilidade intestinal nas DIIs (CHIRIAC et al., 2023; CHANG et al., 2017). Embora o mecanismo e o local celular da permeabilidade aumentada, medidos em humanos, não sejam precisamente conhecidos, é provável que esteja ligado às ações das citocinas Th1, TNF e IFN, que são características destas doenças e conhecidas por aumentarem a transmigração (LEE, 2015).

Diferentemente de uma mucosa intestinal saudável, que é uma estrutura fina e bem entrelaçada, após dano e inflamação, a estrutura em malha se solta, resultando na quebra da integridade da barreira (MONACO et al., 2021).

Com isso, ocorre o enfraquecimento das JEs, permitindo o vazamento da mucosa intestinal para a circulação sanguínea e linfática, de alérgenos, microorganismos e metabólitos macromoleculares digeridos de forma incompleta (como glúten, proteínas, peptídeos) e toxinas (como metais pesados ou pesticidas), todos os são responsáveis por causar inflamação (MARTEL et al., 2022).

2.6 Modelos experimentais de DIIs

2.6.1 Visão geral dos modelos experimentais de colite

Um dos modelos experimentais de indução da colite é através da administração de Dextran sulfato de sódio (DSS), um produto químico solúvel em água. A duração da administração do DSS pode ser determinada de acordo com o peso corporal e o índice de atividade da doença, avaliado pela perda de peso, consistência das fezes e hematoquezia para colite (OKAYASU et al., 1990; LEE et al., 2023).

A administração oral de DSS causa danos químicos à monocamada epitelial do tecido intestinal, o que afeta a resposta imune e causa disfunção da barreira mucosa. O modelo murino induzido por DSS exhibe histopatologia semelhante à colite ulcerativa humana principalmente em segmentos distais do

cólon, como encurtamento do cólon e ceco, erosões, úlceras, perda de criptas e infiltração de neutrófilos, bem como perda de peso, sangue oculto nas fezes e diarreia sanguinolenta (OKAYASU et al., 1990).

Embora o mecanismo seja diferente da colite na colite ulcerativa humana, vale a pena analisar o sistema imune inato no desenvolvimento da inflamação do modelo e na regeneração do epitélio intestinal lesionado (LEE et al., 2023).

Outro modelo de colite experimental consiste na indução por ácido acético. Nesse modelo, a colite aguda é induzida por lesão química a partir da instalação desse ácido pela via retal. Notavelmente, embora tenha uma baixa taxa de incidência, a inflamação crônica e a fibrose também podem ser geradas de maneira dependente da dose e do tempo (MACPHERSON; PFEIFFER, 1978).

As alterações histológicas encontradas nesse modelo são, ulceração difusa do cólon distal, ocorrência de estruturas semelhantes a pseudopólipos, alterações na profundidade da cripta e secreção de muco e uma resposta inflamatória transmural inespecífica, simulando algumas características da colite ulcerativa, principalmente em cólon distal (MACPHERSON; PFEIFFER, 1978; LEE et al., 2023).

A deleção do gene IL-10 faz com que camundongos geneticamente modificados desenvolvam inflamação intestinal espontaneamente após os 3 meses de idade (ANDERSON et al., 2011). A inflamação espontânea e contínua é impulsionada por uma resposta de células Th1 que causa infiltração de linfócitos, macrófagos e neutrófilos no cólon. Foi revelado que o microbioma entérico desempenha um papel crucial na ativação do sistema imunológico em camundongos nocautes para IL-10 ((LEE et al., 2023).

Outros modelos de indução da colite que mimetizam as DIIs também são descritos na literatura, por exemplo, pelo uso de carragena, peroxinitrito, oxazolona, e outros modelos genéticos (LEE et al., 2023).

2.6.2 Modelo experimental de colite induzida por TNBS

O TNBS é um agente sensibilizador de contato que causa colite transmural mediada por células T que se assemelha à doença de Crohn em humanos. Esse modelo consiste em administrar pela via retal, uma mistura de

etanol associado a TNBS e, em seguida, segurar o animal pela cauda, mantendo-o de cabeça para baixo para evitar o refluxo do conteúdo (MORRIS et al., 1989).

Uma vez administrado, o etanol danifica principalmente a mucosa intestinal e permite que o TNBS penetre na parede intestinal (MORRIS et al., 1989; LEE et al., 2023; CARVALHO et al., 2018; MONTEIRO et al., 2021).

Após esse processo, a haptização de proteínas derivadas do cólon ou da microbiota causa a geração de células B específicas de trinitrofenil e respostas do tipo Th1. Dessa maneira, esse modelo é capaz de, com uma única dose de administração retal resultar em uma reação inflamatória aguda pela ativação de citocinas relacionadas a Th1 (MORRIS et al., 1989; LEE et al., 2023).

A administração via retal semanal de TNBS, durante aproximadamente 45 a 49 dias, induz colite crônica caracterizada por níveis aumentados de IL-17 e IL-23. A repetição e o aumento da dosagem de TNBS ao longo de 6 semanas podem induzir fibrose no modelo de colite crônica (FICHTNER-FEIGL et al., 2005).

Vários estudos mostraram uma quantidade aumentada de colágeno no tecido do cólon e fibrose intestinal arquitetônica pela coloração de tecido tricrômico de Masson em camundongos BALB/c. O fator transformador de crescimento (TGF)- β 1 é considerado um fator crucial que impulsiona poderosamente a fibrose no intestino, bem como em essencialmente todos os outros órgãos (BABYATSKY et al., 1996; LEE et al., 2023).

Foi revelado que as citocinas Th2 e as produções de TGF- β 1 induzidas por IL-13 são predominantemente aumentadas no estágio tardio da inflamação, enquanto as concentrações de IL-12p70 e interferon- γ aumentam no estágio inicial (FICHTNER-FEIGL et al., 2007). Além disso, a fibrogênese induzida por TNBS também é dependente da ativação do fator nuclear kappa B (WU; CHAKRAVARTI, 2007).

2.7 Via de sinalização JAK/STAT

A via de sinalização Janus quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição (JAK/STAT) é considerada um dos pontos centrais de comunicação na função celular. Mais de 50 citocinas e fatores de crescimento foram identificados na via de sinalização JAK/STAT, como hormônios, interferons

(IFN), interleucinas (ILs) e fatores estimuladores de colônias (DARNELL et al., 1997).

Existem 4 membros na família JAK: JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2. A família STAT compreende sete membros: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6. (HU et al., 2021).

A sinalização JAK/STAT ocorre quando o ligante da célula interage com seu receptor para causar a dimerização do receptor. A conexão entre o ligante e o receptor induz a transfosforilação de JAK. A JAK ativada causa a fosforilação da tirosina do receptor ligado, formando um local de ancoragem para STATs (VIRTANEN et al., 2019; O'SHEA et al., 2015). Nesse local de ancoragem, JAK fosforila STAT e, em seguida, STAT se dissocia do receptor e forma homodímeros ou heterodímeros por meio de interações do domínio SH2-fosfotirosina. Esses dímeros se translocam para o núcleo da célula, regulando a transcrição dos genes alvo, promovendo mais inflamação (O'SHEA et al., 2015; DURHAM et al., 2019; LIU et al., 2022; LEFEVRE; VANDE, 2020).

STAT geralmente regula a transcrição através dos seguintes mecanismos: (1) STAT liga-se ao seu sítio alvo de DNA para conduzir a ativação da transcrição; (2) a proteína STAT pode formar um complexo de transcrição com fatores de transcrição não STAT para desencadear a transcrição mediada por STAT; (3) STAT associa-se a elementos de ligação de DNA não STAT para promover a transcrição dependente de STAT; (4) fatores de transcrição STAT e não STAT podem ativar sinergicamente a transcrição por ligação a grupos de sítios de ligação de DNA independentes (HU et al., 2021).

Os eventos posteriores mediados por JAK/STAT são vários, dentre eles, hematopoese, aptidão imunológica, reparação tecidual, inflamação, apoptose e adipogênese (OWEN et al., 2019).

2.8 Terapias convencionais para o tratamento de doença de Crohn

O diagnóstico imediato e a identificação dos objetivos específicos do tratamento (por exemplo, cicatrização da mucosa) da doença de Crohn podem ajudar a criar melhores resultados a longo prazo para os pacientes (YESHI et al., 2020).

Na atualidade, alguns fármacos já são utilizados para essas finalidades. Podemos citar, por exemplo, o uso, o infliximabe, um anticorpo

monoclonal anti-TNF- α . Ele age ligando-se ao TNF- α , interferindo assim na atividade endógena do TNF- α , mostrando bons resultados em pacientes com doença de Crohn. Por outro lado, o infliximabe pode ocasionar alguns efeitos colaterais, por exemplo, dor de cabeça, dor abdominal, náusea, anemia, desenvolvimento de anticorpos, infecção, infecção respiratória superior, sinusite, tosse, faringite (PAPAMICHAEL et al., 2019; YESHI et al., 2020).

Outro fármaco também aprovado para o tratamento de doença de Crohn é a azatioprina, um agente pertencente a classe dos imunossupressores. Ela age por produz o nucleotídeo 6-tioguanina (6-TGn) que inibe a proliferação de linfócitos. Acredita-se também que o 6-TGn desempenhe um papel na sinalização da apoptose dos linfócitos, inibindo a ativação de Rac1 nas células T. Porém, é responsável por causar alguns efeitos colaterais, como, náuseas, vômitos, leucopenia e aumento da suscetibilidade a infecções (DUBINSKY, 2004; YESHI et al., 2020).

Outro exemplo de fármaco que também pode ser usado no tratamento das DIIs é a mesalazina, um fármaco pertencente a classe dos derivados do ácido 5-aminossalicílico. A mesalazina age por inibir a via NF-K β e promover a apoptose de células epiteliais intestinais. Porém, pode ocasionar tonturas, rinite, sinusite, nasofaringite, dor nas costas, dor abdominal, erupção cutânea, eructação, prisão de ventre, como efeitos colaterais (IACUCCI et al., 2010; YESHI et al., 2020; BERGMAN; PARKES, 2006).

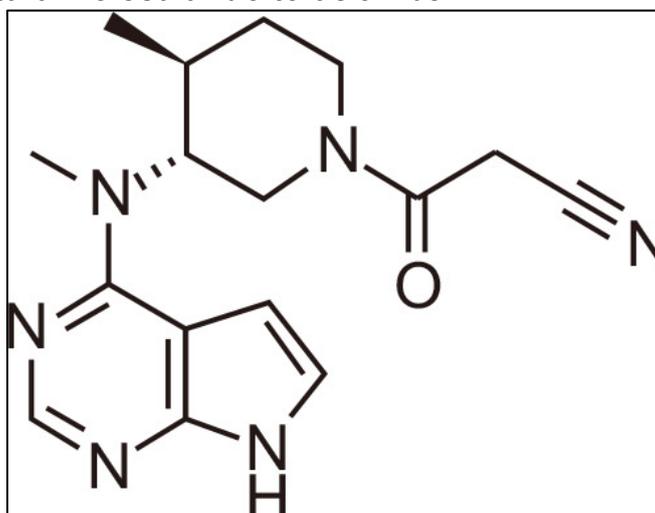
Mais recentemente, surgiram para utilização de tratamento da doença de Crohn o vedolizumabe e o ustequinumabe. O primeiro age antagonizando integrina e inibindo a integrina $\alpha 4\beta 7$, específica do intestino. Já o ustequinumabe, tem como mecanismo de ação a ligação e interferência com as citocinas pró-inflamatórias IL-12 e IL-23. Além disso, esse fármaco também interfere na expressão da proteína quimiotática 1 de monócitos (MCP-1), TNF- α , proteína 10 induzível por interferon e IL-8. Porém, o uso desses fármacos também tem sido associado a vários efeitos colaterais, como, infecções no trato respiratório superior, faringite, cefaleia, dentre outros (CHANDEL et al., 2015; SCRIBANO, 2018; YESHI et al., 2020; WEAVER et al., 2019; KOTZE et al., 2018).

2.9 Tofacitinibe

O desenvolvimento de novas moléculas com potencial para atingir uma gama de alvos de citocinas, como a via JAK/STAT, demonstrou ser eficaz nas DIIs (D'AMICO et al., 2018; OLIVERA et al., 2017)

O tofacitinib (Figura 8) é um inibidor de JAK de primeira classe com eficácia demonstrada no tratamento de artrite reumatóide e artrite psoriática e mais recente, também está licenciado para o tratamento de colite ulcerativa (LIU et al., 2022).

Figura 8: Estrutura molecular do tofacitinibe.

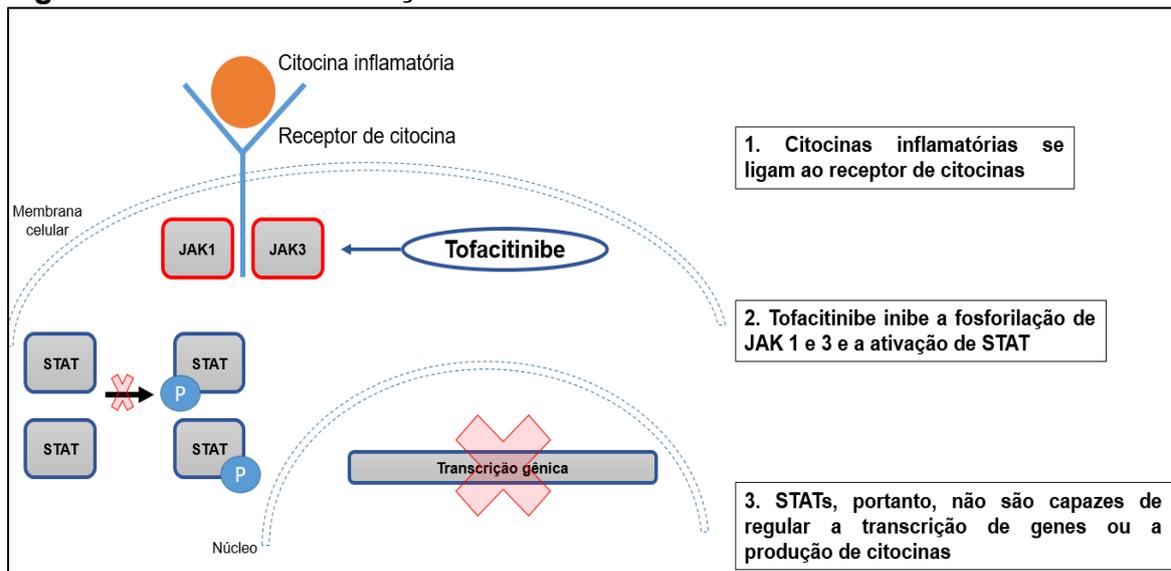


Fonte: BAE et al., 2022.

Esse fármaco difere dos biológicos convencionais por ser uma pequena molécula sintética direcionada oralmente e operar em um nível intracelular inibindo JAK de forma reversível e competitiva (HODGE et al., 2016).

O tofacitinibe é o primeiro inibidor competitivo reversível de JAK da classe, inibindo seletivamente JAK1 e JAK 3 (Figura 9). Sua estrutura imita a do trifosfato de adenosina (ATP) sem o grupo trifosfato associado. Isso evita a fosforilação das proteínas JAK, o que impede o desencadeamento da via STAT e a sinalização a jusante das citocinas de cadeia γ IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 e IL-21 e a síntese de proteínas pró-inflamatórias que estão implicadas na inflamação da mucosa (HODGE et al., 2016).

Figura 9: Mecanismo de ação do tofacitinibe.



Fonte: Adaptado de Yeshi e colaboradores, 2020.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito do Tofacitinibe, um inibidor da via JAK, sobre a inflamação e a integridade da mucosa cólica no modelo de colite induzida por TNBS em ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito anti-inflamatório do Tofacitinibe através do peso úmido do cólon, da avaliação dos escores macroscópicos de lesão, da avaliação dos escores microscópicos de lesão, da concentração de MPO e da produção de citocinas IL-6 e IL-1 β de ratos com colite induzida por TNBS;

- Avaliar o efeito do Tofacitinibe sobre os critérios de integridade da mucosa cólica através da RET basal, da queda da RET, da permeabilidade à fluoresceína, da expressão de RNA de proteínas de junção (ZO-1, Ocludina e Claudina-2) através da técnica de PCR e a expressão proteica de proteínas de junção (Tricellulin, Claudina-2 e claudina-15) pela técnica de Western Blot em ratos com colite induzida por TNBS.

4 METODOLOGIA

4.1 Local e período

Os experimentos foram realizados no período de agosto de 2019 a maio de 2023. Grande parte do estudo foi desenvolvido no Laboratório de Estudos da Fisiofarmacologia Gastrointestinal da Universidade Federal do Ceará (LEFFAG-UFC). Além dele, outros experimentos, como dosagem de citocinas e técnica de PCR foram desenvolvidas no Laboratório de Toxinologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (LTM-UFC) e as revelações das membranas de Western Blot foram realizadas no Laboratório Multiusuário do PPGCF-UFC.

4.2 Animais

Para este estudo foram utilizados ratos heterogênicos Wistar, machos, pesando 180 - 200 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas plásticas de polipropileno com maravalha e sob condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura (equivalente a $22 \pm 2^\circ \text{C}$). As caixas foram alocadas em estantes ventiladas e foram fornecidos, aos animais, água e alimentação *ad libitum*.

4.3 Aspectos éticos

Todos os tratamentos e procedimentos cirúrgicos realizados estavam de acordo com o “Guia de cuidados em uso de animais de laboratório” com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC), com protocolo número 4082010222 (Anexo 1).

4.4 Grupos experimentais

- Grupo SHAM: animais falsamente induzidos.
- Grupo COLITE: animais induzidos à colite.
- Grupo DEXAMETASONA (1 mg/Kg/BID): animais induzidos à colite e tratados com Dexametasona.
- Grupo TOFACITINIBE (15 mg/Kg/BID): animais induzidos à colite e tratados com Tofacitinibe.

4.5 Indução da colite por TNBS

Inicialmente, os animais passaram por um processo de preparação do cólon, com a realização de enema (10 ml de solução salina 0,9% via retal/animal) antes da indução da colite. Para a indução da colite os animais foram previamente anestesiados com cetamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), posicionados em decúbito lateral esquerdo e, em seguida, foi realizada a administração de trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) (20 mg) diluído em etanol 50% em um volume total de 0,8 ml por animal (MORRIS et al., 1989). O grupo controle recebeu apenas solução salina 0,9% em um volume de 0,8 ml. Foi introduzido, por via retal, um cateter de polietileno nº 6 até 8 cm da margem anal para a administração das soluções e cada animal permaneceu suspenso pela cauda por 2 minutos para evitar o retorno do conteúdo administrado (Motavallian-Naeini et al., 2012).

Estes animais foram pré-tratados com salina ou Dexametasona (Aché®, 1mg/Kg) ou Tofacitinibe (Xeljanz®, Pfizer, 15 mg/kg) (LEE et al., 2021) diluído em salina e tween 20 [0,025%] (IGLESIAS et al., 2021), 30 min antes da indução da colite e diariamente a cada 12 horas. O grupo colite também foi tratado com tween 20 [0,025%] para anular quaisquer dúvidas que o uso dessa solução pudesse interferir no grupo tratado com tofacitinibe. Após 7 dias da indução da colite foram avaliados os seguintes parâmetros: edema (peso úmido), escores macroscópicos lesão cólica, escores microscópicos, e infiltração de neutrófilos (atividade de MPO), mensuração de citocinas e alterações na integridade mucosa colônica (Resistência epitelial e permeabilidade à fluoresceína), além de análise de PCR e Western Blotting para junções estreitas.

4.6 Métodos para avaliação da inflamação

4.6.1 Avaliação do peso úmido dos cólons de animais

Os animais foram eutanasiados pela utilização de uma dose letal de Cetamina (240 mg/kg) combinada com Xilazina (30 mg/kg) (GUAZELLI et al., 2013). Em seguida, foi realizada uma incisão mediana com abertura na cavidade peritoneal. Após a identificação do cólon dos animais, foi isolada uma extensão de 5 cm dele. As peças foram então abertas longitudinalmente, lavadas com solução fisiológica e realizadas as pesagens. Os resultados foram expressos pela unidade (mg/cm).

4.6.2 Avaliação dos escores macroscópicos de lesão

Após a análise de peso úmido, os cólons dos animais foram distendidos sobre uma superfície plana para a avaliação dos escores macroscópicos (correspondente a soma dos valores individuais dos escores) seguindo a técnica descrita por Morris (1989), conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1: Avaliação dos escores macroscópicos das lesões intestinais de animais com colite induzida por TNBS.

Critério	Escore
Aparência normal	0
Hiperemia local sem úlceras	1
Ulceração sem hiperemia ou espessamento da parede colônica	2
Ulceração com inflamação em um sítio	3
Ulceração / inflamação em dois ou mais sítios	4
Lesão principal estendendo-se por 1 cm ao longo do cólon	5
Área de lesão > 2 cm ao longo do comprimento do cólon. A quantificação é aumentada em 1 para cada centímetro adicional.	6 – 10

Fonte: Adaptado de Morris, 1989.

4.6.3 Avaliação dos escores microscópicos de lesão

Para a avaliação dos escores microscópicos, foram confeccionadas lâminas histológicas a partir de fragmentos de tecidos cólicos dos animais. Inicialmente as amostras passaram pela inclusão, que consiste em: uma primeira etapa, que corresponde à desidratação (quando ocorre a retirada da água dos tecidos e a sua substituição por álcool através da imersão em álcoois que possuem concentrações crescentes), uma segunda etapa, a diafanização, com a substituição do álcool, agora presente nos tecidos, por xilol, e, uma última etapa, a impregnação, que consiste em substituição do xilol por parafina fundida a 80° em pequenos blocos.

A etapa da microtomia consiste, basicamente, em utilizar um micrótomo para obter cortes sucessivos, delgados e uniformes, a partir dos blocos de parafina com as peças incluídas. Este aparelho é formado por uma lâmina de aço, afiada, e um braço ao qual se prende o bloco e que se desloca verticalmente.

As fitas obtidas a partir do micrótomo foram transferidas para um banho-maria, com o auxílio de uma pinça, para serem distendidas. A água do banho-maria estava a 53°C. Nesta etapa, foram retiradas as dobras e evitadas as bolhas abaixo da fita. Após a distensão, os cortes foram separados individualmente, utilizando-se lâminas de vidro previamente limpas com detergente e álcool 70% e previamente secas. Antes da utilização das lâminas, estas foram revestidas com uma fina camada de albumina para facilitar a adesão da peça. As lâminas com os cortes aderidos foram separadas para secagem por 24 horas.

A coloração consiste em uma etapa muito importante para a visualização das estruturas do tecido. Normalmente são utilizados corantes hidrossolúveis, sendo necessária, deste modo, a remoção da parafina da peça que foi preparada nas etapas descritas anteriormente e que permanece na lâmina de vidro. Os corantes utilizados nos procedimentos histológicos foram a Hematoxilina e a Eosina (HE).

A montagem final da lâmina consistiu em depositar uma gota de resina líquida sobre o corte que estava aderido à lâmina de vidro e cobri-lo com uma lamínula. A resina depois de seca garantiu uma lâmina permanente que poderá

durar anos. Após 24 horas da montagem das lâminas, as mesmas foram levadas ao microscópio para análises e atribuições de escores conforme a Tabela 2, sendo analisada toda a lâmina e os resultados expressos como mediana, além do mínimo valor encontrado e o máximo valor encontrado por critério, entre parênteses. Estas análises foram realizadas por um patologista sem o conhecimento prévio dos grupos experimentais (Soares, P.M.G.).

Tabela 2: Escores microscópicos para avaliação de fragmentos de tecido intestinal de animais com colite induzida por TNBS em ratos.

Critério	Escore
Perda da arquitetura da mucosa	0 – 3
Infiltração celular	0 – 3
Espessamento da muscular	0 – 3
Formação de abscesso em cripta	0 – 1
Ausência de células caliciformes	0 – 1

Fonte: Appleyard e Wallace, 1995

4.6.4 Ensaio de Mieloperoxidase (MPO)

Amostras de cólon foram coletadas, pesadas e maceradas em 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, Sigma-Aldrich®, EUA), pH 6,0, na proporção de 500 µL de solução para 50 mg de tecido. Posteriormente, o macerado foi centrifugado (5000 rpm, 7 min, 4°C). Em seguida, 10 µL do sobrenadante foram colocados em placa de 96 poços em duplicata. Em cada poço, adicionaram-se 200 µL de solução contendo O-dianisidina (Sigma-Aldrich®, EUA), 5 mg diluída em 3 mL tampão fosfato. A essa solução foram ainda adicionados 15 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Sigma-Aldrich®, EUA) a 1%.

Determinou-se a absorbância em leitor de absorbância (BMG Labtech®, Espanha) no comprimento de onda de 450 nm. Foi realizada leitura no tempo zero e 1 minuto. Os resultados foram expressos em unidades de MPO/mg de tecido. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade capaz de converter 1 µmol de peróxido de hidrogênio a água em 1 min a 22°C (BRADLEY et al., 1982).

4.6.5 Mensuração de Citocinas (IL-6 e IL-1 β)

Foram retirados os fragmentos do cólon dos animais para dosagem de citocinas. Estes fragmentos foram adicionados em um tampão inibidor de protease (500 μ L de tampão para cada 100 mg de tecido) e depois processados em um homogeneizador de tecido e centrifugado a 3000 rpm a 4° C por 10 minutos.

Foi utilizado o Kit MILLIPLEX[®] Cytokine/Chemokine 4-plex (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) com anticorpos de detecção de IL-6 e IL-1 β para ratos, referentes aos grupos Sham, Colite, Tofacitinibe e Dexametasona.

Resumidamente, as amostras de homogenato de tecido cólico dos animais foram diluídas 1:2 em tampão de ensaio e, após esse procedimento, foi adicionado 25 μ L de soluções padrões, soluções de controles de qualidade e amostras em duplicata à placa. Este procedimento foi seguido pela adição de 25 μ L das esferas magnéticas.

A placa foi selada, coberta com papel laminado e incubado durante a noite em um agitador de placas a 4°C. A placa foi lavada três vezes e 25 μ L de anticorpo de detecção foi adicionado a cada poço.

Após incubar a placa em temperatura ambiente por 1 h, 25 μ L de estreptavidina-ficoeritrina foi adicionado por poço. A placa foi selada, coberta e incubada por mais 30 min em temperatura ambiente.

Após esse processo, a placa passou por uma série final de lavagens antes da adição de 150 μ L de fluido de acionamento. As concentrações dos marcadores foram medidas no instrumento Luminex[®] MAGPIX[®] com o software xPONENT[®] (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA) (RICHENS et al., 2010).

4.7 Métodos para avaliação da integridade da mucosa cólica

4.7.1 Protocolo executado na câmara de Üssing

4.7.1.1 Montagem do tecido na câmara

Após a abertura longitudinal do cólon dos animais, o mesmo foi distendido em uma placa petri contendo solução de Krebs (composta por 145 mM de NaCl, 0,4 mM de KH₂PO₄, 1,6 mM de K₂HPO₄, 5 mM de glicose, 1 mM

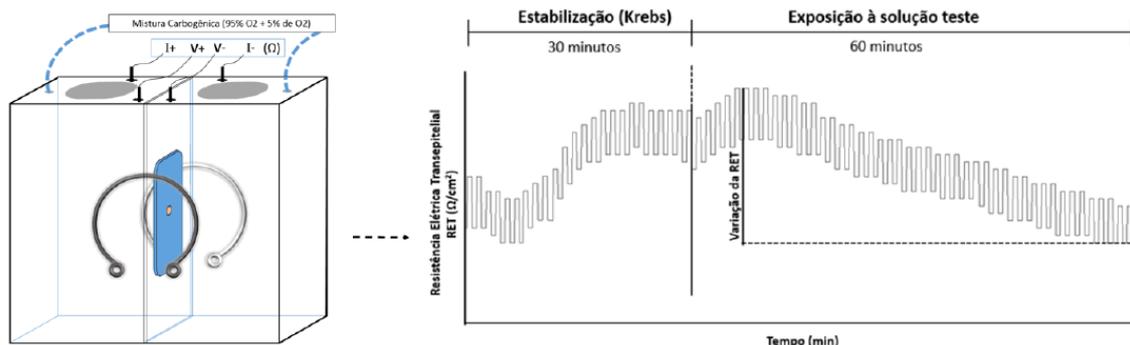
de $MgCl_2$ e 1,2 mM de $CaCl_2$, pH 7,4) e, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, foi realizada a dissecação do tecido, sendo retirado a camada muscular. Um fragmento da mucosa cólica dissecada foi posicionado na câmara de Üssing (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Alemanha), entre duas semicâmaras separadas por um adaptador com uma área exposta de $0,017\text{cm}^2$. Foi então colocado Krebs (3,5 ml/semicâmara), sendo este mantido aerado com uma mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) e com uma temperatura constante de 37°C .

4.7.1.2 Avaliação da Resistência Elétrica Transepitelial (RET)

A correção da resistência elétrica do meio e do circuito foi realizada inicialmente e acompanhada permanentemente por meio de eletrodos Ag/AgCl. Em seguida, foi realizada a montagem do tecido na câmara de Üssing, conforme descrito anteriormente. A RET basal foi calculada de acordo com a lei de Ohm, a partir das deflexões de voltagem induzidas por pulsos bipolares de corrente de $50\ \mu\text{A}$, com duração de 200 ms, a cada 6 s, aplicados por meio de fios de platina. Todos os experimentos foram conduzidos em condições de circuito aberto. Após 30 minutos, o sistema obteve então a estabilidade, sendo possível estabelecer a RET basal, representada por Ω/cm^2 .

Após a estabilização, os tecidos cólicos dissecados continuaram mantidos expostos à solução de Krebs (solução que mimetiza condições fisiológicas). A RET foi então avaliada durante os próximos 60 minutos e representada como Ω/cm^2 (TOBEY et al., 2004). Os resultados foram expressos como percentual (%) de variação da resistência nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos, correspondendo o tempo zero (pico da RET) a 100% (Figura 10).

Figura 10: Representação esquemática do estudo da RET em câmara de Üssing.

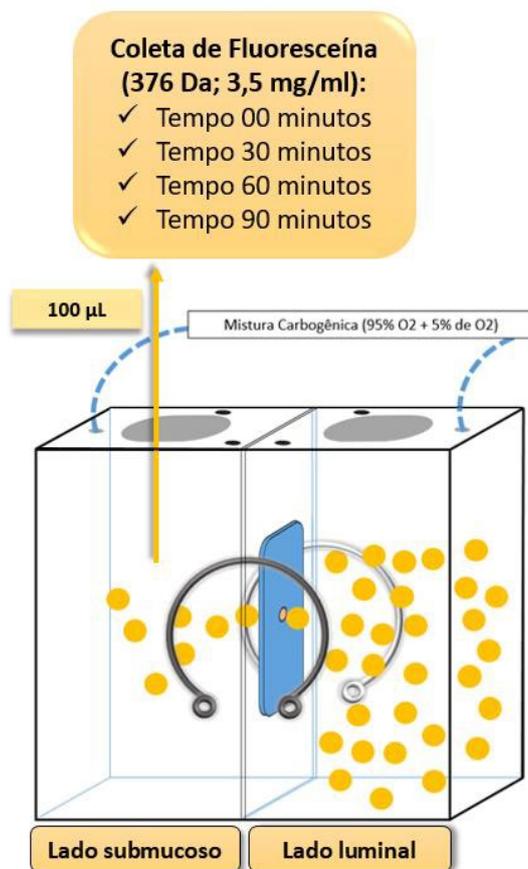


Fonte: Adaptada de Woodland, P. e colaboradores, 2013.

4.7.1.3 Avaliação da permeabilidade à fluoresceína

Após a avaliação da RET, foi analisada a permeabilidade epitelial paracelular. Para este protocolo, os tecidos cólicos foram mantidos nas câmaras de Üssing e a solução do lado luminal foi substituída por uma solução contendo fluoresceína (1 mg/ml, 376 Da, diluído em Krebs pH 7,4), um traçador fluorescente permeável que passa através das camadas da mucosa (FARRÉ et al., 2008). A permeabilidade foi avaliada em intervalos de 30 min, durante 90 min a partir de amostras (100 µl) coletadas do lado não luminal. A quantificação de fluoresceína foi realizada utilizando um leitor de fluorescência (FLUOstar Omega; BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha). Os valores do fluxo de fluoresceína foram expressos em razão de intensidade de fluoresceína a partir de uma curva padrão da reta (Figura 11).

Figura 11: Representação esquemática do estudo da permeabilidade à fluoresceína na câmara de Üssing.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.7.2 Expressão de RNA através da técnica de PCR

O RNA total foi extraído do cólon dos ratos usando o RNeasy Lipid Tissue Mini Kit® (Qiagen, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante e, em seguida, submetido à síntese de cDNA usando o iScript cDNA Synthesis Kit® (Bio-Rad, EUA).

A expressão de mRNA das proteínas de junção (ZO-1, ocludina e claudina-2) foi analisada por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) usando o CFX96 Touch Detection System (Bio-Rad). A tirosina 3-polipeptídeo zeta da proteína de ativação monooxigenase/triptofano 5E-monooxigenase (YWHAZ) serviu como gene de limpeza (SANDOVAL et al., 2014).

Os primers de DNA para todos os genes analisados foram projetados com base nas sequências de mRNA obtidas do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os dados foram obtidos

por meio do software CFX Manager 3.0[®] (Bio-Rad), com base nos valores do ciclo limiar, no qual a fluorescência observada é 10 vezes maior que a fluorescência basal para cada ensaio de qPCR. A expressão do mRNA foi determinada pela aplicação do método matemático 2^{-DDCT} (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.7.3 Expressão proteica através da técnica de Western Blotting

Para avaliar a expressão proteica de tricellulin, claudina-2 e claudina-15, nos segmentos de cólon, foram seguidas as seguintes etapas: extração de proteínas, dosagem de proteínas e Western Blotting. Na extração de proteínas, os segmentos de cólon foram macerados, com auxílio de macerador elétrico, em pequenos tubos contendo tampão RIPA (25 mM TrisHCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (Sigma-Aldrich, EUA, 1µL de inibidor de protease: 100µL de RIPA) submersos em gelo.

Em seguida, as amostras foram vortexadas por 30 segundos, a cada 10 min por 30 min, e centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo. As proteínas foram dosadas pelo método do ácido bicinconínico e foi realizado conforme descrito pelo fabricante (Thermo Scientific, Estados Unidos, EUA). De acordo com este método, as proteínas presentes nas amostras reduzirão o cobre da sua forma cúprica (Cu^{2+}) para a cuprosa (Cu^{1+}). Este se ligará a duas moléculas de ácido bicinconínico, resultando na cor púrpura visualizada no final da reação. Inicialmente, a proteína foi diluída (1 µl de proteína: 20 µl de RIPA) e preparado 75µL de proteína diluída. Em seguida, foi misturado o reagente A (Contém ácido bicinconínico) e B (contém cobre) respectivamente na proporção de 50:1. Posteriormente, foi colocado em duplicata 25 µl de cada amostra diluída e 200 µl da mistura final do reagente A e B em placa de 96 poços.

Posteriormente, a placa foi incubada por 30 min a 37°C em estufa. Enfim, foi efetuada a leitura da reação em leitor de Elisa a 562 nm. Para a curva, foram utilizadas concentrações conhecidas de Albumina sérica bovina (BSA): 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 e 0 µg/mL.

A análise de Western Blotting, foi iniciada com o preparo de 70 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad®, EUA 65,8 mM TrisHCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β-mecaptoetanol (BioRad®, EUA), vortexando por 10 s, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s).

Em seguida, foi realizada a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 v nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 v para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, foi efetuada a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad®, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 v por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol).

Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich®, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20).

Em seguida, foi realizada a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as membranas serão incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos anti-tricellulin, anti-claudina-2 ou anti-claudina-15 diluídos em 1% de BSA em TBST. Após esta etapa, foram realizadas três lavagens de 10 min cada com TBST.

As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit ou HRP-rabbit anti-goat por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas três vezes, duração de 10 min cada, com TBST. Enfim, foi adicionado o reagente de quimioluminescência (BioRad®, EUA, Clarity western ECL blotting substrate) e as membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ChemiDoc XRS (BioRad®, EUA). A densidade das bandas foi mensurada por meio do software Image Lab (BioRad®, Brasil).

4.8 Análises estatísticas

O teste Shapiro Wilk foi realizado para verificar a normalidade das amostras. Para os dados paramétricos foram utilizados os testes estatísticos de análise de variância (ANOVA) seguido de pós teste Bonferroni (para dados paramétricos) e teste de Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Dunn's (para dados não-paramétricos). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

5 RESULTADOS

5.1 Tofacitinibe reduz parâmetros inflamatórios induzidos na colite por TNBS

5.1.1 Tofacitinibe reduz peso úmido dos cólons em modelo de colite induzida por TNBS em ratos.

Foi observado que o grupo Colite teve maior ($p < 0,05$) peso úmido ($0,4590 \pm 0,08$ mg/cm de cólon) quando comparado ao grupo Sham ($0,1327 \pm 0,006$ mg/cm de cólon). Em contrapartida, foi observado que tanto o grupo tratado com Tofacitinibe ($0,1578 \pm 0,01$ mg/cm de cólon), quanto o tratado com Dexametasona ($0,1805 \pm 0,03$ mg/cm de cólon), apresentaram menor ($p < 0,05$) peso úmido quando comparados ao grupo Colite (Gráfico 1).

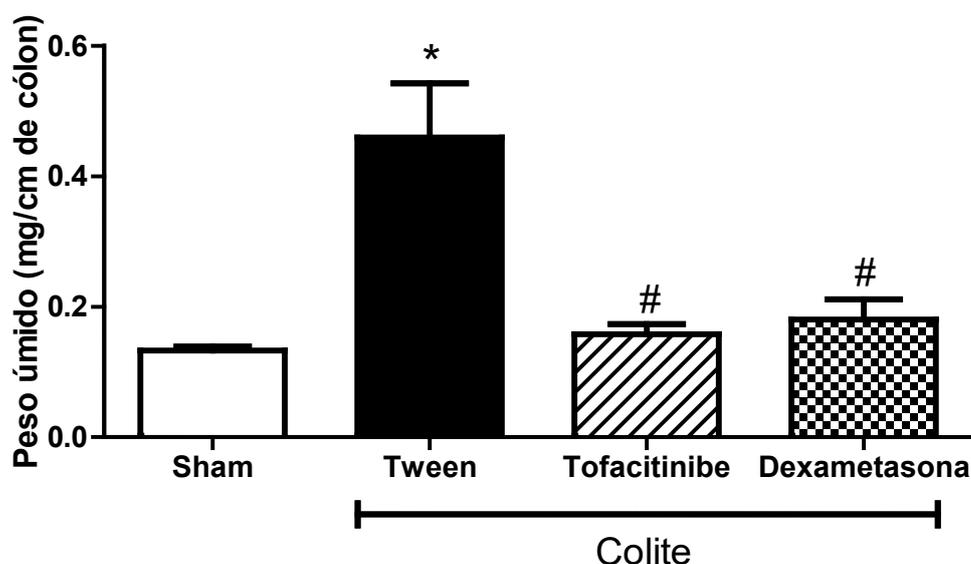
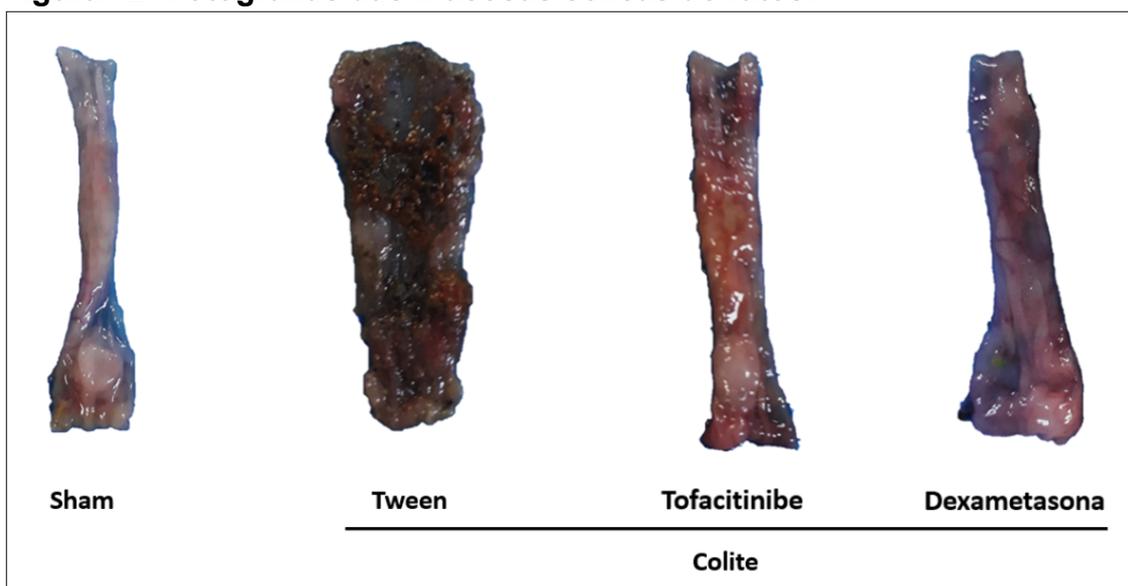


Gráfico 1: Peso úmido dos cólons de ratos em modelo de colite induzida por TNBS. Comparação dos pesos úmidos entre os grupos Sham, Colite, Colite + Tofacitinibe e Colite + Dexametasona. Os valores são expressos como média \pm EPM. $n = 7-9$ por grupo. * $p < 0,05$ vs. Sham e # $p < 0,05$ vs. Colite. (Anova seguido de pós-teste de Bonferroni).

5.1.2 Tofacitinibe previne danos macroscópicos na mucosa cólica em modelo de colite induzida por TNBS em ratos.

A avaliação macroscópica de lesão das mucosas cólicas do grupo Colite ($17,11 \pm 0,8$ escores macroscópicos de lesão) teve aumento significativo ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo Sham ($0,43 \pm 0,2$ escores macroscópicos de lesão), apresentando extensas áreas de necrose, além de hiperemia e ulceração (Figura 12). Por outro lado, ao serem comparados os grupos Tofacitinibe ($8,43 \pm 1,1$ escores macroscópicos de lesão) e Dexametasona ($6,12 \pm 0,1$ escores macroscópicos de lesão) ao grupo Colite ($17,11 \pm 0,8$ escores macroscópicos de lesão), foi possível observar diminuição significativa ($P < 0,05$) dos escores macroscópicos de lesão cólica (Gráfico 2).

Figura 12: Fotografias das mucosas cólicas de ratos.



Fonte: Próprio autor.

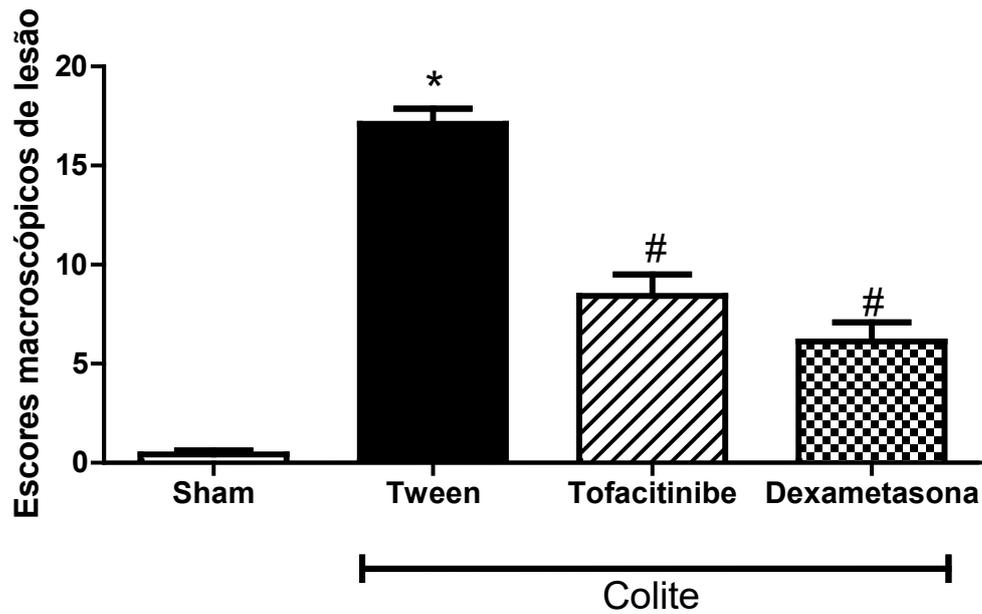


Gráfico 2: Escores macroscópicos de lesão da mucosa cólica de ratos em modelo de colite induzida por TNBS. Comparação dos escores macroscópicos de lesão entre os grupos Sham, Colite, Colite + Tofacitinibe e Colite + Dexametasona. Os valores são expressos como média \pm EPM. $n = 7-9$ por grupo. * vs. Sham e # vs. Colite. $P < 0,05$ (Anova seguido de pós-teste de Bonferroni).

5.1.3 Tofacitinibe atenua danos microscópicos na mucosa cólica em modelo de colite induzida por TNBS em ratos.

Como mostrado na Figura 13A e na Tabela 3, nenhum dano histológico foi observado no grupo Sham. O grupo Colite, por sua vez, apresentou perda da arquitetura da mucosa, infiltração celular, espessamento da muscular e diminuição do número de células caliciformes (Figura 13B, Tabela 3). Os cortes histológicos obtidos nos grupos tratados com Tofacitinibe ou Dexametasona (Figura 13C, D) mostraram redução da inflamação, diminuição de infiltrado celular e do espessamento da muscular, além da redução da degradação de células caliciformes em relação ao grupo Colite (Tabela 3).

Figura 13: Pranchas histológicas da mucosa cólica de ratos em modelo de colite induzida por TNBS.

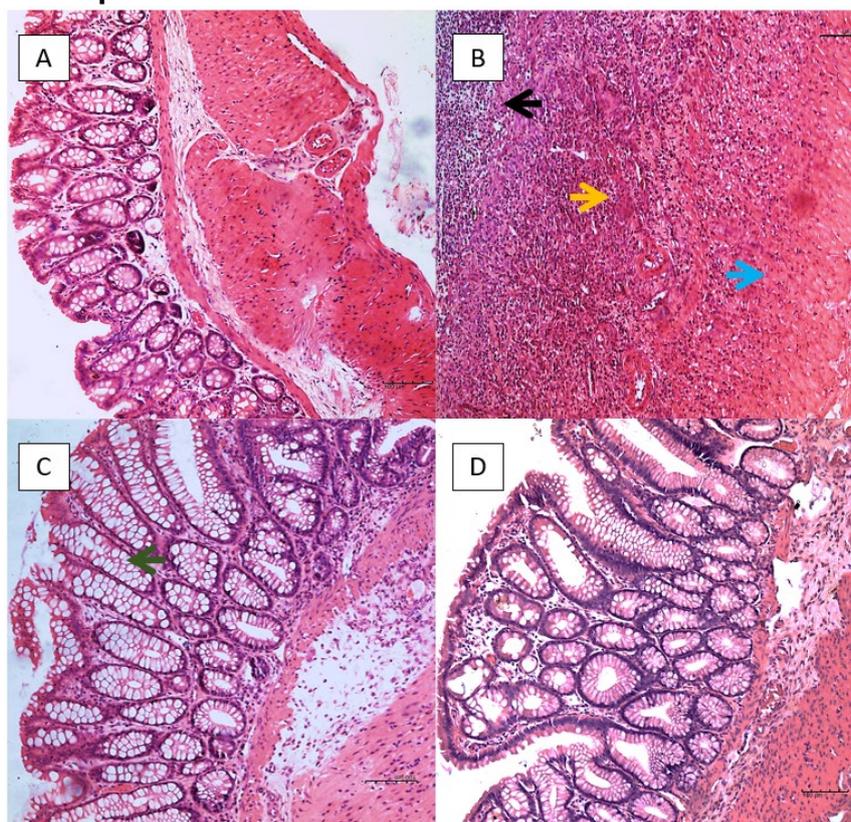


Imagem representativa de tecido cólico em corte histológico, corado com HE. Micrografia ($\times 100$, escala de $100 \mu\text{m}$) representando (A): Grupo Sham; (B): Grupo Colite; (C): Grupo Colite + Dexametasona; (D): Grupo Colite + Tofacitinibe. Seta preta: Perda da arquitetura da mucosa; Seta amarela: Infiltração celular; Seta Azul: Espessamento da muscular; Seta verde: células caliciformes.

Tabela 3: Escores microscópicos de lesão em modelo de colite por TNBS em ratos.

Grupos experimentais	Perda da arquitetura da mucosa (0 – 3)	Infiltração celular (0 – 3)	Espessamento da muscular (0 – 3)	Formação de abscesso em cripta (0 – 1)	Ausência de células caliciformes (0 – 1)
Sham	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0)
Colite	3 (3-3)*	3 (3-3)*	3 (2-3)*	1 (1-1)*	1 (0-1)*
Tofacitinibe	0,5 (0-1)#	1 (1-2)#	1 (0-2)#	0,5 (0-1)	0 (0-0)#
Dexametasona	0 (0-1)#	1 (0-1)#	0 (0-1)#	0 (0-0)#	0 (0-0)#

Escores histopatológicos de lesão em ratos com ou sem colite induzida por TNBS. Sham, Colite, Colite + Tofacitinibe e Colite + Dexametasona. Resultados expressos como mediana com mínimo e máximo representado em parênteses. n = 7 – 9 por grupo. *p<0,05 vs. Sham e #p<0,05 vs. Colite. (Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunns).

5.1.4 Tofacitinibe reduz concentração de MPO dos cólons em modelo de colite induzida por TNBS em ratos.

O grupo Colite ($218,1 \pm 31,36$ UMPO/mg) teve maiores ($p < 0,05$) níveis de MPO quando comparado ao grupo Sham ($20,74 \pm 3,9$ UMPO/mg). Porém, ao serem avaliados os grupos de animais tratados, tanto o grupo Tofacitinibe ($144,0 \pm 32,87$ UMPO/mg), quanto o grupo Dexametasona ($6,48 \pm 1,30$ UMPO/mg) (Gráfico 3).

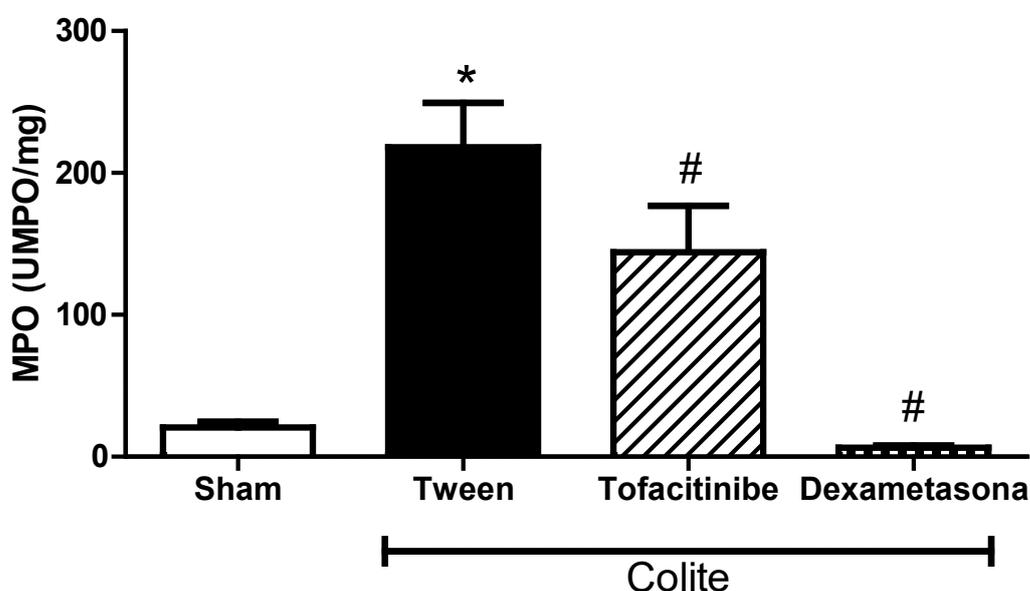


Gráfico 3: Teste de MPO dos cólons de ratos em modelo de colite induzida por TNBS. Comparação das concentrações de MPO entre os grupos Sham, Colite, Colite + Tofacitinibe e Colite + Dexametasona. Os valores são expressos como média \pm EPM. $n = 7-9$ por grupo. * $p < 0,05$ vs. Sham e # $p < 0,05$ vs. Colite. (Anova seguido de pós-teste de Bonferroni).

5.1.5 Tofacitinibe reduz níveis de citocinas em modelo de colite por TNBS em ratos.

Ao avaliarmos os níveis de citocina IL-6 (Gráfico 4A), conseguimos perceber que os animais do grupo Colite possuem maior expressão ($p < 0,05$) dessa proteína quando comparados aos animais do grupo Sham ($48,67 \pm 19,66$ vs. $3,07 \pm 0,6$ pg/mg de proteínas, respectivamente). Além disso, o grupo Colite também apresentou maiores níveis ($p < 0,05$) de IL-1 β (Gráfico 4B) quando comparado ao grupo Sham ($500,6 \pm 89,13$ vs. $19,62 \pm 1,64$ pg/mg de proteínas, respectivamente). Por outro lado, o grupo tratado com Tofacitinibe foi capaz de atenuar ($p < 0,05$) tanto os níveis de IL-6 ($3,53 \pm 1,45$ pg/mg de proteínas) quanto os de IL-1 β ($28,5 \pm 3,9$ pg/mg de proteínas). Da mesma forma, o grupo tratado com Dexametasona também foi capaz de atenuar ($p < 0,05$) os níveis de IL-6 ($6,88 \pm 1,1$ pg/mg de proteínas) e IL-1 β ($58,1 \pm 31,64$ pg/mg de proteínas).

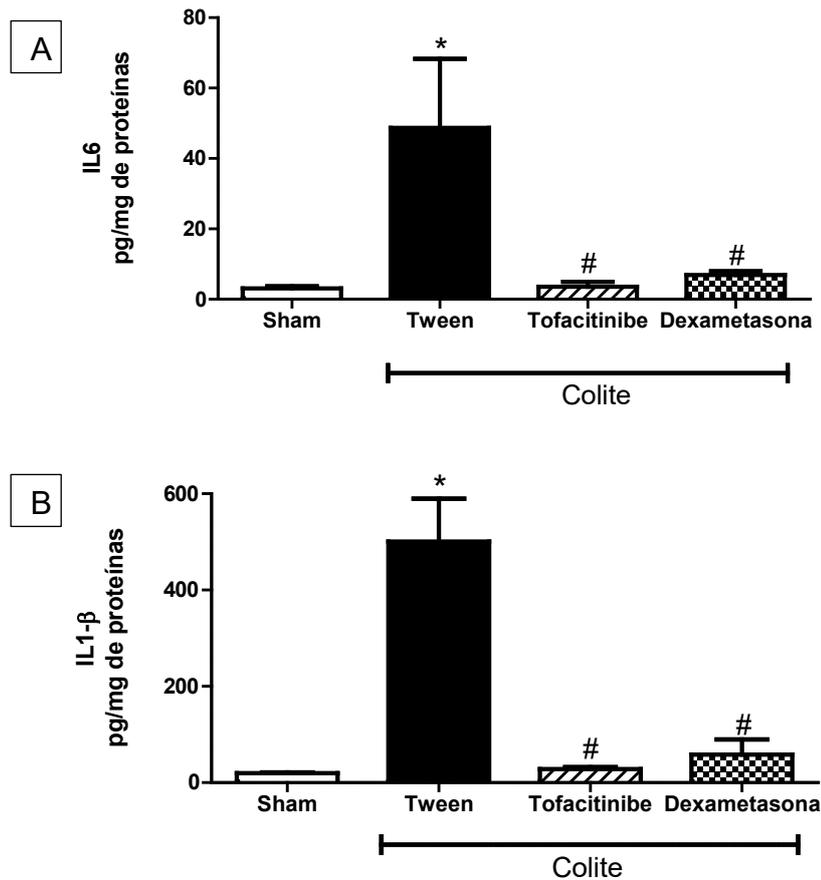


Gráfico 4: Dosagem de citocinas dos cólons de ratos no modelo de colite induzida por TNBS. Comparação dos níveis de citocinas entre os grupos Sham, Colite, Colite + Tofacitinibe e Colite + Dexametasona. Os valores são expressos como média ± EPM. n = 7-9 por grupo. *p<0,05 vs. Sham e #p<0,05 vs. Colite. (Anova seguido de pós-teste de Bonferroni).

5.2 Tofacitinibe preserva a integridade da mucosa cólica de ratos no modelo de colite induzida por TNBS.

5.2.1 Tofacitinibe preserva a RET basal no modelo de colite induzida por TNBS em ratos.

Foi possível observar que o grupo Colite teve menor RET basal ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo Sham ($33,25 \pm 2,7$ vs. $45,0 \pm 1,2 \Omega \times \text{cm}^2$, respectivamente). Por outro lado, o grupo Tofacitinibe foi capaz de prevenir ($p < 0,05$) a redução da RET basal ($62,3 \pm 8,14 \Omega \times \text{cm}^2$), algo que não foi observado no grupo Dexametasona ($39,13 \pm 3,17 \Omega \times \text{cm}^2$) (Gráfico 5).

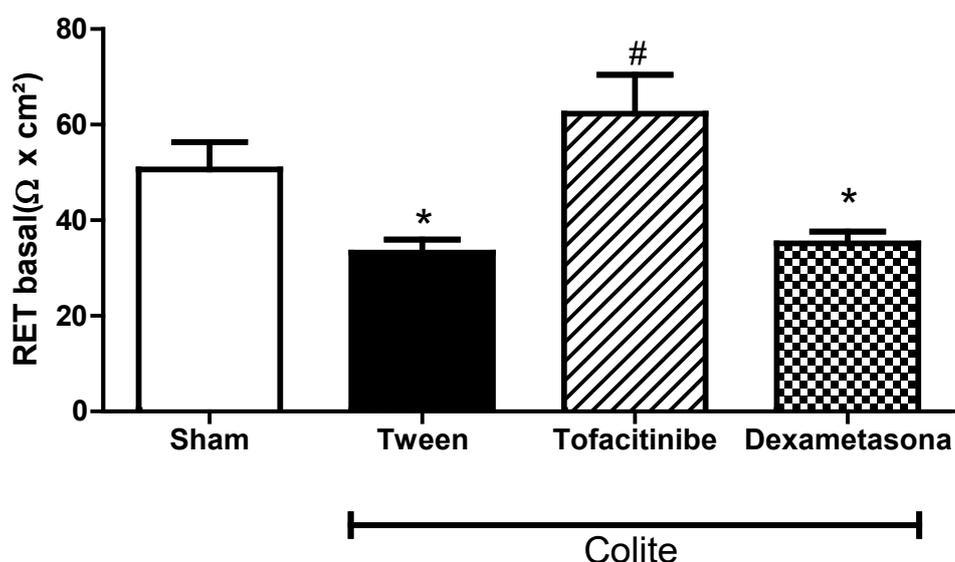


Gráfico 5: RET basal dos cólons de ratos no modelo de colite induzida por TNBS. Comparação RET basal entre os grupos Sham, Colite, Colite + Tofacitinibe e Colite + Dexametasona. Os valores são expressos como média \pm EPM. $n = 7-9$ por grupo. * $p < 0,05$ vs. Sham e # $p < 0,05$ vs. Colite. (Anova seguido de pós-teste de Bonferroni).

5.2.2 Tofacitinibe reduz a queda da RET no modelo de colite induzida por TNBS em ratos.

No Gráfico 6A, podemos observar que a mucosa cólica dos animais do grupo Colite demonstrou queda da RET, sendo esta significativa ($p < 0,05$) no tempo 60 minutos (Gráfico 6B), quando comparada com a RET do grupo Sham ($80,9 \pm 2,35$ vs. $95,07 \pm 2,36$ %, respectivamente). Em contrapartida, o grupo Tofacitinibe foi capaz de reduzir a queda da RET ($p < 0,05$) em comparação com o grupo Colite ($92,6 \pm 2,8$ vs. $80,9 \pm 2,35$ %, respectivamente).

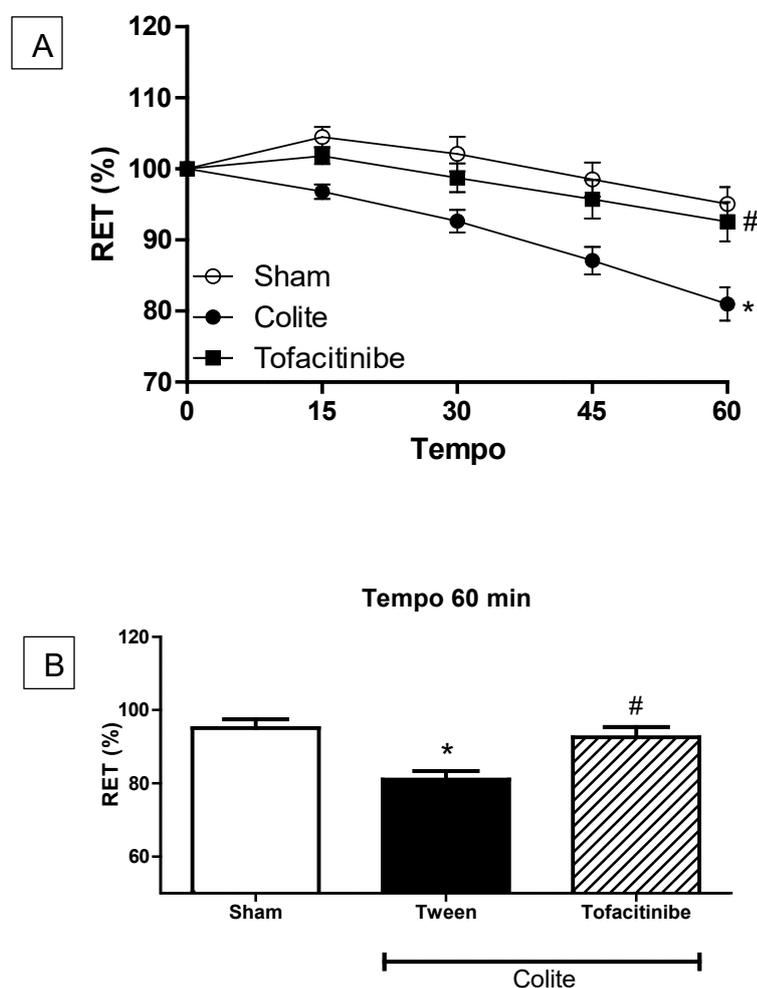


Gráfico 6: Avaliação da queda da RET, no período de 60 minutos, no modelo de colite induzida por TNBS em ratos. Comparação da queda da RET, durante 60 minutos (A) e representação do tempo 60 minutos (B) entre os grupos Sham, Colite e Colite + Tofacitinibe. Os valores são expressos como média \pm EPM. $n = 7-9$ por grupo. * $p < 0,05$ vs. Sham e # $p < 0,05$ vs. Colite. (Anova seguido de pós-teste de Bonferroni).

5.2.3 Tofacitinibe reduz a permeabilidade à fluoresceína no modelo de colite induzida por TNBS em ratos.

Ao ser avaliada a permeabilidade à fluoresceína (Gráfico 7A), foi possível observar que após 90 minutos de exposição (Gráfico 7B), o grupo Colite teve maior passagem paracelular ($1889 \pm 701,4 \mu\text{g/mL}$, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo Sham ($364,2 \pm 127,3 \mu\text{g/mL}$). O grupo Tofacitinibe, por sua vez, foi capaz de reduzir ($p < 0,05$) a permeabilidade à Fluoresceína ($132,4 \pm 37,84 \mu\text{g/mL}$).

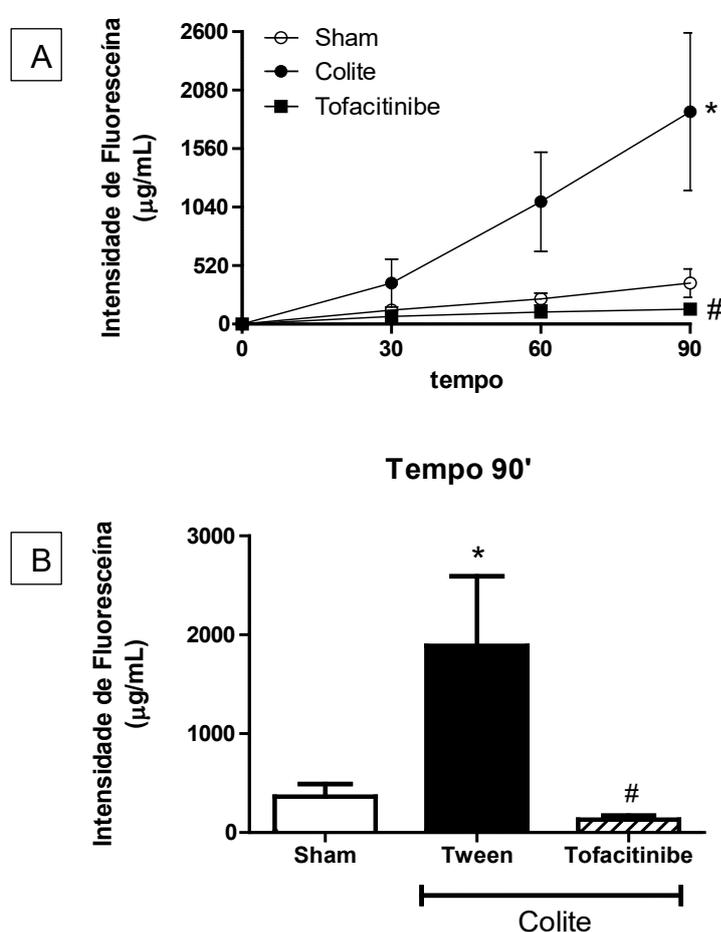


Gráfico 7: Avaliação da permeabilidade à Fluoresceína, no período de 90 minutos, no modelo de colite induzida por TNBS em ratos. Comparação da permeabilidade à Fluoresceína durante 90 minutos (A) e representação do tempo 90 minutos (B), entre os grupos Sham, Colite e Colite + Tofacitinibe. Os valores são expressos como média \pm EPM. $n = 7-9$ por grupo. $*p < 0,05$ vs. Sham e $\#p < 0,05$ vs. Colite. (Anova seguido de pós-teste de Bonferroni).

5.2.4 Avaliação da expressão relativa de RNA de proteínas de junção da mucosa cólica de ratos em modelo de colite por TNBS por meio da técnica de PCR.

Para análise da expressão gênica da Ocludina, é possível observar (Gráfico 8B) que o grupo Colite possui menor expressão quando comparado ao grupo Sham ($0,18 \pm 0,08$ vs. $1,09 \pm 0,16$, respectivamente, $p < 0,05$). Por outro lado, o grupo Tofacitinibe reestabeleceu a expressão relativa de Ocludina ($2 \pm 0,15$, $p < 0,05$).

A expressão relativa de Claudina-2, por sua vez, teve maior valor no grupo Colite quando comparado ao grupo Sham ($3,51 \pm 0,67$ vs. $1,01 \pm 0,13$, respectivamente, $p < 0,05$). Todavia, o grupo Tofacitinibe apresentou redução na expressão de desse gene ao ser comparado ao grupo Colite ($1,45 \pm 0,12$ vs. $3,51 \pm 0,67$, respectivamente, $p < 0,05$) (Gráfico 8C).

Analisando a expressão relativa da Zônula de Oclusão-1 (ZO-1), não foi possível observar diferença estatística entre os grupos (Gráfico 8A).

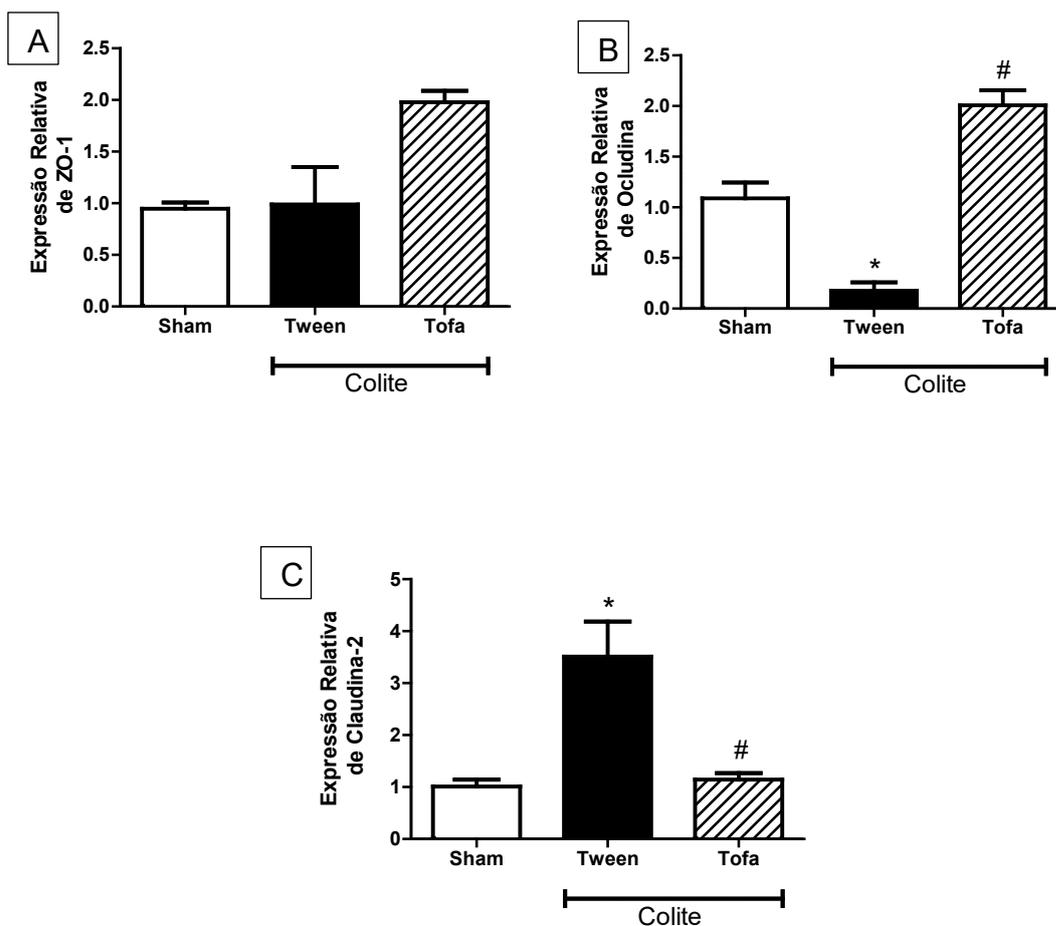


Gráfico 8: Avaliação da expressão relativa de RNA de proteínas de junção da mucosa cólica de ratos em modelo de colite por TNBS por meio da técnica de PCR. Expressão relativa de mRNA de ZO-1 (A), Ocludina (B), e Claudina-2 (C) entre os grupos Sham, Colite e Colite + Tofacitinibe. Os valores são expressos como média ± EPM. n = 7-9 por grupo. *p < 0,05 vs. Sham e #p < 0,05 vs. Colite. (Anova seguido de pós-teste de Bonferroni).

5.2.5 Avaliação de proteínas de junção da mucosa cólica de ratos em modelo de colite por TNBS por meio da técnica de Western Blotting.

Quando avaliamos a expressão de Claudina-2, observamos que o grupo Colite apresentou maior expressão ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo Sham ($376,8 \pm 52,3$ vs. $100 \pm 14,3$ %), enquanto o grupo Tofacitinibe ($227,2 \pm 44,4$ %) foi capaz de recuperar ($p < 0,05$) os valores da expressão de Claudina-2 (Gráfico 9A).

No Gráfico 9B, é possível notar que o grupo Colite apresentou aumento da expressão de Claudina-15 ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo Sham ($174,7 \pm 37,02$ vs. $81,93 \pm 10,9$ %, respectivamente). Por outro lado, quando observamos o grupo Tofacitinibe ($40,53 \pm 10,2$ %), conseguimos notar que a expressão de Claudina-15 diminuiu ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo Colite.

Por último, quando avaliamos a expressão de Tricellulin, conseguimos observar que o grupo colite apresentou menor expressão ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo Sham ($21,31 \pm 3,8$ vs. $109,7 \pm 36,3$ %, respectivamente) e que o grupo tratado com Tofacitinibe foi capaz de recuperar ($p < 0,05$) os valores dessa proteína de junção ($64,37 \pm 15,46$ %) (Gráfico 9C).

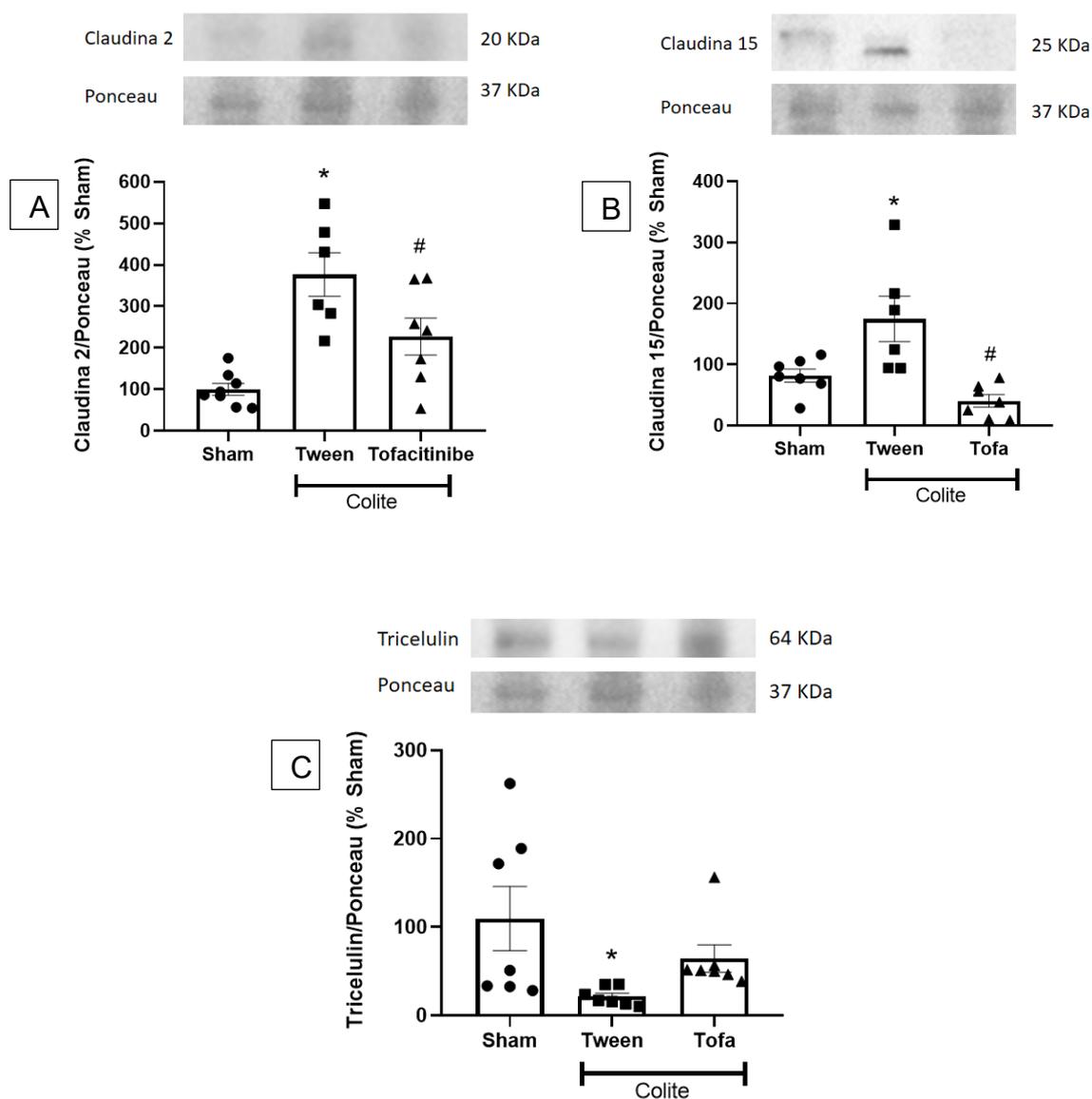


Gráfico 9: Avaliação de proteínas de junção da mucosa cólica de ratos em modelo de colite por TNBS por meio da técnica de Western Blotting. Expressão Claudina-2 (A), Claudina-15 (B) e Tricellulin (C) entre os grupos Sham, Colite e Colite + Tofacitinibe. Os valores são expressos como média \pm EPM. $n = 6-7$ por grupo. * $p < 0,05$ vs. Sham e # $p < 0,05$ vs. Colite. (Anova seguido de pós-teste de Bonferroni).

6 DISCUSSÃO

As DIIs, que compreendem principalmente a colite ulcerativa e a doença de Crohn, são responsáveis por uma série de sinais e sintomas, como dor abdominal, febre, perda de peso, anemia e diarreia, podendo até mesmo se manifestarem de formas mais agravante, ocasionando, por exemplo, estenoses, sendo necessário hospitalização e cirurgia (VERSTOCKT et al.2022; KNOWLES et al., 2018). Além disso, pacientes com DIIs apresentam taxas mais elevadas de estresse, ansiedade e depressão, quando comparados a pessoas saudáveis (WINTJENS et al., 2019; ANANTHAKRISHNAN et al., 2013; BERNSTEIN et al., 2019; NEUENDORF et al., 2016), reduzindo, dessa forma, a qualidade de vida dos seus portadores (KNOWLES et al., 2018).

Ademais, as DIIs tornaram-se globais, afetando países tanto ocidentais quanto orientais, sendo responsáveis por alta prevalência e crescente incidência mundial (SIEW et al., 2017). Pesquisas mais recentes ainda demonstram que com o rápido aumento na incidência de DIIs no Oriente, associado ao envelhecimento da população, é possível esperar que haja um aumento exponencial no número de pacientes com DIIs em todo o mundo (MAK et al., 2020). No Brasil, esses dados são semelhantes. Estudos recentes demonstraram que, apesar de haver estabilização da incidência das DIIs no Brasil, é possível identificar que a prevalência tem rápido crescimento, sendo maiores na região Sul e Sudeste em comparação com as regiões Norte e Nordeste (QUARESMA et al., 2022; COSTA et al., 2022). Apesar de vários estudos terem sido realizados no intuito de elucidar completamente os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença de Crohn, ainda existem lacunas que precisam ser esclarecidas. Além do mais, é necessário encontrar um fármaco que possa minimizar os prejuízos ocasionados por essa doença.

Nesse sentido, decidimos estudar os efeitos de Tofacitinibe, um inibidor da JAK que provou ser um agente terapêutico eficaz no tratamento de várias doenças inflamatórias crônicas, no modelo de colite induzida por TNBS em ratos.

Neste estudo, conseguimos observar que o modelo de colite por TNBS foi capaz de aumentar parâmetros inflamatórios, como o aumento de o peso úmido do cólon, presença de hiperemia e áreas de necrose vistas

macroscopicamente, além de infiltrado neutrofílico e perda da arquitetura da mucosa, conforme observado microscopicamente. Além disso, também vimos que a inflamação é capaz de ocasionar danos estruturais, levando a perda da integridade da mucosa. Entretanto, o tratamento com Tofacitinibe mostrou-se favorável tanto por atenuar os parâmetros inflamatórios observados, quanto por preservar a integridade da mucosa.

Conseguimos observar também a importância do modelo de colite por TNBS e a reprodutibilidade dele com a clínica. É possível identificar que as alterações inflamatórias, tanto de resultados macroscópicos, quanto microscópicos e bioquímicos são bastante semelhantes entre o modelo experimental e a clínica (YESHI et al., 2020). Nesse sentido, a facilidade de manipulação animal e de realização de testes fisiológicos e farmacológicos torna-se mais prático e mais acessível, deixando claro a importância deste modelo animal de colite e a veracidade da sua semelhança com a doença.

Estudos anteriores realizados por nosso grupo, mostraram que a colite induzida por TNBS em ratos desencadeia um processo inflamatório seguido de perda da integridade da mucosa em 7 dias (COSTA et al., 2020). Do mesmo modo, no presente estudo, realizamos a eutanásia dos animais no 7º dia pós-indução da colite por TNBS. Em seguida, coletamos os tecidos cólicos, e conseguimos observar que o cólon dos animais do grupo colite estavam com maior peso úmido quando comparados com os do grupo Sham. Outros estudos também demonstraram resultados semelhantes ao nosso, associando o aumento de peso úmido à presença de edema e infiltrado de células inflamatórias (CARVALHO et al., 2018; MONTEIRO et al., 2021).

Além disso, também observamos em nossa pesquisa que houve alteração nos escores macroscópicos de lesão, sendo possível observar áreas de hiperemia, além de extensas áreas de necrose. Nossos resultados corroboram com os dados descritos por Morris e colaboradores (1989) que também encontraram alterações semelhantes, relacionando esses resultados à associação de etanol e TNBS, mostrando que o álcool é essencial para romper a barreira das células epiteliais intestinais, permitindo que o TNBS penetre na parede intestinal e seja reconhecido como alvo pelo sistema imunológico do hospedeiro, gerando danos na mucosa e conseqüentemente áreas de lesão, resultados também encontrados por Antoniou e colaboradores (2016).

Outro resultado importante que encontramos no nosso estudo foram os danos microscópicos ocasionado no grupo colite quando comparado ao grupo Sham. Esse grupo experimental apresentou perda da arquitetura da mucosa, infiltração celular, espessamento da muscular e diminuição do número de células caliciformes. Resultados semelhantes também foram encontrados anteriormente, tanto por nosso grupo quanto por outros pesquisadores, fatos esses que atestam tanto os danos morfológicos ocasionados pelo modelo, quanto a reprodutibilidade deste (COSTA et al., 2020; MONTEIRO et al., 2021; SZANDRUK-BENDER et al., 2022).

Além desses resultados, a presente pesquisa também demonstrou que o cólon dos animais induzidos à colite por TNBS tiveram maiores níveis de MPO quando comparados ao grupo Sham. De acordo com Rizo-Téllez e colaboradores (2022) esse aumento de MPO está relacionado a uma avaliação indireta dos níveis de infiltrados neutrofílicos, visto que a enzima mieloperoxidase é liberada, em grande maioria, dos grânulos azurófilos dos neutrófilos. Sendo assim, o aumento dessas células imunológicas é um indicativo de inflamação aguda, pois são as primeiras células imunes a serem recrutadas para os locais de infecção e lesão tecidual (LIEW et al., 2019).

Por outro lado, nossos resultados foram capazes de mostrar que o grupo tratado com Tofacitinibe, atenuou esses parâmetros inflamatórios avaliados, reduzindo o peso úmido do cólon, os escores macroscópicos de lesão, os escores microscópicos de lesão e a concentração de MPO quando comparado ao grupo colite.

Similarmente aos resultados anti-inflamatórios referentes ao uso de Tofacitinibe, o uso de Dexametasona mostrou-se favorável neste quesito, reduzindo os mesmos parâmetros anteriormente citados. Da mesma maneira, nossos resultados concordam com outros resultados encontrados na literatura (MONTEIRO et al., 2021; DUTRA et al., 2021).

Ainda avaliando os dados inflamatórios, ao avaliarmos os resultados referentes aos níveis de citocinas, conseguimos observar que o grupo colite aumentou os níveis de IL-6. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica envolvida na regulação imune e na inflamação. Altas quantidades de IL-6 são produzidas no intestino de pacientes com DII e em modelos experimentais de colite principalmente por macrófagos e células T (ATREYA et al., 2010; KAI et al.,

2005). A IL-6 estimula a produção de citocinas inflamatórias visando vários tipos de células e previne a apoptose de células T via transdutor de sinal e ativação do ativador da transcrição (STAT)3, contribuindo, dessa forma, para a perpetuação da inflamação intestinal crônica (ATREYA et al., 2010).

Além da IL-6, nossos resultados também mostraram que houve aumento de IL-1 β . Esta citocina pertence à família da IL-1, e está associada a sinais pró-inflamatórios no intestino. Resultado semelhante também foi observado por outros pesquisadores (AKHTAR et al., 2019; ZHA et al., 2023). A literatura ainda mostra que a sinalização através da IL-1, que determina a ativação do NF- κ B, é altamente ativa em pacientes com DIIs (CASINI-RAGGI et al., 1995; SCALAVINO et al., 2022).

Entretanto, nossa pesquisa demonstrou que o grupo Tofacitinibe foi capaz de atenuar esses valores, reduzindo os níveis dessas proteínas inflamatórias. Outros estudos também mostram efeitos anti-inflamatórios do Tofacitinibe, estando esses associados ao mecanismo de ação deste fármaco, por agir inibindo especificamente JAK1 e JAK3 (KARAMAN et al., 2008; GHORESCHI et al., 2011). Um exemplo disso foi observado por Gerlach e colaboradores (2020), os quais demonstraram que o Tofacitinibe reduziu especificamente a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células T da lâmina própria na colite ulcerativa, principalmente na doença ativa, afetando acentuadamente seu potencial de retorno ao suprimir a expressão de integrina na superfície das células T. Outro estudo realizado com Tofacitinibe, dessa vez, em pacientes com artrite reumatoide, também observou redução de níveis de proteínas pró-inflamatórias, sendo uma das maiores reduções a de IL-6 (VALLI et al., 2022).

Além do Tofacitinibe, observamos que o grupo Dexametasona também foi capaz de reduzir os níveis de IL-6 e IL-1 β . Tais efeitos podem ser explicados segundo algumas funções pertinentes aos Glicocorticóides, como, a redução da permeabilidade capilar para aliviar o edema inflamatório e a exsudação; a ligação aos receptores de glicocorticóides ativados, reduzindo a geração de fatores pró-inflamatórios pela inibição da atividade do NF- κ B; a redução da geração de leucotrienos e prostaglandinas pelo aumento da síntese de lipocortina e inibição da expressão da ciclooxigenase; a regulação de genes relacionados à inflamação para inibir a produção de tempestade de citocinas; ou

a redução à resposta inflamatória ao diminuir o acúmulo de neutrófilos e macrófagos na área inflamatória (DONG et al., 2023).

A literatura também aborda extensivamente o papel de outras citocinas pró-inflamatórias na doença de Crohn e no modelo de colite induzida por TNBS. Um exemplo é o TNF- α , que desempenha um papel crucial na resposta imune normal. No entanto, uma produção inadequada ou excessiva dessa citocina pode ser prejudicial e levar ao desenvolvimento da doença de Crohn (ADEGBOLA et al., 2018), além de também estar diretamente relacionada com o desenvolvimento da inflamação no modelo de colite induzida por TNBS (LI et al., 2022).

Ao avaliarmos os resultados referentes à integridade da mucosa, conseguimos observar, primeiramente, que a RET basal foi menor no grupo colite em comparação ao grupo Sham. Alguns autores associam que o aumento de citocinas pró-inflamatórias com a consequente ativação da resposta imunológica levam ao aparecimento de DIIs. Ainda afirmam que várias citocinas pró-inflamatórias, dentre elas, IL-1 β e IL-6 contribuem para a patogênese dessas doenças (SCALAVINO et al., 2022). Tanto estudos anteriores realizados por nosso grupo, quanto outros pesquisadores também encontraram resultados semelhantes a nossa pesquisa, mostrando que redução da RET basal pode ocorrer devido a processos inflamatórios envolvendo o aumento de citocinas pró-inflamatórias (COSTA et al., 2020; MONTEIRO et al., 2021; DUTRA et al., 2021).

Não obstante, no presente estudo, nosso grupo conseguiu observar que o Tofacitinibe foi capaz de manter a RET basal, impedindo que ocorresse a sua diminuição. Esse resultado corrobora com os descritos por Sayoc-Becerra e colaboradores (2020), que descreveram que o uso de Tofacitinibe foi capaz de preservar a integridade da mucosa no modelo de cultura de células epiteliais intestinais e colonóides humanas desafiadas com IFN- γ , impedindo, dessa maneira, a redução da RET basal.

O uso de Dexametasona, por sua vez, foi incapaz de impedir a diminuição da RET basal. Estudos anteriores realizados com cultura de células intestinais Caco-2 mostraram que a função de reparação de JEs e de aumento da RET pela Dexametasona só foi possível ser observada após mais de 10 dias de tratamento (ROBINSON et al., 2019). Dessa forma, o tempo de tratamento

instituído em nossa pesquisa pode ser uma explicação plausível para os nossos resultados.

Outro resultado que encontramos em nosso estudo foi a queda da RET da mucosa do cólon de animais induzidos à colite em comparação aos animais do grupo Sham. Esse resultado também foi encontrado anteriormente pelo nosso grupo, estando ele associado ao aumento de inflamação, demonstrando a participação direta de COX-2 neste distúrbio da integridade (COSTA et al., 2020).

Diferentemente desse resultado, o grupo tratado com Tofacitinibe foi capaz de manter os níveis de RET próximos aos do grupo Sham, garantindo, dessa forma, a integridade do epitélio. Esse resultado demonstra que o tratamento com Tofacitinibe é capaz de garantir estabilidade de ligação célula-célula, por preservar estruturas, como proteínas de junção. Spalinger e colaboradores (2021), ao analisarem o efeito do Tofacitinibe em cultura de células intestinais e em modelo de colite por DSS em camundongos, também observaram que o tratamento com esse inibidor da JAK protege a integridade da mucosa intestinal além de prevenir o aumento da suscetibilidade à colite por DSS.

Ainda ao analisarmos os resultados de integridade da mucosa, conseguimos notar que a permeabilidade à fluoresceína no grupo Colite foi maior que a do grupo Sham, ou seja, vimos que há maior permeabilidade paracelular. Nossos resultados concordam com os descritos na literatura, onde mostram que o modelo experimental de colite por TNBS causa aumento da permeabilidade paracelular (MONTEIRO et al., 2021; NIGHOT et al., 2023; OLIVIER et al., 2022). Além disso, esse resultado obtido da nossa pesquisa também está de acordo com estudos anteriores realizados por nosso grupo (COSTA et al., 2020), onde vimos que há maior passagem paracelular de fluoresceína em animais induzidos à colite quando comparados a animais sem colite e que esse aumento está associado a participação de COX-1, logo, em situações de inflamação. O aumento da passagem paracelular ainda é discutido na literatura como sendo um indicativo de translocação bacteriana (FIORUCCI et al., 2002; LIU et al., 2021). Mostrando, desta maneira, que a função da barreira epitelial intestinal é crucial para manter uma relação simbiótica entre o corpo e a microbiota comensal que reside dentro dele (THOMSON et al., 2019; LIU et al., 2021).

Entretanto, ao fazermos uso de Tofacitinibe, notamos que houve menor passagem paracelular de fluoresceína, estando de acordo com os resultados descritos na literatura, que mostram que o uso desse inibidor de JAK promove preservação da integridade da mucosa, impedindo o aumento da permeabilidade paracelular (OLIVIER et al., 2022).

A partir desses resultados de integridade encontrados em experimentos realizados na câmara de Üssing, decidimos observar quais possíveis estruturas estariam relacionadas com essa perda da integridade da mucosa cólica de animais com colite por TNBS e quais proteínas de junção o grupo tratado com Tofacitinibe foi capaz de preservar.

Inicialmente, observamos por meio da técnica de PCR se havia alteração na expressão de RNA de algumas proteínas de junção. Foi possível analisar que houve diminuição da expressão relativa de RNA de Ocludina e aumento de Claudina-2, porém, não houve diferença estatística de ZO-1.

A Ocludina, descrita pela primeira vez por Furuse e colaboradores (1993), foi referida como um dos componentes da junção estreita, sendo ela também responsável pela manutenção da integridade da mucosa, acreditando-se que seja responsável por criar uma barreira entre as células, porém impedindo apenas a passagem de macromoléculas, mas não de pequenos íons (AL-SADI et al., 2011). Estudos anteriores confirmam nossos achados, mostrando que em diferentes modelos de colite também houve diminuição de Ocludina, associando a essa perda de integridade (KUO et al., 2019; MIR et al., 2016; BUSCHMANN et al., 2013; VAN ITALLIE et al., 2010).

No grupo tratado com Tofacitinibe, todavia, observamos que a expressão relativa de RNA de Ocludina foi recuperada. Outros pesquisadores conseguiram mostrar que o Tofacitinibe foi capaz de reestabelecer a expressão diminuída de Ocludina em células epiteliais intestinais humanas deficientes em PTPN2 (proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 2, responsável por regular JAK e STAT, enquanto protege o epitélio intestinal da ruptura da barreira induzida pela inflamação). Sendo ainda, a correção dos níveis de Ocludina pelo tofacitinibe associada à normalização da permeabilidade paracelular (SPALINGER et al., 2021).

Ao avaliarmos os níveis de Claudina-2, observamos que a colite induzida por TNBS ocasionou aumento da expressão relativa de RNA dessa

proteína. A claudina-2 foi descrita como tendo as propriedades de um canal de água e o seu aumento em Junções estreitas epiteliais torna-as mais permissivas ao fluxo paracelular passivo de íons de sódio (ROSENTHAL et al., 2010; WEBER et al., 2015). Dessa forma, sendo essa capacidade de atuar como um poro paracelular permeável a cátions de alta condutância, níveis elevados de claudina-2 podem aumentar o fluxo de cátions para o lúmen intestinal e, assim, contribuir para a perda de fluido consistente com diarreia (GÜNZEL et al., 20213). Além disso, estudos anteriores apontam a claudina-2 como uma molécula de importância clínica, pois sua expressão está aumentada nas DIIs e também está associada ao potencial metastático no câncer colorretal (WEI et al., 2021; SCALAVINO et al., 2022; BANIĆ et al., 2021).

Diferentemente dos nossos resultados, Sayoc-Becerra e colaboradores (2020) mostraram que a intervenção precoce com Tofacitinibe durante a exposição ao IFN- γ pode retornar totalmente o aumento da permeabilidade paracelular 4 kDa FITC-dextran (FD4), mas atenuar apenas parcialmente a diminuição da RET e correlacionam essa restauração parcial com os níveis de expressão da proteína claudina-2 não retornarem aos dos controles. Uma possível explicação dada pelo grupo foi que talvez o tofacitinibe seja incapaz de atenuar totalmente a sequência de eventos de sinalização que levam a não restauração dos níveis de claudina-2 (SAYOC-BECERRA et al., 2020).

Diferente desse resultado, outro grupo mostrou resultados semelhantes aos nossos. Spalinger e colaboradores (2021) observaram que o tratamento com Tofacitinibe corrigiu a função de barreira e a regulação da junção apertada, inclusive por meio da manutenção nos níveis de Claudina-2, em um sistema de co-cultura de células epiteliais intestinais com macrófagos inflamatórios deficientes em PTPN2.

Quando avaliamos a expressão de RNA de ZO-1, observamos que não houve diferença estatística entre os grupos. Estudos anteriores também mostraram que os níveis de ZO-1 se apresentaram inalterados entre os grupos avaliados no modelo de cultura de células epiteliais intestinais desafiadas com IFN- γ , grupo controle e grupo tratado com Tofacitinibe. Porém, conseguiram demonstrar, através da técnica de imunofluorescência que houve aumento de lacunas intercelulares e mudança de localização de ZO-1. Por outro lado, o tratamento com Tofacitinibe ocasionou diminuição da frequência de intervalos

intercelulares e realocização de ZO-1 (SAYOC-BECERRA et al., 2020), sendo essa uma possível explicação para os resultados encontrados por nosso grupo.

Dando seguimento a pesquisa de possíveis alterações em proteínas de junção, decidimos observar através da técnica de Western Blot, a expressão proteica de Claudina-2, Claudina-15 e Tricellulin. Observamos que o modelo de colite aumentou a expressão de claudina-2 e claudina-15, além de reduzir a expressão de tricellulin.

Concordando com nossos resultados de aumento da expressão relativa de RNA de Claudina-2, vimos que a expressão dessa proteína também estava mais elevada no grupo colite quando comparado ao grupo Sham. A partir desse resultado, é possível notar a real importância dessa proteína de junção formadora de poro no nosso modelo, trazendo similaridade com outros modelos de colite (CHEN et al., 2022; LI et al., 2018) e, além disso, com a própria fisiopatologia das DIIs, tanto em pacientes com doença de Crohn ativa, quanto em portadores de colite ulcerativa (ZEISSIG et al., 2007; WEBER et al., 2010; DAS et al., 2012).

O grupo tratado com Tofacitinibe, contudo, reduziu a expressão de claudina-2. Foi relatado que citocinas pró-inflamatórias associadas à DIIs, incluindo IL-6, ativam a via JAK-STAT para modificar a expressão de proteínas claudina, dentre elas, Claudina-2 (SUZUKI et al., 2011). Outros pesquisadores ainda mostraram que o Tofacitinibe foi capaz de impedir o aumento de Claudina-2, reduzindo significativamente a ativação de sinalização JAK1-STAT1/3 (SAYOC-BECERRA et al., 2020).

Resultados semelhantes também foram vistos com a expressão de claudina-15, que demonstraram que a colite induzida por TNBS aumentou a expressão de Claudina-15. Foi relatado que camundongos nocauteados para Claudin-15 cresceram normalmente e não exibiram diarreia; entretando, foi observado proliferação aumentada de células crípticas e presença de megaintestino (TAMURA et al., 2008).

Vale salientar que há evidências crescentes de que defeitos específicos no transporte de íons podem levar a movimentos de água alterados e contribuir para a geração de sintomas e diarreia em DII e colite espontânea em camundongos (SCHULTHEIS et al., 1998; LAUBITZ et al., 2008). Tais defeitos podem resultar na alteração do pH ácido da superfície intestinal e favorecer a

adesão bacteriana para facilitar ainda mais as interações micro-epiteliais e a translocação contribuindo para a alteração inflamatória (DARSIGNY et al., 2009).

Até onde temos conhecimento, não há na literatura trabalhos que identifiquem alterações de Claudina-15 em modelo de colite por TNBS, como foi realizado por nosso grupo. Porém, Schumann e colaboradores (2012) observaram alterações semelhantes as nossas em doença celíaca, sendo comprovado por eles o aumento de Claudina-15 nesta patologia. Essa proteína ainda é caracterizada como uma JE formadora de poro com permeabilidade seletiva para cátions e com papel fundamental na absorção de glicose (TAMURA et al., 2011).

No entanto, também é descrito na literatura que os níveis de dessa JE está diminuída em biópsias de cólon de pacientes com colite ulcerativa em comparação a de indivíduos saudáveis (CHATTERJEE et al., 2021). Porém, os estudos mencionados não relataram os critérios de exclusão utilizados, o que significa que as alterações nos níveis de claudina-15 podem estar associadas a mudanças em indivíduos saudáveis se eles tiverem condições como doença celíaca no estudo relacionado a colite ulcerativa, ou se indivíduos do grupo controle no estudo sobre colite ulcerativa tiverem doença celíaca.

Estudos ainda apontam que a regulação positiva de claudina-2 e claudina-15 pode ser uma representação dos esforços do organismo para aumentar a absorção, com o objetivo de compensar a redução da área de superfície da mucosa (ONG et al., 2020), porém, a longo prazo, essa desregulação poderá acarretar em problemas mais sérios, como transmigração bacteriana, por exemplo.

Quando analisamos a expressão de Tricellulin, notamos que estava diminuída no grupo colite. Ayala-Torres e colaboradores (2019) ainda observaram que a regulação negativa de Tricellulin em células MDCK C7, uma linhagem celular epitelial com propriedades de um epitélio apertado, resultou em um aumento da permeabilidade iônica, pela redução de RET e, dependendo da redução da tricelulina, em um aumento da permeabilidade macromolecular, além de estar associada a um aumento do fluxo de água transepitelial. Demonstrando, dessa maneira, que a Tricellulin é capaz de regular o fluxo de água transepitelial induzido osmoticamente em um epitélio compacto, e que a diminuição da expressão dessa proteína provoca maiores fluxos de água.

Nossos resultados, no entanto, mostraram que o Tofacitinibe não foi capaz de atenuar a redução na expressão de tricellulin. Apesar de sabermos da importância estrutural da Tricellulin, observamos que o tratamento com Tofacitinibe foi capaz de manter a integridade da mucosa, mesmo não reestabelecendo a expressão dessa proteína. Podemos inferir, portanto, que somente o dano causado nessa JE tricelular não é capaz de interferir na manutenção do tecido, e sim, quando associado a danos em outros componentes das JEs.

Um ponto relevante em relação ao estudo do uso do Tofacitinibe no tratamento DIIs é que ele tem demonstrado eficácia em pacientes com colite ulcerativa. No entanto, em um estudo de ensaio clínico randomizado de fase II, não mostrou eficácia significativa para doença de Crohn (PANÉS et al., 2017). Uma possível explicação para esse resultado pode ser a ampla inibição de JAK/STAT, que tem como alvo a sinalização inflamatória associada às células T (GHORESCHI et al., 2011), o que pode simultaneamente inibir respostas regulatórias importantes em células mieloides pró-inflamatórias, cujo recrutamento está aumentado durante a lesão intestinal, como na doença de Crohn (CORDES et al., 2020). Esse dado é interessante, considerando que o modelo de indução de colite por TNBS utilizado em nosso estudo mimetiza a patologia da doença de Crohn, e nesse contexto, observamos resultados favoráveis com o uso do Tofacitinibe no tratamento.

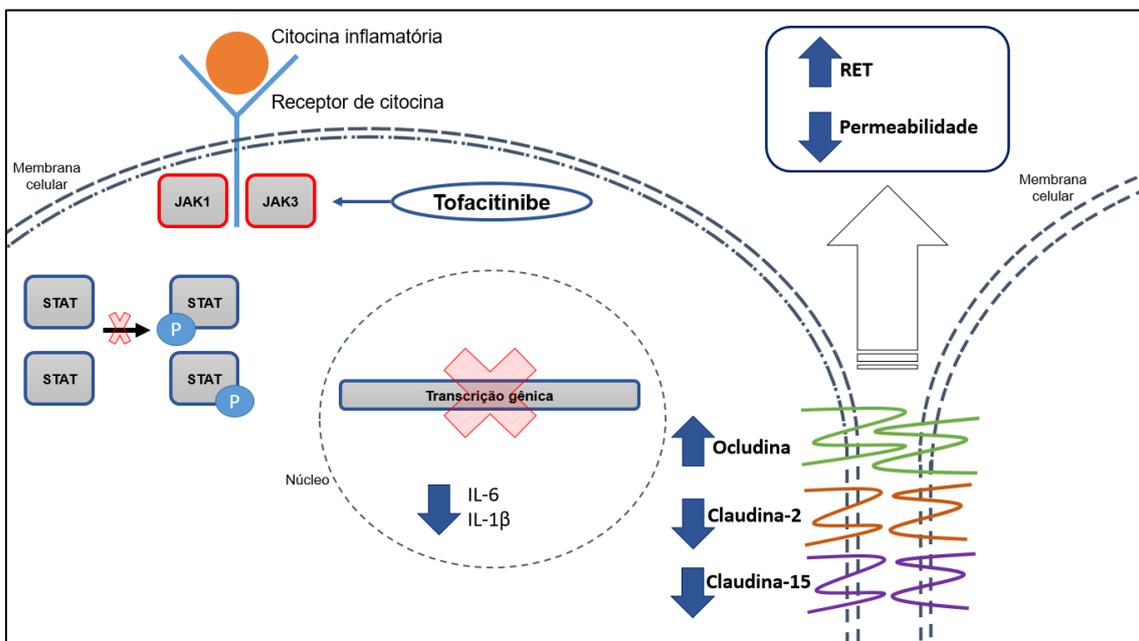
Uma limitação encontrada em nosso estudo foi o uso de apenas uma dose de Tofacitinibe. Porém, conseguimos, através de outros dados citados na literatura, definir uma dose adequada (LEE et al., 2021). Com isso, conseguimos encontrar resultados favoráveis em nossa pesquisa.

Outra limitação do nosso estudo foi a não avaliação de estresse oxidativo. Porém, a influência desse parâmetro já é bem descrita na literatura, estando a inflamação intestinal associada à superprodução de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio reativo, acarretando em estresse oxidativo e nitrosativo, condições observadas tanto no modelo de colite induzida por TNBS, quanto em pacientes com doença de Crohn (BRITO et al., 2014; MONTEIRO et al., 2021; JARMAKIEWICZ-CZAJA et al., 2023). Além disso, esse critério não foi objetivo do nosso estudo.

Apesar dessas limitações, os resultados do nosso estudo foram essenciais para aprofundar os conhecimentos acerca da fisiopatologia da colite, podendo ser extrapolada para a doença de Crohn, contribuindo, além do conhecimento sobre a farmacologia do Tofacitinibe, para futuras pesquisas sobre essa patologia e seus possíveis alvos farmacológicos.

7 CONCLUSÃO

- O modelo de colite induzida por TNBS em ratos causa perda da integridade da mucosa cólica associada ao aumento de citocinas pró-inflamatórias.
- A inibição da JAK pelo Tofacitinibe foi capaz de reduzir não só danos inflamatórios, mas também a perda da integridade da mucosa, recuperando danos associados a proteínas formadoras de poros, como a claudina-2 e a claudina-15, além de JEs formadoras de barreira, ocludinas; mas não por Tricellulin e ZO-1.



REFERÊNCIAS

- A Look Back at Our Beginning. **Crohn's and colitis fundaction**. New York, 2022. Disponível em: <https://www.crohnscolitisfoundation.org/about/our-beginning>. Acesso em: 07/06/2023.
- ABRAHAM, C.; CHO, J. H. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Disease. **The new england journal of medicine**. v. 21, p.2066-2078, 2009.
- ADEGBOLA, S.O.; SAHNAN, K.; WARUSAVITARNE, J.; HART, A.; TOZER, P. Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. **Int J Mol Sci**. v. 19(8), p. 2244, 2018.
- AKHTAR, M.; SHAUKAT, A.; ZAHOOR, A.; CHEN, Y.; WANG, Y.; YANG, M.; UMAR, T.; GUO, M.; DENG, G. Anti-inflammatory effects of Hederacoside-C on Staphylococcus aureus induced inflammation via TLRs and their downstream signal pathway in vivo and in vitro. **Microb Pathog**. v. 137, p. 1-11, 2019.
- AL-SADI, R.; KHATIB, K.; GUO, S.; YE, D.; YOUSSEF, M.; MA, T. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. v. 300(6), p. 54-64, 2011.
- ALVAREZ, P.; BOYE, J. Food production and processing considerations of allergenic food ingredients: a review. **J Allergy**. v. 2012, p. 1-14, 2012.
- ANANTHAKRISHNAN, A.; GAINER, V.; PEREZ, R.; CAI, T.; CHENG, S.; SAVOVA, G. Psychiatric co-morbidity is associated with increased risk of surgery in Crohn's disease. **Aliment Pharmacol Ther**. v. 37(4), p. 445-54, 2013.
- ANDERSON, C.A.; BOUCHER, G.; LEES, C.W.; FRANKE, A.; D'AMATO, M.; TAYLOR, K.D.; LEE, J.C.; et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. **Nat Genet**. v. 43(3), p. 246-52, 2011.
- ANDREASSON, U.; PERRET-LIAUDET, A.; VAN WAALWIJK; VAN DOORN, L.J.; BLENNOW, K.; CHIASSERINI, D.; ENGELBORGH, S.; FLADBY, T.; GENC, S.; KRUSE, N.; KUIPERIJ, H.B.; KULIC, L.; LEWCZUK, P.; MOLLENHAUER, B.; MROCZKO, B.; PARNETTI, L.; VANMECHELEN, E.; VERBEEK, M.M.; WINBLAD, B.; ZETTERBERG, H.; KOEL-SIMMELINK, M.; TEUNISSEN, C.E. A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. **Front Neurol**. v. 19(6), p. 1-8, 2015.
- ARIHIRO, S.; OHTANI, H.; SUZUKI, M.; MURATA, M.; EJIMA, C.; OKI, M.; KINOUCHI, Y.; FUKUSHIMA, K.; SASAKI, I.; NAKAMURA, S.; MATSUMOTO, T.; TORII, A.; TODA, G.; NAGURA, H. Differential expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Pathol Int**. v. 52(5-6), p. 367-374, 2002.
- ATREYA, R.; MUDTER, J.; FINOTTO, S.; MÜLLBERG, J.; JOSTOCK, T.; WIRTZ, S.; SCHÜTZ, M.; BARTSCH, B.; HOLTMANN, M.; BECKER, C.;

STRAND, D.; CZAJA, J.; SCHLAAK, J.F.; LEHR, H.A.; AUTSCHBACH, F.; SCHÜRMAN, G.; NISHIMOTO, N.; YOSHIZAKI, K.; ITO, H.; KISHIMOTO, T.; GALLE, P.R.; ROSE-JOHN, S.; NEURATH, M.F. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. **Nat Med.** v. 6(5), p. 583-588, 2000.

AUFSES, A.H. The history of Crohn's Disease. **Surg. Clin. N. Am.** v. 81, p. 1–11, 2001.

AYALA-TORRES, C.; KRUG, S.M.; SCHULZKE, J.D.; ROSENTHAL, R.; FROMM, M. Tricellulin Effect on Paracellular Water Transport. **Int J Mol Sci.** v. 20(22), p. 1-15, 2019.

BABYATSKY, M.W.; ROSSITER, G.; PODOLSKY, D.K. Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology.** v. 110(4), p.975-84, 1996.

BAE, S.H.; KIM, H.S.; CHOI, H.G.; CHANG, S.Y.; KIM, S.H. Effects of Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis on the Disposition of Tofacitinib in Rats. **Biomol Ther (Seoul).** v. 30(6), p. 510-519, 2022.

BAMIAS, G.; NYCE, M.R.; DE LA RUE, S.A.; COMINELLI, F. AMERICAN COLLEGE OF PHYSICIANS; AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. **Ann Intern Med.** v. 143(12), p. 895-904, 2005.

BAUMGART, D.C.; SANDBORN, W.J. Crohn's disease. **Lancet.** v. 380, p. 1590–1605, 2012.

BERGMAN R, PARKES M. Systematic review: the use of mesalazine in inflammatory bowel disease. **Aliment Pharmacol Ther.** v. 23(7), p. 841-55, 2006.

BERNSTEIN, C.N.; HITCHON, C.A.; WALLD, R.; BOLTON, J.M.; SAREEN, J.; WALKER, J.R. Increased burden of psychiatric disorders in inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis.** v. 25(2), p. 360–8, 2019.

BILLMEIER, U.; DIETERICH, W.; NEURATH, M. F.; ATREYA, R. Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases. **World J Gastroenterol.** v.22, p.9300-9313, 2016.

BRITO, T.V.; NETO, J.P.; PRUDÊNCIO, R.S.; BATISTA, J.A.; JÚNIOR, J.S.; SILVA, R.O.; FRANCO, A.X.; ARAGÃO, K.S.; SOARES, P.M.; SOUZA, M.H.; CHAVES, L.S.; FREITAS, A.L.; MEDEIROS, J.V.; BARBOSA, A.L. Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. **J Pharm Pharmacol.** v. 66(8), p. 1161-1170, 2014.

BUSCHMANN, M.M.; SHEN, L.; RAJAPAKSE, H.; RALEIGH, D.R.; WANG, Y.; WANG, Y.; LINGARAJU, A.; ZHA, J.; ABBOTT, E.; MCAULEY, E.M.;

- BRESKIN, L.A.; WU, L.; ANDERSON, K.; TURNER, J.R.; WEBER, C.R. Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. **Mol Biol Cell**. v. 24(19), p. 3056-3068, 2013.
- CAI, Z.; WANG, S.; LI, J. Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review. **Front Med (Lausanne)**. v. 8, p. 1-24, 2021.
- CARVALHO, L.R.; DE BRITO, T.V.; JÚNIOR, J.S.D.C.; JÚNIOR, G.J.D.; DE AGUIAR, M.D.; SOUSA, S.G.; SILVA, R.O.; SILVA, F.R.P.; VASCONCELOS, D.F.P.; VÉRAS, L.M.C.; LEITE, J.R.S.A.; MARTINS, D.S.; MARTINS, C.S.; OLIVEIRA, J.S.; BARBOSA, A.L.R. Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid, reverses inflammation and lipid peroxidation parameters in the Crohn disease model induced by trinitrobenzenosulfonic acid in Wistar rats. **Biomed Pharmacother**. v. 102, p. 278–285, 2018.
- CASINI-RAGGI, V.; KAM, L.; CHONG, Y.J.; FIOCCHI, C.; PIZARRO, T.T.; COMINELLI, F. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. **J Immunol**. v. 154(5), p. 2434-2440, 1995.
- CHANDEL, S.; PRAKASH, A.; MEDHI, B. Current scenario in inflammatory bowel disease: drug development prospects. **Pharmacol Rep**. v. 67(2), p. 224-229, 2015.
- CHANG J, LEONG RW, WASINGER VC, IP M, YANG M, PHAN TG. Impaired Intestinal Permeability Contributes to Ongoing Bowel Symptoms in Patients With Inflammatory Bowel Disease and Mucosal Healing. **Gastroenterology**. v. 153, p. 723-731, 2017.
- CHATTERJEE, I.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; LU, R.; XIA, Y.; SUN, J. Overexpression of Vitamin D Receptor in Intestinal Epithelia Protects Against Colitis via Upregulating Tight Junction Protein Claudin 15. **J Crohns Colitis**. v. 15(10), p. 1720-1736, 2021.
- CHELAKKOT, C.; GHIM, J.; RYU, S.H. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. **Exp Mol Med**. v. 50(8), p. 1-9, 2018.
- CHEN, W.; LIANG, R.; YI, Y.; ZHU, J.; ZHANG, J. P38 α deficiency in macrophages ameliorates murine experimental colitis by regulating inflammation and immune process. **Pathol Res Pract**. v. 233, p.153881, 2022.
- CHIRIAC, S.; SFARTI, C.V.; MINEA, H.; STANCIU, C.; COJOCARIU, C.; SINGEAP, A.M.; GIRLEANU, I.; CUCIUREANU, T.; PETREA, O.; HUIBAN, L.; MUZICA, C.M.; ZENOVIA, S.; NASTASA, R.; STAFIE, R.; ROTARU, A.; STRATINA, E.; TRIFAN, A. Impaired Intestinal Permeability Assessed by Confocal Laser Endomicroscopy-A New Potential Therapeutic Target in Inflammatory Bowel Disease. **Diagnostics (Basel)**. v.13(7), p. 1230, 2023.

COSTA, G.A.; CARVALHO, G.S.; PEREIRA, L.C.; COSTA, S.G.V.B.S.; BRASIL, C.A. Epidemiological Profile of Patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in the Last 6 Years. **J. Health Sci.** v. 24(1), p. 63-66, 2022.

COSTA, H.B.; SALES, T.M.A.L; PAULA, S.M.; MOURÃO, R.; SOUSA, M.K.; NICOLAU, L.A.D.; SOARES, P.M.G.; BARBOSA, A.L.R.; SOUZA, M.H.L.P. Selective inhibition of cox-1, but not cox-2, decreased the colonic epithelial integrity in the tnbs-induced colitis in rats. **Gastroenterology.** v. 158, p. 274, 2020.

CORDES, F.; LENKER, E.; SPILLE, L.J.; WEINHAGE, T.; BETTENWORTH, D.; KESSEL, C.; SCHMIDT, H.H.; FOELL, D.; VARGA, G. Tofacitinib Reprograms Human Monocytes of IBD Patients and Healthy Controls Toward a More Regulatory Phenotype. **Inflamm Bowel Dis.** v. 26(3), p. 391-406, 2020.

ČUŽIĆ, S.; ANTOLIĆ, M.; OGNJENović, A.; STUPIN-POLANČEC, D.; PETRINIĆ GRBA, A.; HRVAČIĆ, B.; DOMINIS KRAMARIĆ, M.; MUSLADIN, S.; POŽGAJ, L.; ZLATAR, I.; POLANČEC, D.; ARALICA, G.; BANIĆ, M.; UREK, M.; MIJANDRUŠIĆ SINČIĆ, B.; ČUBRANIĆ, A.; GLOJNARIĆ, I.; BOSNAR, M.; ERAKOVIĆ HABER, V. Claudins: Beyond Tight Junctions in Human IBD and Murine Models. **Front Pharmacol.** v. 12, p. 1-15, 2021.

D'AMICO F, FIORINO G, FURFARO F, ALLOCCA M, DANESE S. Janus kinase inhibitors for the treatment of inflammatory bowel diseases: developments from phase I and phase II clinical trials. **Expert Opin Investig Drugs.** v. 27(7), p. 595-599, 2018.

DARNELL, J.E. STATs and gene regulation. **Science.** v. 277(5332), p. 1630-5, 1997.

DARSIGNY, M.; BABEU, J.P.; DUPUIS, A.A.; FURTH, E.E.; SEIDMAN, E.G.; LÉVY, E.; VERDU, E.F.; GENDRON, F.P.; BOUDREAU, F. Loss of hepatocyte-nuclear-factor-4alpha affects colonic ion transport and causes chronic inflammation resembling inflammatory bowel disease in mice. **PLoS One.** v. 4(10), p. 1-10, 2009.

DAS, P.; GOSWAMI, P.; DAS, T.K.; NAG, T.; SREENIVAS, V.; AHUJA, V.; PANDA, S.K.; GUPTA, S.D.; MAKHARIA, G.K. Comparative tight junction protein expressions in colonic Crohn's disease, ulcerative colitis, and tuberculosis: a new perspective. **Virchows Arch.** v. 460(3), p. 261-270, 2012.

DONG, K.; DENG, S.J.; HE, B.Y.; GUO, Z.Y.; GUAN, Z.L.; LENG, X.; MA, R.R.; WANG, D.Y.; XING, J.F.; YOU, C.Y. Mucoadhesive Nanoparticles Enhance the Therapeutic Effect of Dexamethasone on Experimental Ulcerative Colitis by the Local Administration as an Enema. **Drug Des Devel Ther.** v. 17, p. 191-207, 2023.

DUBINSKY, M.C. Azathioprine, 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease: pharmacology, efficacy, and safety. **Clin Gastroenterol Hepatol.** v. 2(9), p. 731-743, 2004.

DURHAM, G.A.; WILLIAMS, J.J.L.; NASIM, M.T.; PALMER, T.M. Targeting SOCS Proteins to Control JAK-STAT Signalling in Disease. **Trends Pharmacol Sci.** v. 40(5), p.298-308, 2019.

DUTRA, N. L. S.; DE BRITO, T. V.; MAGALHÃES, D. A.; SOUSA, S. G.; BATISTA, J. A.; PEREIRA, C. M. C.; BARBOSA, A. L. R. Sulfated polysaccharide extracted from seaweed *Gracilaria caudata* attenuates acetic acid-induced ulcerative colitis. **Food Hydrocolloids.** v. 111, p. 1-15, 2021.

FAWSON, S.; DIBLEY, L.; SMITH, K.; BATISTA, J.; ARTOM, M.; WINDGASSEN, S.; SYRED, J.; MOSS-MORRIS, R.; NORTON, C. Developing an Online Program for Self-Management of Fatigue, Pain, and Urgency in Inflammatory Bowel Disease: Patients' Needs and Wants. **Dig Dis Sci.** v. 67(7), p. 2813-2826, 2022.

FELDMAN, G.J.; MULLIN, J.M.; RYAN, M.P. Occludin: structure, function and regulation. **Adv Drug Deliv Rev.** v. 57(6), p. 883-917, 2005.

FICHTNER-FEIGL, S.; FUSS, I.J.; PREISS, J.C.; STROBER, W.; KITANI, A. Treatment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NF-kappa B decoy oligonucleotides. **J Clin Invest.** v. 115(11), p. 3057-71, 2005.

FICHTNER-FEIGL, S.; FUSS, I.J.; YOUNG, C.A.; WATANABE, T.; GEISSLER, E.K.; SCHLITT, H.J.; KITANI, A.; STROBER, W. Induction of IL-13 triggers TGF-beta1-dependent tissue fibrosis in chronic 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis. **J Immunol.** v. 178(9), p. 5859-70, 2007.

FIORUCCI, S.; DISTRUTTI, E.; MENCARELLI, A.; BARBANTI, M.; PALAZZINI, E.; MORELLI, A. Inhibition of intestinal bacterial translocation with rifaximin modulates lamina propria monocytic cells reactivity and protects against inflammation in a rodent model of colitis. **Digestion.** v. 66(4), p. 246-256, 2002.

FURUSE, M.; HIRASE, T.; ITOH, M.; NAGAFUCHI, A.; YONEMURA, S.; TSUKITA, S.; TSUKITA, S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. **J Cell Biol.** v. 123(6), p. 1777-1788, 1993.

GERLACH, K.; LECHNER, K.; POPP, V.; OFFENSPERGER, L.; ZUNDLER, S.; WIENDL, M.; BECKER, E.; ATREYA, R.; RATH, T.; NEURATH, M.F.; WEIGMANN, B. The JAK1/3 inhibitor tofacitinib suppresses T cell homing and activation in chronic intestinal inflammation. **J Crohns Colitis.** , v. 162, p. 1-15, 2020.

GHORESCHI, K.; JESSON, M.I.; LI, X.; LEE, J.L.; GHOSH, S.; ALSUP, J.W.; WARNER, J.D.; TANAKA, M.; STEWARD-THARP, S.M.; GADINA, M.; THOMAS, C.J.; MINNERLY, J.C.; STORER, C.E.; LABRANCHE, T.P.; RADI, Z.A.; DOWTY, M.E.; HEAD, R.D.; MEYER, D.M.; KISHORE, N.; O'SHEA, J.J. Modulation of innate and adaptive immune responses by tofacitinib. **J Immunol.** v. 186(7), p. 4234-4243, 2011.

- GÜNZEL, D.; YU, A.S. Claudins and the modulation of tight junction permeability. **Physiol Rev.** v. 93(2), p. 525-569, 2013.
- GUO, Y.; LU, N.; BAI, A. Clinical use and mechanisms of infliximab treatment on inflammatory bowel disease: a recent update. **BioMed Research International.** v.13, p. 1-9, 2013.
- HEINEMANN, U.; SCHUETZ, A. Structural Features of Tight-Junction Proteins. **Int J Mol Sci.** v. 20(23), p. 6020-6032, 2019.
- HEMPSTOCK, W.; NAGATA, N.; ISHIZUKA, N.; HAYASHI, H. The effect of claudin-15 deletion on cationic selectivity and transport in paracellular pathways of the cecum and large intestine. **Sci Rep.** v. 13(1), p. 6799-6810, 2023.
- HO, S.M.; LEWIS, J.D.; MAYER, E.A.; PLEVY, S.E.; CHUANG, E.; RAPPAPORT, S.M.; CROITORU, K.; KORZENIK, J.R.; KRISCHER, J.; HYAMS, J.S.; JUDSON, R.; KELLIS, M.; JERRETT, M.; MILLER, G.W.; GRANT, M.L.; SHTRAIZENT, N.; HONIG, G.; HURTADO-LORENZO, A.; WU, G.D. Challenges in IBD Research: Environmental Triggers. **Inflamm Bowel Dis.** v. 25(2), p. 13-23, 2019.
- HODGE, J.A.; KAWABATA, T.T.; KRISHNASWAMI, S.; CLARK, J.D.; TELLIEZ, J.B.; DOWTY, M.E.; MENON, S.; LAMBA, M.; ZWILLICH, S. The mechanism of action of tofacitinib - an oral Janus kinase inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol.** v. 34(2), p. 318-328, 2016.
- HU, X.; LI, J.; FU, M.; ZHAO, X.; WANG, W. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. **Signal Transduct Target Ther.** v. 6(1), p. 402-435, 2021.
- HUGOT, J.P.; CHAMAILLARD, M.; ZOUALI, H.; LESAGE, S.; CÉZARD, J.P.; BELAICHE, J.; ALMER, S.; TYSK, C.; O'MORAIN, C.A.; GASSULL, M.; BINDER, V.; FINKEL, Y.; CORTOT, A.; MODIGLIANI, R.; LAURENT-PUIG, P.; GOWER-ROUSSEAU, C.; MACRY, J.; COLOMBEL, J.F.; SAHBATOU, M.; THOMAS, G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. **Nature.** v. 411(6837), p. 599-603, 2001.
- IACUCCI, M.; DE SILVA, S.; GHOSH, S. Mesalazine in inflammatory bowel disease: a trendy topic once again? **Can J Gastroenterol.** v. 24(2), p. 127-133, 2010.
- IGLESIAS, M.; KHALIFIAN, S.; OH, B.C.; ZHANG, Y.; MILLER, D.; BECK, S.; BRANDACHER, G.; RAIMONDI, G. A short course of tofacitinib sustains the immunoregulatory effect of CTLA4-Ig in the presence of inflammatory cytokines and promotes long-term survival of murine cardiac allografts. **Am J Transplant.** v. 21(8), p. 2675-2687, 2021.
- JARMAKIEWICZ-CZAJA, S.; FERENC, K.; FILIP, R. Antioxidants as Protection against Reactive Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease. **Metabolites.** v. 13(4), p. 573, 2023.
- KAI, Y.; TAKAHASHI, I.; ISHIKAWA, H.; HIROI, T.; MIZUSHIMA, T.; MATSUDA, C. Colitis in mice lacking the common cytokine receptor gamma

chain is mediated by IL-6-producing CD4+ T cells. **Gastroenterology**. v. 128(4), p. 922-934, 2005.

KAPLAN, G.G.; SZYSZKOWICZ, M.; FICHNA, J.; ROWE, B.H.; PORADA, E.; VINCENT, R.; MADSEN, K.; GHOSH, S.; STORR, M. Non-specific abdominal pain and air pollution: a novel association. **PLoS One**. v. 7(10), p. 47669-47680, 2012.

KARAMAN, M.W.; HERRGARD, S.; TREIBER, D.K.; GALLANT, P.; ATTERIDGE, C.E.; CAMPBELL, B.T.; CHAN, K.W.; CICERI, P.; DAVIS, M.I.; EDEEN, P.T.; FARAONI, R.; FLOYD, M.; HUNT, J.P.; LOCKHART, D.J.; MILANOV, Z.V.; MORRISON, M.J.; PALLARES, G.; PATEL, H.K.; PRITCHARD, S.; WODICKA, L.M.; ZARRINKAR, P.P. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. **Nat Biotechnol**. v. 26(1), p. 127-132, 2008.

KHOR, B.; GARDET, A.; XAVIER, R.J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**. v. 474(7351), p. 307-317, 2011.

KNOWLES, S.R.; GRAFF, L.A.; WILDING, H.; HEWITT, C.; KEEFER, L.; MIKOCKA-WALUS, A. Quality of life in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analyses—part I. **Inflamm Bowel Dis**. v. 24(4), p. 742–751, 2018.

KNOWLES, S.R.; KEEFER, L.; WILDING, H.; HEWITT, C.; GRAFF, L.A.; MIKOCKA-WALUS, A. Quality of life in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analyses—part II. **Inflamm Bowel Dis**. v. 24(5), p. 966–976, 2018.

KOBAYASHI, T.; SIEGMUND, B.; LE BERRE, C. Ulcerative colitis. **Nat Rev Dis Primers** v. 6, p. 74-86, 2020.

KOBAYASHI, T.; SIEGMUND, B.; LE BERRE, C.; WEI, S.C.; FERRANTE, M.; SHEN, B.; BERNSTEIN, C.N.; DANESE, S.; PEYRIN-BIROULET, L.; HIBI, T. Ulcerative colitis. **Nat Rev Dis Primers**. v. 6, p. 74-94, 2020.

KOLLS, J.K.; LINDÉN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**. v. 21(4), p. 467-476, 2004.

KOTZE, P.G.; MA, C.; ALMUTAIRDI, A.; PANACCIONE, R. Clinical utility of ustekinumab in Crohn's disease. **J Inflamm Res**. v. 11, p. 35-47, 2018.

KUCHARZIK, T.; MAASER, C.; LÜGERING, A.; KAGNOFF, M.; MAYER, L.; TARGAN, S.; DOMSCHKE, W. Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. **Inflamm Bowel Dis**. v. 12(11), p. 1068-1083, 2006.

KUO, W.T.; SHEN, L.; ZUO, L.; SHASHIKANTH, N.; ONG, M.L.D.M.; WU, L.; ZHA, J.; EDELBLUM, K.L.; WANG, Y.; WANG, Y.; NILSEN, S.P.; TURNER, J.R. Inflammation-induced Occludin Downregulation Limits Epithelial Apoptosis by Suppressing Caspase-3 Expression. **Gastroenterology**. v. 157(5), p. 1323-1337, 2019.

LAUBITZ, D.; LARMONIER, C.B.; BAI, A.; MIDURA-KIELA, M.T.; LIPKO, M.A.; THURSTON, R.D.; KIELA, P.R.; GHISHAN, F.K. Colonic gene expression

profile in NHE3-deficient mice: evidence for spontaneous distal colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. v. 295(1), p. 63-77, 2008.

LECAT, A.; PIETTE, J.; LEGRAND-POELS, S. The protein Nod2: an innate receptor more complex than previously assumed. **Biochem Pharmacol**. Dec v. 80(12), p. 2021-2031, 2010.

LEE, C.H.; KOH, S.J.; RADJ, Z.A.; HABTEZION, A. Animal models of inflammatory bowel disease: novel experiments for revealing pathogenesis of colitis, fibrosis, and colitis-associated colon cancer. **Intest Res**. v. 31, p. 1-11, 2023.

LEE, S.H. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. **Intest Res**. v. 13(1), p. 11-18, 2015.

LEE, S.N.; STORK, C.; WAHL, C.; SINGH, S.; CHUANG, E. Targeted delivery of soluble tofacitinib citrate to the site of inflammation to improve efficacy and safety. Poster apresentado em Digestive Disease Week virtual conference, Maio 2021.

LEFEVRE, P.L.C.; VANDE CASTEELE, N. Clinical Pharmacology of Janus Kinase Inhibitors in Inflammatory Bowel Disease. **J Crohns Colitis**. v. 14(2), p. 725-736, 2020.

LI, H.; GONG, Y.; XIE, Y.; SUN, Q.; LI, Y. Clostridium butyricum protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and regulating microflora in a murine model of dextran sodium sulfate-induced colitis. **Scand J Gastroenterol**. v. 53(9), p. 1031-1042, 2018.

LI, Z.; KUANG, X.; CHEN, T.; SHEN, T.; WU, J. Peptide YY 3-36 attenuates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by modulating Th1/Th2 differentiation. **Bioengineered**. v. 13(4), p. 10144-10158, 2022.

LIEW, P.X.; KUBES, P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. **Physiol Rev**. v. 99(2), p. 1223-1248, 2019.

LIN, P.Y.; STERN, A.; PENG, H.H.; CHEN, J.H.; YANG, H.C. Redox and Metabolic Regulation of Intestinal Barrier Function and Associated Disorders. **Int J Mol Sci**. v. 23(22), p. 144-153, 2022.

LIU, E.; ASLAM, N.; NIGAM, G.; LIMDI, J.K. Tofacitinib and newer JAK inhibitors in inflammatory bowel disease-where we are and where we are going. **Drugs Context**. v. 11, p. 1-17, 2022.

LIU, J.Z.; VAN SOMMEREN, S.; HUANG, H.; NG, S.C.; ALBERTS, R.; TAKAHASHI, A.; RIPKE, S.; LEE, J.C.; JOSTINS, L.; SHAH, T.; ABEDIAN, S.; CHEON, J.H.; CHO, J.; DAYANI, N.E.; FRANKE, L.; FUYUNO, Y.; HART, A.; JUJAL, R.C.; JUJAL, G.; KIM, W.H.; MORRIS, A.P.; POUSTCHI, H.; NEWMAN, W.G.; MIDHA, V.; ORCHARD, T.R.; VAHEDI, H.; SOOD, A.; SUNG, J.Y.; MALEKZADEH, R.; WESTRA, H.J.; YAMAZAKI, K.; YANG, S.K.; BARRETT, J.C.; ALIZADEH, B.Z.; PARKES, M.; BK, T.; DALY, M.J.; KUBO, M.; ANDERSON, C.A.; WEERSMA, R.K. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. **Nat Genet**. v. 47(9), p. 979-986, 2015.

LIU, S.; ZHAO, W.; LAN, P.; MOU, X. The microbiome in inflammatory bowel diseases: from pathogenesis to therapy. **Protein Cell**. v. 12(5), p. 331-345, 2021.

MACPHERSON, B.R.; PFEIFFER, C.J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion**. v. 17(2), p. 135-150, 1978.

MAK, W.Y.; ZHAO, M.; NG, S.C.; BURISCH, J. The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. **J Gastroenterol Hepatol**. v. 35(3), p. 380-389, 2020.

MARTEL, J.; CHANG, S.H.; KO, Y.F.; HWANG, T.L.; YOUNG, J.D.; OJCIUS, D.M. Gut barrier disruption and chronic disease. **Trends Endocrinol Metab**. v. 33(4), p. 247-265, 2022.

MATSUOKA, K.; INOUE, N.; SATO, T.; OKAMOTO, S.; HISAMATSU, T.; KISHI, Y.; SAKURABA, A.; HITOTSUMATSU, O.; OGATA, H.; KOGANEI, K.; FUKUSHIMA, T.; KANAI, T.; WATANABE, M.; ISHII, H.; HIBI, T. T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. **Gut**. v. 53(9), p. 1303-1308, 2004.

MCGUCKIN, M.A.; ERI, R.; SIMMS, L.A.; FLORIN, T.H.; RADFORD-SMITH, G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. **Inflamm Bowel Dis**. v. 15(1), p. 100-113, 2009.

MEDINA, C.; SANTANA, A.; PAZ, M.C.; DÍAZ-GONZALEZ, F.; FARRE, E.; SALAS, A.; RADOMSKI, M.W.; QUINTERO, E. Matrix metalloproteinase-9 modulates intestinal injury in rats with transmural colitis. **J Leukoc Biol**. v. 79(5), p. 954-962, 2006.

MELGAR, S.; SHANAHAN, F. Inflammatory bowel disease—from mechanisms to treatment strategies. **Autoimmunity**. v. 43(7), p. 463-477, 2010.

MIR, H.; MEENA, A.S.; CHAUDHRY, K.K.; SHUKLA, P.K.; GANGWAR, R.; MANDA, B.; PADALA, M.K.; SHEN, L.; TURNER, J.R.; DIETRICH, P.; DRAGATSIS, I.; RAO, R. Occludin deficiency promotes ethanol-induced disruption of colonic epithelial junctions, gut barrier dysfunction and liver damage in mice. **Biochim Biophys Acta**. v. 1860(4), p. 765-774, 2016.

MONACO, A.; OVRYN, B.; AXIS, J.; AMSLER, K. The Epithelial Cell Leak Pathway. **Int J Mol Sci**. v. 22(14), p. 1-26, 2021.

MONTEIRO, C.E.D.S., FILHO, H.B.D.C., SILVA, F.G.O.; SOUZA MFF, SOUSA, J.A.O.; FRANCO, Á.X.; RESENDE, Â.C.; MOURA, R.S.; SOUZA, M.H.L.; SOARES, P.M.G.; BARBOSA, A.L.D.R. Euterpe oleracea Mart. (Açaí) attenuates experimental colitis in rats: involvement of TLR4/COX-2/NF-κB. **Inflammopharmacol**. v. 29, p. 193–204, 2021.

MORRIS, G.P.; BECK, P.L.; HERRIDGE, M.S.; DEPEW, W.T.; SZEWCZUK, M.R.; WALLACE, J.L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**. v. 96(3), p. 795-803, 1989.

MUHVIĆ-UREK, M.; TOMAC-STOJMENOVIĆ, M.; MIJANDRUŠIĆ-SINČIĆ, B. Oral pathology in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol.** v. 22, p.5655-5667, 2016.

NALLEWEG, N.; CHIRIAC, M.T.; PODSTAWA, E.; LEHMANN, C.; RAU, T.T.; ATREYA, R.; KRAUSS, E.; HUNDORFEAN, G.; FICHTNER-FEIGL, S.; HARTMANN, A.; BECKER, C.; MUDTER, J. IL-9 and its receptor are predominantly involved in the pathogenesis of UC. **Gut.** v. 64(5), p. 743-755, 2015.

NEUENDORF, R.; HARDING, A.; STELLO, N.; HANES, D.; WAHBEH, H. Depression and anxiety in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review. **J Psychosom Res.** v. 87, p. 70–80, 2016.

NIGHOT, M.; LIAO, P.L.; MORRIS, N.; MCCARTHY, D.; DHARMAPRAKASH, V.; ULLAH KHAN, I.; DALESSIO, S.; SAHA, K.; GANAPATHY, A.S.; WANG, A.; DING, W.; YOCHUM, G.; KOLTUN, W.; NIGHOT, P.; MA, T. Long-Term Use of Proton Pump Inhibitors Disrupts Intestinal Tight Junction Barrier and Exaggerates Experimental Colitis. **J Crohns Colitis.** v. 17(4), p. 565-579, 2023.

NOROUZKHANI, N.; FARAMARZI, M.; GHODOUSI MOGHADAM, S.; KARIMI, M.A.; SHOKRI SHIRVANI, J.; BAHARI, A.; SHOJAEIBAGHINI, M.; ESLAMI, S.; TABESH H. Identification of the informational and supportive needs of patients diagnosed with inflammatory bowel disease: a scoping review. **Front Psychol.** v. 14, p. 1-17, 2023.

OGURA, Y.; BONEN, D.K.; INOHARA, N.; NICOLAE, D.L.; CHEN, F.F.; RAMOS, R.; BRITTON, H.; MORAN, T.; KARALIUSKAS, R.; DUERR, R.H.; ACHKAR, J.P.; BRANT, S.R.; BAYLESS, T.M.; KIRSCHNER, B.S.; HANAUER, S.B.; NUÑEZ, G.; CHO, J.H. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. **Nature.** v. 411(6837), p. 603-606, 2001.

OKAYASU, I.; HATAKEYAMA, S.; YAMADA, M.; OHKUSA, T.; INAGAKI, Y.; NAKAYA, R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology.** v. 98(3), p. 694-702, 1990.

OLIVERA, P.; DANESE, S.; PEYRIN-BIROULET, L. Next generation of small molecules in inflammatory bowel disease. **Gut.** v. 66(2), p. 199-209, 2017.

OLIVIER, S.; DIOUNOU, H.; POCHARD, C.; FRECHIN, L.; DURIEU, E.; FORETZ, M.; NEUNLIST, M.; ROLLI-DERKINDEREN, M.; VIOLLET, B. Intestinal Epithelial AMPK Deficiency Causes Delayed Colonic Epithelial Repair in DSS-Induced Colitis. **Cells.** v. 11(4), p. 1-21, 2022.

ONG, M.L.D.M.; YERUVA, S.; SAILER, A.; NILSEN, S.P.; TURNER, J.R. Differential regulation of claudin-2 and claudin-15 expression in children and adults with malabsorptive disease. **Lab Invest.** v. 100(3), p. 483-490, 2020.

O'SHEA, J.J.; SCHWARTZ, D.M.; VILLARINO, A.V.; GADINA, M.; MCINNIS, I.B.; LAURENCE, A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. **Annu Rev Med.** v. 66, p. 311-328, 2015.

OWEN, K.L.; BROCKWELL, N.K.; PARKER, B.S. JAK-STAT Signaling: A Double-Edged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression. **Cancers (Basel).** v. 11(12), p.2002, 2019.

PANÉS, J.; SANDBORN, W.J.; SCHREIBER, S.; SANDS, B.E.; VERMEIRE, S.; D'HAENS, G.; PANACCIONE, R.; HIGGINS, P.D.R.; COLOMBEL, J.F.; FEAGAN, B.G.; CHAN, G.; MOSCARIELLO, M.; WANG, W.; NIEZYCHOWSKI, W.; MARREN, A.; HEALEY, P.; MALLER, E. Tofacitinib for induction and maintenance therapy of Crohn's disease: results of two phase IIb randomised placebo-controlled trials. **Gut**. v. 66(6), p. 1049-1059, 2017.

PAPAMICHAEL, K.; LIN, S.; MOORE, M.; PAPAIOANNOU, G.; SATTLER, L.; CHEIFETZ, A.S. Infliximab in inflammatory bowel disease. **Ther Adv Chronic Dis**. v. 10, p. 1-15, 2019.

PETERS, L.A.; PERRIGOUE, J.; MORTHA, A.; IUGA, A.; SONG, W.M.; NEIMAN, E.M.; LLEWELLYN, S.R.; DI NARZO, A.; KIDD, B.A.; TELESKO, S.E.; ZHAO, Y.; STOJMIROVIC, A.; SENDECKI, J.; SHAMEER, K.; MIOTTO, R.; LOSIC, B.; SHAH, H.; LEE, E.; WANG, M.; FAITH, J.J.; KASARSKIS, A.; BRODMERKEL, C.; CURRAN, M.; DAS, A.; FRIEDMAN, J.R.; FUKUI, Y.; HUMPHREY, M.B.; IRITANI, B.M.; SIBINGA, N.; TARRANT, T.K.; ARGMANN, C.; HAO, K.; ROUSSOS, P.; ZHU, J.; ZHANG, B.; DOBRIN, R.; MAYER, L.F.; SCHADT, E.E. A functional genomics predictive network model identifies regulators of inflammatory bowel disease. **Nat Genet**. v. 49(10), p. 1437-1449, 2017.

QUARESMA, A.B.; DAMIAO, A.O.M.C.; COY, C.S.R.; MAGRO, D.O.; HINO, A.A.F.; VALVERDE, D.A.; PANACCIONE, R.; COWARD, S.B.; NG, S.C.; KAPLAN, G.G.; KOTZE, P.G. 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**. v. 13, p. 1-9, 2022.

RAPHAEL, I.; NALAWADE, S.; EAGAR, T.N.; FORSTHUBER, T.G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Cytokine**. v. 74(1), p. 5-17, 2015.

REHMAN, K.; FATIMA, F.; WAHEED, I.; AKASH, M.S.H. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. **J Cell Biochem**. v. 119(1), p. 157-184, 2018.

RICHARD, M.L.; SOKOL, H. The gut mycobiota: insights into analysis, environmental interactions and role in gastrointestinal diseases. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. v. 16(6), p. 331-345, 2019.

RICHENS, J.L.; URBANOWICZ, R.A.; METCALF, R.; CORNE, J.; O'SHEA, P.; FAIRCLOUGH, L. Quantitative validation and comparison of multiplex cytokine kits. **J Biomol Screen**. v. 15(5), p. 562-568, 2010.

RIZO-TÉLLEZ, S.A.; SEKHERI, M.; FILEP, J.G. Myeloperoxidase: Regulation of Neutrophil Function and Target for Therapy. **Antioxidants**. v. 11(11), p. 1-21, 2022.

ROBINSON, J.M.; TURKINGTON, S.; ABEY, S.A.; KENEA, N.; HENDERSON, W.A. Differential gene expression and gene-set enrichment analysis in Caco-2 monolayers during a 30-day timeline with Dexamethasone exposure. **Tissue Barriers**. v. 7(3), p. 1-18, 2019.

ROGLER, G.; SINGH, A.; KAVANAUGH, A.; RUBIN, D.T. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease: Current Concepts, Treatment,

and Implications for Disease Management. **Gastroenterology**. v. 161(4), p. 1118-1132, 2021.

ROSENTHAL, R.; MILATZ, S.; KRUG, S.M.; OELRICH, B.; SCHULZKE, J.D.; AMASHEH, S.; GÜNZEL, D.; FROMM, M. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. **J Cell Sci**. v. 123(11), p. 1913-1921, 2010.

SARTOR, R.B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol**. v. 3(7), p. 390-407, 2006.

SAYOC-BECERRA, A.; KRISHNAN, M.; FAN, S.; JIMENEZ, J.; HERNANDEZ, R.; GIBSON, K.; PRECIADO, R.; BUTT, G.; MCCOLE, D.F. The JAK-Inhibitor Tofacitinib Rescues Human Intestinal Epithelial Cells and Colonoids from Cytokine-Induced Barrier Dysfunction. **Inflamm Bowel Dis**. v. 26(3), p. 407-422, 2020.

SCALAVINO, V.; PICCINNO, E.; BIANCO, G.; SCHENA, N.; ARMENTANO, R.; GIANNELLI, G.; SERINO, G. The Increase of miR-195-5p Reduces Intestinal Permeability in Ulcerative Colitis, Modulating Tight Junctions' Expression. **Int J Mol Sci**. v. 23(10), p. 1-13, 2022.

SCALAVINO, V.; PICCINNO, E.; LACALAMITA, A.; TAFARO, A.; ARMENTANO, R.; GIANNELLI, G.; SERINO, G. miR-195-5p Regulates Tight Junctions Expression via Claudin-2 Downregulation in Ulcerative Colitis. **Biomedicines**. v. 10(4), p. 1-13, 2022.

SCHULTHEIS, P.J.; CLARKE, L.L.; MENETON, P.; MILLER, M.L.; SOLEIMANI, M.; GAWENIS, L.R.; RIDDLE, T.M.; DUFFY, J.J.; DOETSCHMAN, T.; WANG, T.; GIEBISCH, G.; ARONSON, P.S.; LORENZ, J.N.; SHULL, G.E. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. **Nat Genet**. v. 19(3), p. 282-285, 1998.

SCHUMANN, M.; GÜNZEL, D.; BUERGEL, N.; RICHTER, J.F.; TROEGER, H.; MAY, C.; FROMM, A.; SORGENFREI, D.; DAUM, S.; BOJARSKI, C.; HEYMAN, M.; ZEITZ, M.; FROMM, M.; SCHULZKE, J.D. Cell polarity-determining proteins Par-3 and PP-1 are involved in epithelial tight junction defects in coeliac disease. **Gut**. v. 61(2), p. 220-228, 2012.

SCRIBANO, M.L. Vedolizumab for inflammatory bowel disease: From randomized controlled trials to real-life evidence. **World J Gastroenterol**. v. 24(23), p. 2457-2467, 2018.

SIEW, C.N.G.; SHI, H.Y.; HAMIDI, N.; UNDERWOOD, F.E.; TANG, W.; BENCHIMOL, E.I.; PANACCIONE, R.; GHOSH, S.; WU, J.C.Y.; CHAN, F.K.L.; SUNG, J.J.Y.; KAPLAN, G.G. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **Lancet**. v. 390, p. 2769–2778, 2017.

SOUZA H. S. P.; FIOCCHI C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. **Gastroenterology and Hepatology**. v. 13, p. 13-27, 2016.

SPALINGER, M.R.; SAYOC-BECERRA, A.; ORDOOKHANIAN, C.; CANALE, V.; SANTOS, A.N.; KING, S.J.; KRISHNAN, M.; NAIR, M.G.; SCHARL, M.;

MCCOLE, D.F. The JAK Inhibitor Tofacitinib Rescues Intestinal Barrier Defects Caused by Disrupted Epithelial-macrophage Interactions. **J Crohns Colitis**. v. 15(3), p. 471-484, 2021.

STAPPENBECK, T.S.; VIRGIN, H.W. Accounting for reciprocal host-microbiome interactions in experimental science. **Nature**. v. 534(7606), p. 191-199, 2016.

STONE, M.J. Samuel Wilks: the "grand old man" of British medicine. **Proc (Bayl Univ Med Cent)**. v. 23(3), p. 263-265, 2010.

SUZUKI, T.; YOSHINAGA, N.; TANABE, S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. **J Biol Chem**. v. 286(36), p. 31263-31271, 2011.

SZANDRUK-BENDER, M.; WIATRAC, B.; DZIMIRA, S.; MERWID-LĄD, A.; SZCZUKOWSKI, Ł.; ŚWIĄTEK, P.; SZELĄG, A. Targeting Lineage-Specific Transcription Factors and Cytokines of the Th17/Treg Axis by Novel 1,3,4-Oxadiazole Derivatives of Pyrrolo[3,4-d]pyridazinone Attenuates TNBS-Induced Experimental Colitis. **Int J Mol Sci**. v. 23(17), p. 1-24, 2022.

TAMURA, A.; HAYASHI, H.; IMASATO, M.; YAMAZAKI, Y.; HAGIWARA, A.; WADA, M.; NODA, T.; WATANABE, M.; SUZUKI, Y.; TSUKITA, S. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. **Gastroenterology**. v. 140(3), p. 913-923, 2011.

TAMURA, A.; KITANO, Y.; HATA, M.; KATSUNO, T.; MORIWAKI, K.; SASAKI, H.; HAYASHI, H.; SUZUKI, Y.; NODA, T.; FURUSE, M.; TSUKITA, S.; TSUKITA, S. Megaintestine in claudin-15-deficient mice. **Gastroenterology**. v. 134(2), p. 523-534, 2008.

THOMSON, A.; SMART, K.; SOMERVILLE, M.S.; LAUDER, S.N.; APPANNA, G.; HORWOOD, J.; SUNDER RAJ, L.; SRIVASTAVA, B.; DURAI, D.; SCURR, M.J.; KEITA, A.V.; GALLIMORE, A.M.; GODKIN, A. The Ussing chamber system for measuring intestinal permeability in health and disease. **BMC Gastroenterol**. v. 19(1), p. 1-14, 2019.

TSUKITA, S.; TANAKA, H.; TAMURA, A. The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. **Trends Biochem Sci**. v. 44(2), p. 141-152, 2019.

TURNER, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nat Rev Immunol**. v. 9, p. 799-809, 2009.

UMEDA, K.; MATSUI, T.; NAKAYAMA, M.; FURUSE, K.; SASAKI, H.; FURUSE, M.; TSUKITA, S. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. **J Biol Chem**. v. 279(43), p. 44785-44794, 2004.

UNGARO, R.; MEHANDRU, S.; ALLEN, P.B.; PEYRIN-BIROULET, L.; COLOMBEL, J.F. Ulcerative colitis. **Lancet**. v. 389(10080), p. 1756-1770, 2017.

VALAPERTI, A.; BEZEL, P.; VONOW-EISENRING, M.; FRANZEN, D.; STEINER, U.C. Variability of cytokine concentration in whole blood serum and bronchoalveolar lavage over time. **Cytokine**. v. 123, p. 1-15, 2019.

- VALAPERTI, A.; LI, Z.; VONOW-EISENRING, M.; PROBST-MÜLLER, E. Diagnostic methods for the measurement of human TNF-alpha in clinical laboratory. **J Pharm Biomed Anal.** v. 179, p. 1-12, 2020.
- VALLI, A.; KUULIALA, K.; VIRTANEN, A.; KUULIALA, A.; PALMROTH, M.; PELTOMAA, R.; VIDQVIST, K.L.; LEIRISALO-REPO, M.; SILVENNOINEN, O.; ISOMÄKI, P. Tofacitinib treatment modulates the levels of several inflammation-related plasma proteins in rheumatoid arthritis and baseline levels of soluble biomarkers associate with the treatment response. **Clin Exp Immunol.** v. 210(2), p. 141-150, 2022.
- VAN ITALLIE, C.M.; FANNING, A.S.; HOLMES, J.; ANDERSON, J.M. Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. **J Cell Sci.** v. 123(16), p. 2844-2852, 2010.
- VASILEVA, E.; SPADARO, D.; ROUAUD, F.; KING, J.M.; FLINOIS, A.; SHAH, J.; SLUYSMANS, S.; MÉAN, I.; JOND, L.; TURNER, J.R.; CITI, S. Cingulin binds to the ZU5 domain of scaffolding protein ZO-1 to promote its extended conformation, stabilization, and tight junction accumulation. **J Biol Chem.** v. 298(4), p. 1-16, 2022.
- VERSTOCKT, B.; BRESSLER, B.; MARTINEZ-LOZANO, H.; MCGOVERN, D.; SILVERBERG, M.S. **Gastroenterology.** v. 162, p. 1370–1382, 2022.
- VIRTANEN, A.; HAIKARAINEN, T.; RAIVOLA, J.; SILVENNOINEN, O. Selective JAKinibs: Prospects in Inflammatory and Autoimmune Diseases. **BioDrugs.** v. 33(1), p. 15-32, 2019.
- WEAVER, K.N.; GREGORY, M.; SYAL, G.; HOVERSTEN, P.; HICKS, S.B.; PATEL, D.; CHRISTOPHI, G.; BENIWAL-PATEL, P.; ISAACS, K.L.; RAFFALS, L.; DEEPAK, P.; HERFARTH, H.H.; BARNES, E.L. Ustekinumab Is Effective for the Treatment of Crohn's Disease of the Pouch in a Multicenter Cohort. **Inflamm Bowel Dis.** v. 25(4), p. 767-774, 2019.
- WEBER, C.R.; LIANG, G.H.; WANG, Y.; DAS, S.; SHEN, L.; YU, A.S.; NELSON, D.J.; TURNER, J.R. Claudin-2-dependent paracellular channels are dynamically gated. **Elife.** v. 4, p. 1-20, 2015.
- WEBER, C.R.; RALEIGH, D.R.; SU, L.; SHEN, L.; SULLIVAN, E.A.; WANG, Y.; TURNER, J.R. Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity. **J Biol Chem.** v. 285(16), p. 12037-12046, 2010.
- WEI, M.; ZHANG, Y.; YANG, X.; MA, P.; LI, Y.; WU, Y.; CHEN, X.; DENG, X.; YANG, T.; MAO, X.; QIU, L.; MENG, W.; ZHANG, B.; WANG, Z.; HAN, J. Claudin-2 promotes colorectal cancer growth and metastasis by suppressing NDRG1 transcription. **Clin Transl Med.** v. 11(12), p. 1-16, 2021.
- WILKS, S. Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes. **Med Times Gazette,** v. 2 (2), p. 264-265, 1859.
- WINTJENS, D.S.J.; DE JONG, M.J.; VAN DER MEULEN-DE JONG, A.E.; ROMBERG-CAMPS, M.J.; BECX, M.C.; MALJAARS, J.P.; VAN BODEGRAVEN, A.A.; MAHMMOD, N.; MARKUS, T.; HAANS, J.; MASCLEE, A.A.M.; WINKENS, B.; JONKERS, D.M.A.E.; PIERIK, M.J. Novel perceived

stress and life events precede flares of inflammatory bowel disease: a prospective 12-month follow-up study. **J Crohns Colitis**. v. 13(4), p. 410–416, 2019.

WU, F.; CHAKRAVARTI, S. Differential expression of inflammatory and fibrogenic genes and their regulation by NF-kappaB inhibition in a mouse model of chronic colitis. **J Immunol**. v. 179(10), p. 6988-7000, 2007.

YAMAMOTO, S.; MA, X. Role of Nod2 in the development of Crohn's disease. **Microbes Infect**. v. 11(12), p. 912-918, 2009.

YESHI, K.; RUSCHER, R.; HUNTER, L.; DALY, N.L.; LOUKAS, A.; WANGCHUK, P. Revisiting Inflammatory Bowel Disease: Pathology, Treatments, Challenges and Emerging Therapeutics Including Drug Leads from Natural Products. **J Clin Med**. v. 9(5), p. 1-39, 2020.

ZEISSIG, S.; BÜRCEL, N.; GÜNZEL, D.; RICHTER, J.; MANKERTZ, J.; WAHNSCHAFFE, U.; KROESEN, A.J.; ZEITZ, M.; FROMM, M.; SCHULZKE, J.D. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. **Gut**. v. 56(1), p. 61-72, 2007.

ZHA, Z.X.; LIN, Y.; WANG, K.X.; ZHANG, Y.L.; LI, D.; XU, G.Q.; XU, Q.M.; LIU, Y.L. Hederacoside C ameliorates colitis via restoring impaired intestinal barrier through moderating S100A9/MAPK and neutrophil recruitment inactivation. **Acta Pharmacol Sin**. v. 44(1), p. 105-119, 2023.

ZHAO, M.; GÖNCZI, L.; LAKATOS, P.L.; BURISCH, J. The Burden of Inflammatory Bowel Disease in Europe in 2020. **J Crohns Colitis**. v. 15(9), p. 1573-1587, 2021.

Anexos

Anexo 1: Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFC.



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito anti-inflamatório e antioxidante do inibidor de JAK, Tofacitinibe, no modelo de colite experimental induzida por TNBS em ratos.", protocolada sob o CEUA nº 4082010222 (ID 002139), sob a responsabilidade de **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza e equipe; Humberto Barbosa da Costa Filho** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 23/03/2022.

We certify that the proposal "Anti-inflammatory and antioxidant effect of the JAK-inhibitor, Tofacitinib, in the rat model of experimental colitis induced by TNBS.", utilizing 240 Heterogenics rats (240 males), protocol number CEUA 4082010222 (ID 002139), under the responsibility of **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza and team; Humberto Barbosa da Costa Filho** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 03/23/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [04/2022](#) a [04/2026](#) Área: [Departamento de Medicina Clínica](#)

Origem: [Biotério Prof. Eduardo Torres \(setorial FAMED\)](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#) sexo: [Machos](#) idade: [5 a 6 semanas](#) N: [240](#)

Linhagem: [Wistar](#) Peso: [160 a 180 g](#)

Local do experimento: Todos os procedimentos experimentais serão realizados no Laboratório de Estudos da Fisiofarmacologia Gastrointestinal (LEFFAG).

Fortaleza, 23 de fevereiro de 2023

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará