

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, ECOLOGIA E EVOLUÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



**EFEITOS DO SIMBIÓTICO *Lactobacillus delbrueckii*  
CIDCA133 e FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS) EM  
MODELO ANIMAL DE MUCOSITE INTESTINAL  
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**

**ORIENTADA: Laísa Macedo Tavares**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**

**COORIENTADORAS: Prof. Dra. Pamela Mancha Agresti e Prof. Dra. Mariana Martins Drumond**

BELO HORIZONTE

2021

**LAÍSA MACEDO TAVARES**

**EFEITOS DO SIMBIÓTICO *Lactobacillus delbrueckii*  
CIDCA133 e FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS) EM  
MODELO ANIMAL DE MUCOSITE INTESTINAL  
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de mestre em Genética pelo Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Coorientadoras: Prof. Dra. Pamela Mancha Agresti e Prof. Dra. Mariana Martins Drumond.

BELO HORIZONTE

2021

043

Tavares, Laísa Macedo.

Efeitos do simbiótico *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA133 e Fruto-oligossacarídeos (FOS) na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil em modelo animal [manuscrito] / Laísa Macedo Tavares. - 2021.

97 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo. Co-orientadoras: Prof. Dra. Pamela Mancha Agresti e Prof. Dra. Mariana Martins Drumond.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Mucosite. 3. Fluoruracila. 4. Oligossacarídeos. 5. *Lactobacillus delbrueckii*. 6. Simbióticos. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Agresti, Pamela Mancha. III. Drumond, Mariana Martins. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
Programa de Pós-Graduação em Genética

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**"EFEITOS DO SIMBIÓTICO *Lactobacillus Delbrueckii* CIDCA133 e FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS) NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM MODELO ANIMAL"**

**Laísa Macedo Tavares**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo  
UFMG

Ana Maria Caetano de Faria  
UFMG

Valbert Nascimento Cardoso  
UFMG

Adriano Gomes da Cruz  
IFRJ

Dan Waitzberg  
USP

Belo Horizonte, 30 de abril de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 30/04/2021, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Dan Linetzky Waitzberg, Usuário Externo**, em 01/05/2021, às 20:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0699678** e o código CRC **61725804**.

---

Referência: Processo nº 23072.221962/2021-95

SEI nº 0699678

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Instituto de Ciências Biológicas e todos os seus funcionários.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vasco Azevedo que me abriu as portas do seu laboratório e me deu grandes oportunidades.

Às minhas co-orientadoras Prof. Dra. Pamela Agresti e Prof. Dra. Mariana Drumond por todos os ensinamentos, correções, puxões de orelha e por me guiarem durante a execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, às secretárias, por toda ajuda quando solicitadas e aos docentes do programa, pelo conhecimento compartilhado e por serem grandes inspirações.

À todos os integrantes do LGCM, em especial aos amigos Luís, Tales, Viviane, Nina, Fernanda, Monique e Giovanna, agradeço por toda a ajuda, companheirismo e parceria, sem vocês este trabalho não existiria.

Aos alunos de Iniciação Científica que passaram pelo LGCM nestes últimos dois anos e foram suporte para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Enio Ferreira, pela colaboração nas análises histológicas e por todas as conversas inspiradoras.

Ao Laboratório de Agentes Bioterapêuticos por toda ajuda com equipamentos, em especial ao doutorando Bruno, por toda a paciência e auxílio.

Ao Laboratório de Radioisótopos, em especial a aluna de doutorado Katia, pela colaboração na análise de permeabilidade intestinal.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite para avaliar este trabalho.

À Mariana, pelo seu companheirismo, caronas até o ICB e conversas.

Aos amigos Karen e Roberto, pela amizade construída e por serem pessoas incríveis que eu pude sempre contar quando precisei.

À minha família, por ser meu pilar, em especial aos meus pais, Kalina e Luciano por todo o suporte, apoio e compreensão.

Ao meu namorado, Luan, por sempre me incentivar e me apoiar.

## RESUMO

A mucosite intestinal é um efeito citotóxico resultante da terapia com agentes quimioterápicos, como o 5-Fluorouracil, caracterizada por uma lesão inflamatória ulcerativa que afeta principalmente células do trato gastrointestinal, sendo um problema grave na clínica médica. Entre as estratégias terapêuticas que visam minimizar este efeito colateral destacam-se o consumo de bactérias probióticas, prebióticos e simbióticos (combinação de probióticos com prebióticos), devido a seus efeitos benéficos ao organismo. Nesse trabalho foi investigado o efeito preventivo do simbiótico *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 associado aos Fruto-oligossacarídeos (FOS) contra danos epiteliais ocasionados em camundongos BALB/c, machos, pela administração do quimioterápico 5-FU (300mg/kg). Os animais foram alocados nos seguintes grupos: Controle (sem mucosite + solução salina), MUC (com mucosite + solução salina), BAC (com mucosite + CIDCA133), FOS (com mucosite + FOS), Controle SIM (sem mucosite + simbiótico), SIM (com mucosite + simbiótico). Foram utilizadas duas abordagens, na primeira os animais foram tratados por gavagem com  $1,2 \times 10^9$  UFC/mL de CIDCA 133 e/ou 6% de FOS e na segunda, os animais foram tratados por *continuous feeding* com CIDCA 133 e/ou FOS. Ambas abordagens ocorreram do dia 1 ao dia 12. No dia 10, foi induzida a mucosite através da injeção intraperitoneal de 300mg/kg de 5-FU. Os animais que receberam tratamento por *continuous feeding* apresentaram redução da permeabilidade intestinal com preservação parcial da arquitetura intestinal em relação ao grupo MUC. Foi possível observar aumento das atividades de MPO e EPO no grupo MUC em relação aos demais grupos; o simbiótico foi capaz de prevenir o infiltrado inflamatório quando administrado por *continuous feeding*. Os animais do grupo SIM CTL apresentaram maior secreção de IgA quando comparado com os demais grupos. Animais deste grupo, simbiótico, apresentaram níveis aumentados da regulação da expressão gênica de Il1b, Il6, Il12 e Tnf. Na abordagem por gavagem, a análise de expressão gênica mostrou que o simbiótico foi capaz de preservar a expressão de ocludina, Tlr2 e Tlr4 a níveis fisiológicos; já a expressão gênica de Il12 não apresentou diferença entre os grupos e a expressão de Il1b e Tnf apresentaram níveis fisiológicos no simbiótico. O tratamento por *continuous feeding* promoveu efeitos benéficos sobre a mucosite intestinal, mostrando ser eficaz.

**Palavras-chave:** Mucosite intestinal; 5-fluorouracil; Fruto-oligossacarídeos; *Lactobacillus delbrueckii*; Simbiótico.

## ABSTRACT

Intestinal mucositis is a cytotoxic effect resulting from therapy with chemotherapeutic agents, such as 5-Fluorouracil, characterized by an ulcerative inflammatory lesion that mainly affects the gastrointestinal tract cells, is a severe problem in the medical clinic. Among the therapeutic strategies that aim to minimize this side effect is the consumption of probiotic, prebiotic, and synbiotic bacteria (combination of probiotics with prebiotics) due to their beneficial effects on the body. In this work, the preventive effect of the symbiotic *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 was investigated in association with Fructo-oligosaccharides (FOS) against epithelial damage caused in BALB/c mice by the administration of the chemotherapy 5-FU (300mg / Kg). Male BALB/c mice allocated to the groups: Control (without mucositis + saline), MUC (with mucositis + saline), BAC (with mucositis + CIDCA133), FOS (with mucositis + FOS), SYN Control (without mucositis + synbiotic), SYN (with mucositis + synbiotic). Two approaches were used. Part I - animals treated by gavage with  $1.2 \times 10^9$  CFU / mL of CIDCA 133 and / or 6% of FOS Part II - animals treated by continuous feeding with CIDCA 133 and / or FOS, both approaches occurred on day 1 to day 12. On day 10, the animals (part I and II) received 300 mg/kg of 5-FU intraperitoneally. The animals that received continuous feeding treatment showed a reduction in intestinal permeability with partial preservation of the MUC group's intestinal architecture. It was possible to observe an increase in MPO and EPO activities in the MUC group about the other groups; the synbiotic was able to prevent the inflammatory infiltrate when administered by continuous feeding. The animals in the SIM CTL group showed higher secretion of sIgA when compared to the other groups. Animals in this synbiotic group showed increased levels of gene expression regulation of Il1b, Il6, Il12, and Tnf. In the gavage approach, gene expression analysis showed that the synbiotic was able to preserve the expression of occludin, Tlr2, and Tlr4 at physiological levels; the gene expression of Il12 showed no difference between the groups, and the expression of Il1b and Tnf showed physiological levels in the synbiotic. Continuous feeding treatment promoted beneficial effects on intestinal mucositis, proving to be effective.

**Keywords:** Intestinal mucositis; 5-fluorouracil; Fructo-oligosaccharides; *Lactobacillus delbrueckii*; Synbiotic

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da barreira intestinal e seus componentes.....	15
Figura 2. Representação esquemática da estrutura química do 5-fluorouracil. ....	17
Figura 3. Representação esquemática dos mecanismos de ação do quimioterápico 5-FU.....	18
Figura 4. Representação esquemática das cinco fases de desenvolvimento da mucosite intestinal:Iniciação, Resposta a danos primários e amplificação de sinais (representadas em um mesmo momento), Ulceração e Cicatrização. ....	20
Figura 5. Diferentes mecanismos de ação dos prebióticos. ....	22
Figura 6. Estrutura química do FOS.....	23
Figura 7. Principais mecanismos de ação propostos para bactérias probióticas no TGI humano.....	26
Figura 8. Delineamento experimental via de administração gavagem.....	37
Figura 9. Curva de crescimento de CIDCA133 (A) e Número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de CIDCA 133.....	43
Figura 10. Variação de peso antes (A) e após (B) a indução da mucosite intestinal com 5-FU. ....	44
Figura 11. Variação dos consumos alimentar e hídrico antes da indução da mucosite intestinal com 5-FU (A e C) e após a indução da mucosite intestinal com 5-FU (B e D). ....	45
Figura 12. Análise histológica e morfométrica do íleo dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados CIDCA133, FOS e simbiótico (gavagem). ....	46
Figura 13. Efeito da administração CIDCA 133, FOS e do simbiótico (gavagem) no escore histológico. ....	47
Figura 14. Efeito da administração CIDCA 133, FOS e do simbiótico (gavagem) na análise morfométrica.....	47
Figura 15. Efeito da administração, por gavagem, de CIDCA 133, FOS e do simbiótico no comprimento intestinal. ....	48
Figura 16. Efeito da administração do simbiótico, por gavagem, sobre o índice visceral de inflamação em animais com mucosite intestinal.....	49
Figura 17. Efeito da administração, por gavagem, de CIDCA 133, FOS e do simbiótico no infiltrado inflamatório no íleo de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e seus respectivos controles experimentais.....	49

Figura 18. Efeito da administração, por gavagem, de CIDCA 133, FOS e simbiótico na expressão gênica relativa de Il1b, Il6, Il10, Il12 e Tnf no íleo de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e seus respectivos controles experimentais. ....	50
Figura 19. Delineamento experimental pela via de administração <i>continuous feeding</i> .54	
Figura 20. Cinética de crescimento de CIDCA133 em meio MRS convencional (GLI) e meio MRS modificado sem glicose e suplementado com FOS (A) e Número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de CIDCA 133 crescida em meio modificado com FOS (B). ....	58
Figura 21. Variação de peso antes (A) e depois (B) da indução da mucosite com 5-FU. ....	59
Figura 22. Variação dos consumos alimentar e hídrico antes da indução da mucosite intestinal (A e C) e após a indução da mucosite intestinal com 5-FU (B e D). ....	60
Figura 23. Efeito da administração por <i>continuous feeding</i> de CIDCA 133, FOS e do simbiótico na permeabilidade intestinal 72 horas após a indução da mucosite. ....	61
Figura 24. Análise histológica e morfométrica do íleo dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados CIDCA133, FOS e simbiótico por <i>continuous feeding</i> . ....	62
Figura 25. Efeito da administração por <i>continuous feeding</i> de CIDCA 133, FOS e do simbiótico no escore histológico. ....	63
Figura 26. Efeito da administração por <i>continuous feeding</i> de CIDCA 133, FOS e do simbiótico na análise morfométrica. ....	64
Figura 27. Efeito da administração por <i>continuous feeding</i> de CIDCA 133, FOS e do simbiótico na avaliação do comprimento intestinal. ....	64
Figura 28. Efeito da administração por <i>continuous feeding</i> de CIDCA 133, FOS e do simbiótico na avaliação do índice do baço. ....	65
Figura 29. Efeito da administração por <i>continuous feeding</i> de CIDCA 133, FOS e do simbiótico no infiltrado inflamatório no íleo de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e seus respectivos controles experimentais. ....	66
Figura 30. Efeito da administração por <i>continuous feeding</i> de CIDCA 133, FOS e do simbiótico na dosagem de slgA intestinal. ....	67
Figura 31. Efeito da administração por <i>continuous feeding</i> de CIDCA 133, FOS e do simbiótico na expressão gênica de Il10, IL1b, Il6, Il12, Tnf e Tgfb no íleo. ....	68
Figura 32. Efeito da administração por <i>continuous feeding</i> de CIDCA 133, FOS e do simbiótico na expressão gênica de Muc2 e Occludin no íleo de animais inflamados com 5-FU ....	69
Figura 33. Efeito da administração por <i>continuous feeding</i> de CIDCA 133, FOS e do simbiótico na expressão gênica de Tlr2 e Tlr4 no íleo. ....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais e tratamentos realizados.....	36
Tabela 2. Escore histológico para avaliação da secção ileal dos animais submetidos a diferentes tratamentos experimentais. ....	38
Tabela 3. Primers utilizados para o PCR em tempo real (qPCR) – parte I .....	42
Tabela 4. Grupos experimentais e tratamentos realizados por <i>continuous feeding</i> .....	54
Tabela 5. Primers utilizados para o PCR em tempo real (qPCR) – Parte II.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®	Marca registrada
5-FU	5-fluorouracil
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAC	Bactéria
CEBIO	Centro de Bioterismo
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CIDCA 133	Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis CIDCA 133
cpm	Contagem por minuto
CTL	Controle
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FdUMP	Fluorodeoxiuridina monofosfato
FdUTP	Fluorodeoxiuridina trifosfato
FOS	Fruto-oligossacarídeos
FUTP	5 fluoroudina trifosfato
g	Gramas
Gapdh	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GALT	Tecido linfóide associado ao tratogastrointestinal
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
i.p	Injeção intraperitoneal
IgA	Imonoglobulina A
Il	Interleucina
kDa	Kilodalton
Kg	Kilograma
M	Molar
MBq	Megabecquerel
mL	Mililitro
mM	milimolar
MOS	Manooligossacarídeos
MRS	Meio de cultura de Man, Rosoga e Sharpe
MUC	Mucosite
Muc2	Mucina 2
Nfkb	Fator nuclear – Kappa B
Nos 2	Atividade de óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	O-fenilendiamina
PBS	Solução de Tampão Fosfato
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
SIM	Simbiótico
TGI	Trato Gastrointestinal

<b>Tlr</b>	Receptores <i>Toll-like</i>
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TNF</b>	Fator de Necrose Tumoral
<b>TOS</b>	Trans-galacto-oligossacarídeo
<b>U</b>	Unidade
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de colônia
<b>XOS</b>	Xilooligossacarídeos
<b>µL</b>	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1 Mucosa Gastrointestinal	14
1.2 Quimioterápico (5-FU)	16
1.3 A Mucosite Intestinal	19
1.4 Prebióticos	20
1.4.1 Fruto-oligossacarídeos	23
1.5 Probiótico	24
1.5.1 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. lactis CIDCA 133	27
1.6 Simbióticos	28
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>31</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
<b>PARTE I - GAVAGEM</b>	
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
4.1 Linhagem bacteriana, condições de cultivo e estocagem	34
4.2 Curva de crescimento de CIDCA 133	34
4.3 Preparação das doses	34
4.4 Preparação do Prebiótico	35
4.5 Animais	35
4.6 Delineamento experimental e Indução da mucosite por 5-FU	36
4.7 Análises	37
4.7.1 Consumo alimentar/hídrico e variação ponderal	37
4.7.2 Análise do comprimento intestinal e índice de inflamação visceral	37
4.7.3 Análise Histológica	37
4.7.4 Análise do infiltrado inflamatório por meio das atividades enzimáticas de mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO)	38
4.7.5 Análise da expressão gênica relativa	40
4.7.5.1 Extração do RNA	40
4.7.5.2 Síntese cDNA	41
4.7.5.3 Amplificação do cDNA por PCR em tempo real	41
4.7.8 Análise Estatística	42
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>42</b>
5.1 Curva de crescimento CIDCA133 e número de unidades formadoras de colônias (UFC)	42

5.2 Consumo do Simbiótico, por gavagem, não influencia na perda de peso nem nos consumos alimentar e hídrico de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	43
5.3 O consumo de simbiótico por gavagem não foi capaz de melhorar os parâmetros histopatológicos no íleo de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	45
5.4 O consumo de simbiótico por gavagem não influencia no comprimento intestinal e no índice de inflamação de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU...	48
5.5 O consumo do simbiótico, por gavagem, não influencia no infiltrado inflamatório em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	49
5.6 Consumo de Simbiótico, por gavagem, reduz a expressão gênica de <i>Il1b</i> .....	50

## **PARTE II - CONTINUOUS FEEDING**

<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>52</b>
4.1 Linhagem bacteriana, condições de cultivo e estocagem.....	52
4.2 Prebiótico.....	52
4.3 Curva de crescimento de CIDCA 133 em meio de crescimento com Glicose x meio de crescimento com FOS.....	52
4.4 Animais.....	53
4.5 Delineamento experimental e Indução da mucosite intestinal por 5-FU.....	53
4.6 Análises.....	54
4.6.1 Consumo alimentar/hídrico e variação ponderal.....	54
4.6.2 Análise do comprimento intestinal e taxa de inflamação visceral.....	54
4.6.3 Análise Histológica.....	54
4.6.4 Análise do infiltrado inflamatório por meio da atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO).....	55
4.6.5 Análise da expressão gênica relativa de marcadores inflamatórios.....	55
4.6.5.1 Extração do RNA.....	55
4.6.5.2 Síntese cDNA.....	55
4.6.5.3 Amplificação do cDNA por PCR em tempo real.....	55
4.6.6 Permeabilidade Intestinal.....	56
4.6.7 Dosagem de sIgA.....	56
4.6.9 Análise Estatística.....	57
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
5.1 Cinética de crescimento de CIDCA 133 influenciada por FOS.....	57
5.2 Consumo de Simbiótico por <i>continuous feeding</i> não influencia na perda de peso e no consumo alimentar de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	58
5.3 Consumo de Simbiótico por <i>continuous feeding</i> atenua o aumento da permeabilidade intestinal de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU....	60
5.4 Consumo de Simbiótico por <i>continuous feeding</i> melhora os aspectos histopatológicos de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	61

5.5 Consumo de Simbiótico administrado por <i>continuous feeding</i> previne o encurtamento do intestino delgado de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	64
5.6 Consumo de Simbiótico por <i>continuous feeding</i> reduz o infiltrado inflamatório em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	65
5.7 Consumo de Simbiótico por <i>continuous feeding</i> não reduz os níveis de IgA secretória (sIgA) de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	66
5.9 Consumo de Simbiótico por <i>continuous feeding</i> aumenta a expressão gênica de <i>Il10</i> e reduz a expressão gênica de <i>Tnf</i> e <i>Tgfb</i> em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	67
5.10 Consumo de Simbiótico por <i>continuous feeding</i> aumenta a expressão gênica de <i>Ocludina</i> em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	68
5.11 Consumo de Simbiótico por <i>continuous feeding</i> foi capaz de prevenir o aumento da expressão gênica de <i>Tlr2</i> em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	69
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>8 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>94</b>

## 1. INTRODUÇÃO

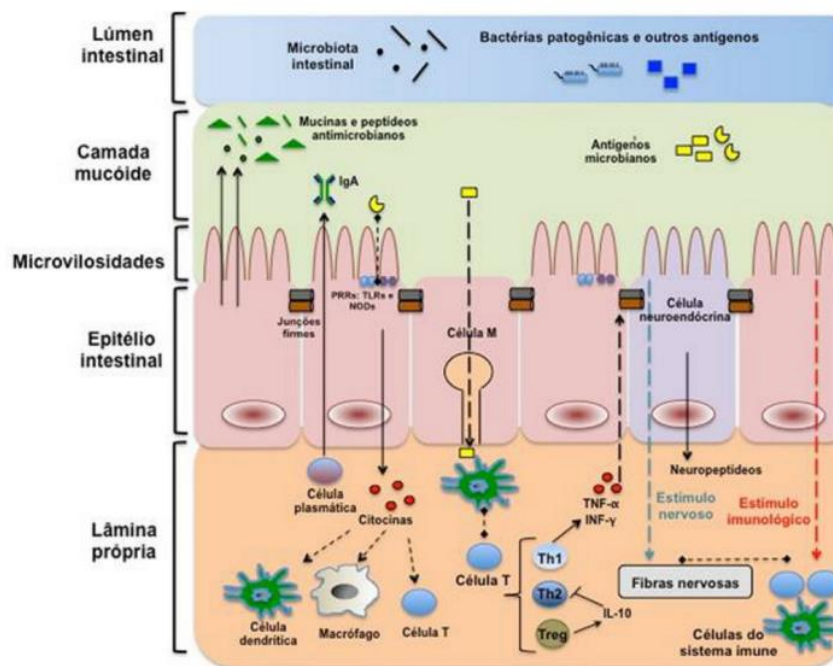
### 1.1 Mucosa Gastrointestinal

A mucosa do trato gastrointestinal (TGI) consiste em um dos principais sítios de interação entre o ambiente externo e os tecidos do hospedeiro, tendo a capacidade de defender o organismo contra agentes externos potencialmente prejudiciais. Um dos principais pontos de interação entre o organismo e o ambiente são as superfícies de mucosas, como as do TGI, do sistema respiratório e do sistema genitourinário. As mucosas compartilham uma organização anatômica básica e estão envolvidas por uma grande e frágil barreira epitelial que as separam do ambiente externo e que tem a função de prevenir a invasão microbiana. Dessa forma, as próprias características que conferem atividades fisiológicas na mucosa, como a absorção, também conferem vulnerabilidade à invasão e infecção patogênicas. Assim, as mucosas são protegidas por um importante e especializado sistema imune inato e adaptativo denominado sistema imune de mucosas (Holmgren and Czerkinsky, 2005; Hardy et al., 2013).

A grande maioria das células próximas ao lúmen intestinal são enterócitos absorptivos (adaptados principalmente para as funções metabólica e digestiva), organizados anatomicamente entre vilosidades e criptas (Abbas et al., 2012), (Franco-Robles and López, 2015).

Além disso, na camada epitelial também podem ser visualizadas as células caliciformes (células secretoras de mucinas, um dos principais componentes da camada de muco), células de Paneth (células que secretam peptídeos antimicrobianos, como as defensinas) e células enteroendócrinas, que regulam o intestino pela produção de hormônios peptídicos, como a gastrina (Marshman et al., 2002; Salvo Romero et al., 2015).

A camada de muco, rica em peptídeos antimicrobianos e IgA secretória, forma a primeira linha de defesa do organismo contra a invasão de microrganismos e antígenos externos. As mucinas, uma família de proteínas de alto peso molecular que são secretadas constitutivamente por células caliciformes em todo o epitélio intestinal, são os principais componentes da camada de muco (Gendler and Spicer, 1995; Van Tassell and Miller, 2011; Peterson and Artis, 2014), sendo a mucina 2 (MUC2) a proteína mais abundante na superfície intestinal (Camalleri et al., 2012) (Figura 1). Além disso, as mucinas estão envolvidas na proliferação celular e na inibição da apoptose (Thorpe, 2019).



**Figura 1. Representação esquemática da estrutura da barreira intestinal e seus componentes.**

A mucosa intestinal compreende uma camada de células epiteliais e uma região subepitelial que contém a lâmina própria, o tecido conjuntivo e as camadas musculares. O epitélio inclui enterócitos, células caliciformes, células de Paneth, células enteroendócrinas e células-tronco intestinais. Acima da barreira epitelial encontra-se a camada de muco, a microbiota e as moléculas de IgA secretória. Subjacente à camada epitelial encontra-se a lâmina própria constituída de macrófagos, células dendríticas, plasmócitos e neutrófilos.

**Fonte:** Rodrigues et al., (2016).

Embora a maioria das células da camada epitelial seja formada por enterócitos (cerca de 80%) (Salvo-Romero et al., 2015), outras células que merecem destaque são as que compõem o tecido linfóide associado ao TGI (GALT, do inglês, *Gut associated lymphoid tissue*), que apresenta como componentes os linfócitos intraepiteliais, linfócitos T, células M (do inglês, *microfold cells*), células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos, por exemplo), que são as responsáveis pelas principais interações imunológicas do organismo contra patógenos e também com a própria microbiota intestinal do indivíduo (Peterson and Artis, 2014).

A composição da microbiota intestinal está em constante alteração sob a influência de fatores como dieta, medicamentos ingeridos, mucosa intestinal, sistema imunológico e a própria microbiota e, variações naturais na mesma podem levar a um estado de disbiose. Os mecanismos subjacentes à disbiose intestinal ainda são desconhecidos, uma vez que combinações de variações naturais e fatores de estresse medeiam diversos mecanismos desestabilizadores. Uma infinidade de doenças, incluindo doenças inflamatórias do intestino e distúrbios metabólicos, como obesidade e diabetes tipo II, estão associados à disbiose intestinal (Weiss and Hennek, 2017).

Deve-se destacar também que as células epiteliais intestinais se encontram conectadas de forma adjacente pelas proteínas de junções firmes (*Tight junctions*), que funcionam como uma barreira entre as células epiteliais adjacentes, impedindo a passagem paracelular de agentes exógenos mantendo, dessa forma, a permeabilidade intestinal em níveis fisiológicos, sem nenhum tipo de comprometimento ao organismo. Essa barreira é formada por um complexo de multiproteínas transmembranares, no qual se destacam a ocludina, claudinas, moléculas de adesão e zonulinas (Rao and Samak, 2013; Andrade et al., 2015).

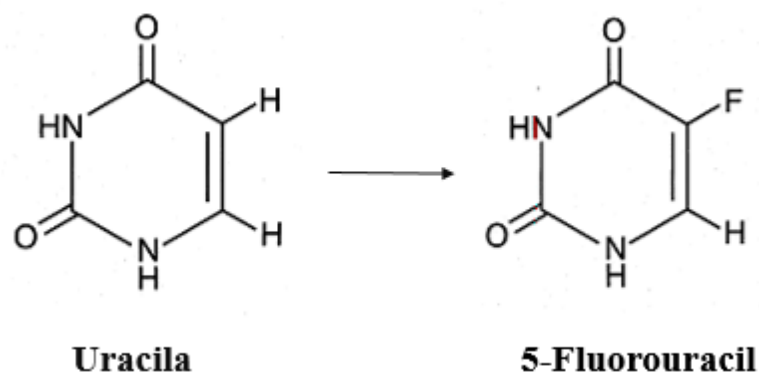
No entanto quando ocorrem quadros inflamatórios crônicos, como as doenças inflamatórias intestinais, a desregulação dessas interações leva a rearranjos do citoesqueleto das células epiteliais intestinais, que rompem as junções firmes e aumentam a permeabilidade intestinal (Blair et al., 2006; Alenghat et al., 2013).

No entanto, mesmo apresentando propriedades funcionais e homeostáticas ao organismo, devido a sua elevada taxa de renovação celular realizada pelas células estaminais, o TGI é susceptível à terapia oncológica. O arsenal terapêutico mais utilizado no tratamento de neoplasias inclui oxaliplatina, irinotecano, capecitabina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracil (5-FU) e FOLFIRI (uma associação de 5-FU, irinotecano e leucovorina), entre outros (Nussbaumer et al., 2011; Cassidy and Syed, 2017; Guichard et al., 2017). Esses medicamentos apresentam um amplo espectro de efeitos citotóxicos, sendo a mucosite intestinal um dos principais efeitos colaterais reportados. (Yu, 2013).

## **1.2 Quimioterápico (5-FU)**

O 5-FU é uma fluoropirimidina (que atua como antimetabólito) preparado a partir da substituição, no carbono 5, de um átomo de hidrogênio por um átomo de flúor (Figura 2), sendo amplamente utilizado como arsenal terapêutico contra tumores malignos, (Longley et al., 2003; Logan et al., 2009). Desenvolvido na década de 1950 e introduzido na terapia do câncer para inibir a divisão celular e a proliferação de células cancerígenas, tem sido usado principalmente no tratamento de diferentes cânceres, como por exemplo o colorrectal, mama e estômago (Longley et al., 2003; Martins et al., 2013; Cassidy et al., 2017; Guichard et al., 2017). Segundo a OMS, estas neoplasias juntas foram responsáveis por cerca de 2,2 milhões de mortes em 2018, sendo o câncer colorretal responsável por 862.000 mortes, estômago por 783.000 mortes, e o câncer de mama ocasionando 627.000 mortes (OMS, 2018).

Drogas antineoplásicas funcionam inibindo processos essenciais de biossíntese ou funcionalidade ao serem incorporadas em macromoléculas como o RNA e DNA, (Sonis, 2004).

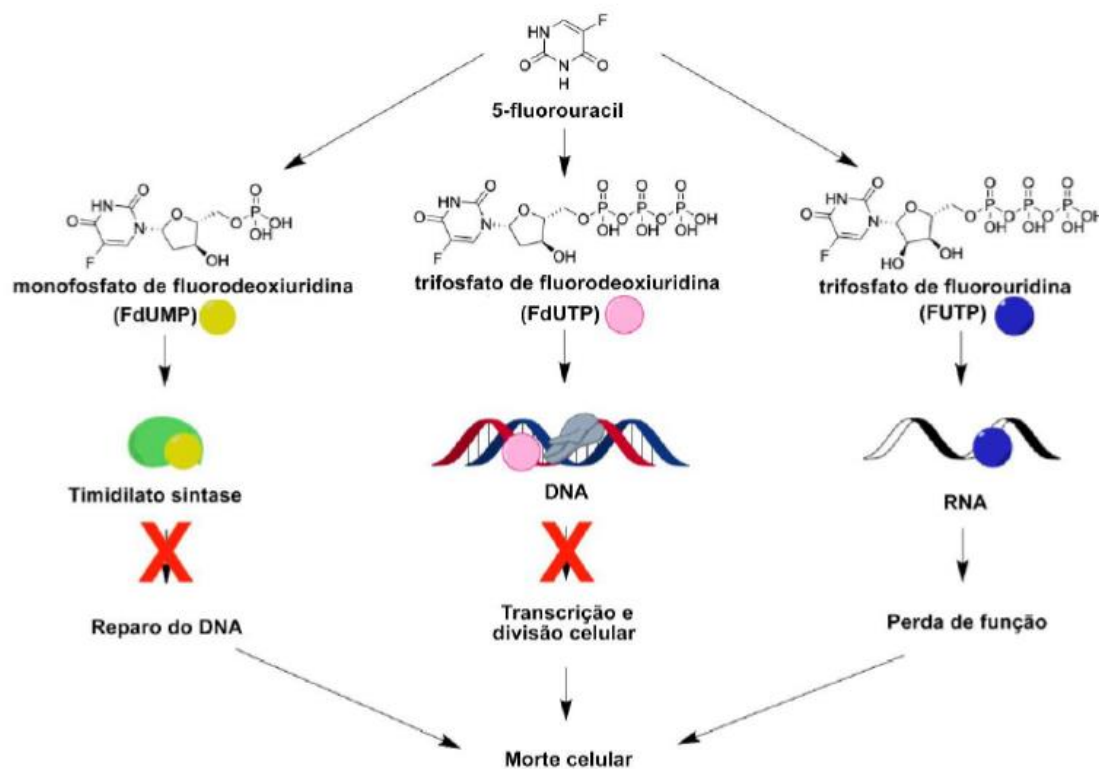


**Figura 2. Representação esquemática da estrutura química do 5-fluorouracil.**

5-fluorouracil possui um átomo de flúor no carbono cinco da molécula de uracila, no lugar do hidrogênio.

**Fonte:** Adaptada de Longley et al., (2003)

Para controlar a proliferação anormal de células cancerígenas, o 5-FU entra nas células através de transporte facilitado e seu efeito citotóxico é causado pela sua conversão intracelular em metabólitos ativos, os quais incluem-se: 5-fluoro-2'-deoksiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), fluorodeoksiuridina trifosfato (FdUTP) e fluorotrifosfato (FUTP) (Figura 3). O FdUMP inibe a atividade da enzima timidilato sintase, causando um desequilíbrio no pool de nucleotídeos, consequentemente, diminuindo a concentração dos desoxinucleotídeos dTTP e dATP, essenciais para a síntese e o reparo do DNA; o FdUTP se liga à estrutura do DNA, inibindo sua síntese e bloqueando a divisão celular e o FUTP pode ser incorporado ao RNA prejudicando sua composição, levando à perda funcional e morte celular (Longley et al., 2003; Zhang et al., 2008; Miura et al., 2010).



**Figura 3. Representação esquemática dos mecanismos de ação do quimioterápico 5-FU.** Ao entrar na célula o 5-FU é metabolizado e convertido em três principais metabólitos ativos: fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) e 5-fluorouridina trifosfato (FUTP). FdUMP se liga à enzima timidilato sintase e ocasiona desbalanço de nucleotídeos, inibindo no final do processo a síntese de DNA. FdUTP se liga a estrutura do DNA inibindo a sua síntese. FUTP é incorporado ao RNA ocasionando perda de função e morte celular.  
**Fonte:** Adaptado de Batista et al., 2020.

No entanto, o mecanismo de ação inespecífico do 5-FU além de destruir as células neoplásicas, afeta diferentes células de tecidos saudáveis situadas em todo o corpo humano, principalmente nos tecidos com rápida proliferação, como as células do TGI (Duncan and Grant, 2003). Conseqüentemente, devido aos seus efeitos citotóxicos, os pacientes geralmente desenvolvem efeitos colaterais como náusea, cardiotoxicidade, leucopenia, alopecia, mielosupressão, diarreia e mucosite oral e intestinal, que além de ocasionar má absorção intestinal e redução da qualidade de vida dos pacientes, conduz à descontinuidade do tratamento, além de aumentar o risco de infecções (Duncan and Grant, 2003; Sonis, 2004; Cinausero et al., 2017).

Os danos intestinais causados pelo 5-FU incluem o comprometimento da integridade da mucosa, encurtamento das vilosidades, perda da estrutura das criptas e aumento nos níveis de mediadores inflamatórios que, em conjunto, contribuem para o desenvolvimento da mucosite intestinal, que é o efeito colateral mais prevalente, ocorrendo em aproximadamente 50% dos pacientes em tratamento contra o câncer, podendo atingir até 85% dos pacientes quando se utiliza protocolos de associação de quimioterápicos (Longley et al., 2003; Sonis, 2004; Tang et al., 2017).

### 1.3 A Mucosite Intestinal

A mucosite consiste em uma inflamação do TGI, com sintomas como diarreia, dor abdominal, sangramento, fadiga, desnutrição, desequilíbrio eletrolítico e infecções com complicações que podem ser fatais (Sonis, 2004; Touchefeu et al., 2014; Kim et al., 2018). A fisiopatologia da mucosite é caracterizada por cinco fases (Iniciação, Resposta a danos primários, Amplificação do sinal, Ulceração e Cicatrização) (Figura 4), levando a rápida perda da estrutura e funcionalidade intestinais (Sonis, 2004).

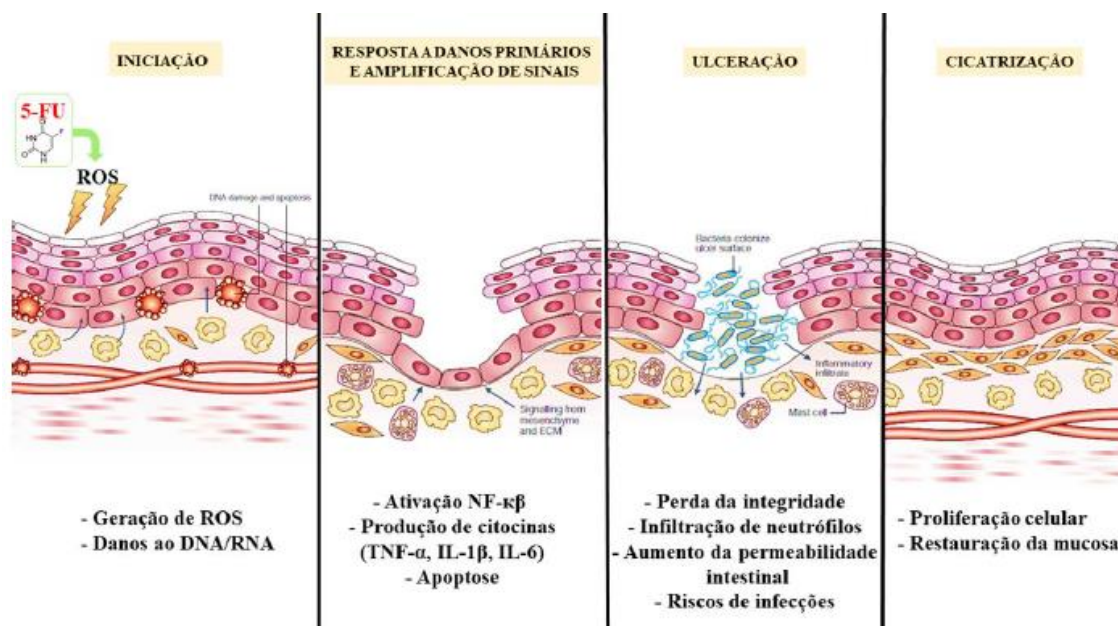
A fase de **Iniciação** ocorre após a administração do quimioterápico, onde a incorporação do 5-FU às moléculas de DNA/RNA promove alterações estruturais nessas moléculas, levando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) que desencadeiam lesões celulares do epitélio (Sonis, 2004).

Devido aos danos causados ao DNA e produção de EROS, na fase de **Resposta a danos primários** ocorre a ativação de vias de sinalização como a do factor nuclear kappa B (NFκB) (Sonis, 2002), que induzem à produção e liberação de mediadores inflamatórios como Cox2, iNOS e citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1β, IL-8 e IL-6. Essas citocinas possuem papel importante na toxicidade da mucosa, amplificando os danos, resultando em lesão tecidual e induzindo a morte celular (Chang et al., 2012).

Na terceira fase, pelo mecanismo de feedback positivo, as citocinas pró-inflamatórias produzidas, além de causar danos nos tecidos, ativam outras vias de sinalização, agindo indiretamente na **amplificação do sinal**, ativando fatores de transcrição, como as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), o fator p21 e a protease caspase 3, envolvidos no processo inflamatório e na apoptose celular tecidual, exacerbando a lesão (Sonis, 2004).

Na fase seguinte, de **ulceração**, ocorre a descontinuidade da barreira epitelial como resultado do desenvolvimento de ulcerações profundas. Há um aumento da permeabilidade intestinal, permitindo assim a translocação bacteriana. Outras alterações como o encurtamento das vilosidades, aumento da profundidade das criptas, e do infiltrado de células como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos também aparecem nesta fase, levando à diminuição da área absorptiva, e alterações na composição da microbiota (Sonis, 2004).

Na fase final, a **cicatrização** espontânea das úlceras ocorre aproximadamente duas semanas após interrupção do tratamento, sendo um processo espontâneo de auto recuperação do epitélio. A reparação do mesmo se dá por meio da proliferação e diferenciação de tecidos e células a partir de sinalização da matriz extracelular da submucosa (Duncan and Grant, 2003; Yeung et al., 2015).



**Figura 4. Representação esquemática das cinco fases de desenvolvimento da mucosite intestinal: Iniciação, Resposta a danos primários e amplificação de sinais (representadas em um mesmo momento), Ulceração e Cicatrização.**

Fonte: Adaptado de Sonis, 2004.

Atualmente, não existe procedimento eficaz para prevenção ou tratamento da mucosite. As opções utilizadas, como anestésicos locais, analgésicos e antibióticos, atuam apenas no alívio curto e temporário dos sintomas, reduzindo a duração e a gravidade dessa situação patológica (Duncan and Grant, 2003; Herbers et al., 2014).

Nesse contexto, têm sido buscadas alternativas terapêuticas eficazes para amenizar os sintomas clínicos, prevenir ou até mesmo, tratar a mucosite intestinal. Entre essas alternativas, as mais promissoras são o uso de probióticos (Kato et al., 2017; De Jesus et al., 2019), prebióticos (Smith et al., 2008b; Galdino et al., 2018) e simbióticos (Trindade et al., 2018), todos bem caracterizados na literatura como sendo capazes de amenizar os danos inflamatórios intestinais causados pelo uso dos quimioterápicos, devido suas propriedades anti-inflamatórias.

#### 1.4 Prebióticos

O conceito de prebiótico foi introduzido em 1995, pela primeira vez, por Glenn Gibson e Marcel Roberfroid. Desde então, a definição dos prebióticos foi discutida e aprimorada diversas vezes sendo a mais recente a que os define como “*ingredientes alimentares não digeríveis, seletivamente fermentáveis, que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon, desta maneira conferindo benefícios a saúde do hospedeiro*” (Davani-Davari et al., 2019). Para uma substância ser classificada como prebiótico, deve ter seu efeito demonstrado *in vitro* e *in vivo*, e se enquadrar nos

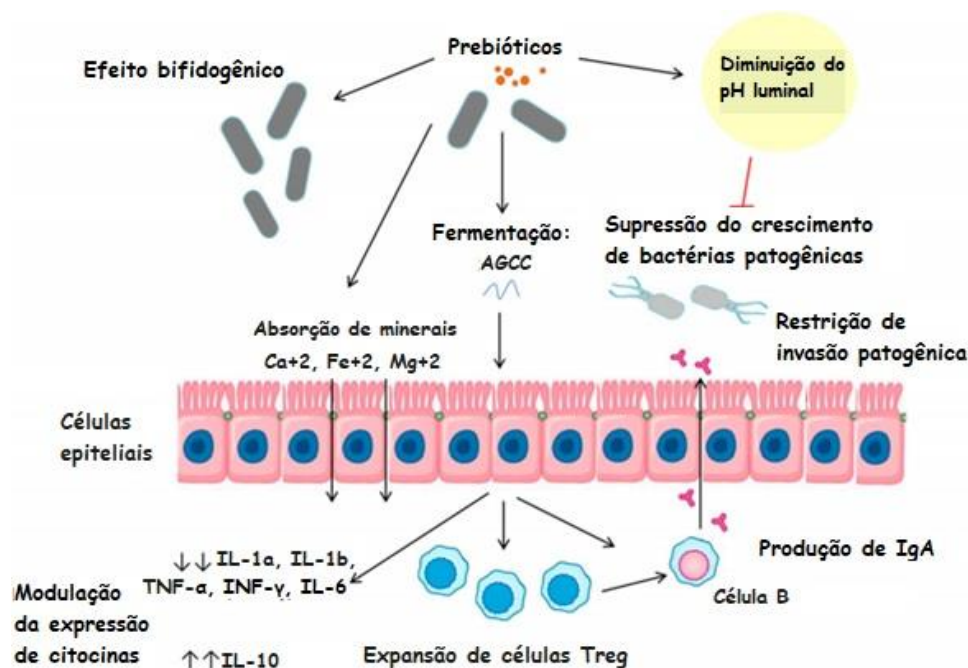
seguintes critérios: ser resistente ao pH ácido estomacal, não sendo hidrolisada por enzimas ou absorvida no trato gastrointestinal; ser fermentada pela microbiota intestinal e estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias intestinais levando a melhora na saúde do hospedeiro (Davani-Davari et al., 2019).

Os prebióticos são considerados tipos de fibras alimentares, ou seja, carboidratos não digeríveis que beneficiam o funcionamento intestinal e não apresentam valor nutritivo (Gidley and Yakubov, 2019). No entanto, deve-se destacar que nem todas as fibras são consideradas prebióticos.

Existem diversos tipos de prebióticos, com várias origens e propriedades químicas. Os frutanos, que incluem os fruto-oligossacarídeos (FOS) e a inulina, e os galactanos, que incluem os galacto-oligossacarídeos (GOS) são amplamente aceitos como prebióticos (Gibson et al., 2017). Além desses, existem diversos prebióticos “candidatos” descritos na literatura. Esses candidatos são componentes alimentares que demonstram potencial prebiótico *in vitro* ou em animais, mas que ainda faltam dados suficientes de estudos em humanos para que possam ser classificados como tal. Dentre eles se destacam os isomaltoligossacarídeos (IMO) e xilooligosacarídeos (XOS) (Lockyer and Stanner, 2019). Alguns autores também definem manitol, maltodextrina, rafinose e sorbitol como prebióticos (Hernandez-Hernandez et al., 2012; Patel and Goyal, 2012).

Os efeitos benéficos associados ao consumo de prebióticos estão relacionados a um menor risco de desenvolver doenças inflamatórias intestinais, doenças cardiovasculares e diabetes (den Besten et al., 2013; Raju et al., 2015; Lockyer and Stanner, 2019). Além disso outros múltiplos benefícios para a saúde têm sido observados, incluindo prevenção de alergias, melhoria do trânsito intestinal, modulação imunológica e diminuição do risco de câncer (Liu et al., 2018; So et al., 2018).

Esses efeitos são decorrentes da capacidade dessas substância em aumentar a secreção de IgA e de mucinas, importantes para a manutenção da barreira intestinal, além de estimular maior taxa de proliferação de colonócitos, aumentar o recrutamento de leucócitos aos locais de inflamação, promover um balanço na produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a capacidade osmótica do lúmen intestinal (Figura 5) (Leforestier et al., 2009; Komura et al., 2014; Vogt et al., 2015).



**Figura 5. Diferentes mecanismos de ação dos prebióticos.**

Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) através de sua fermentação pelos microorganismos, maior absorção de minerais como cálcio, ferro e magnésio, diminuição do pH luminal e regulação do sistema imunológico (com aumento da produção de IgA e modulação da produção de citocinas).

**Fonte:** Adaptado de Cerdó et al., 2019.

Além disso, o consumo desses compostos pode levar ao aumento na concentração de bactérias benéficas, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, no intestino (Vandenplas et al.; Akram et al., 2019). Muito importante destacar também que a fermentação anaeróbica dos prebióticos pela microbiota intestinal produz ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente butirato, propionato e acetato (den Besten et al., 2013; Akram et al., 2019; Davani-Davari et al., 2019).

Originados a partir do processo de fermentação, esses ácidos promovem a diminuição do pH intestinal luminal, de 6,5 para 5,5, tendo efeitos benéficos na função intestinal, como o estímulo de células proliferativas do epitélio, modificação na composição e espessura da camada de muco (Sangeetha et al., 2005). Além disso, os AGCC pode diminuir a população de bactérias com características patogênicas (Li et al., 2017; Davani-Davari et al., 2019), inibir a produção de mediadores inflamatórios, reduzindo a permeabilidade intestinal (So et al., 2018).

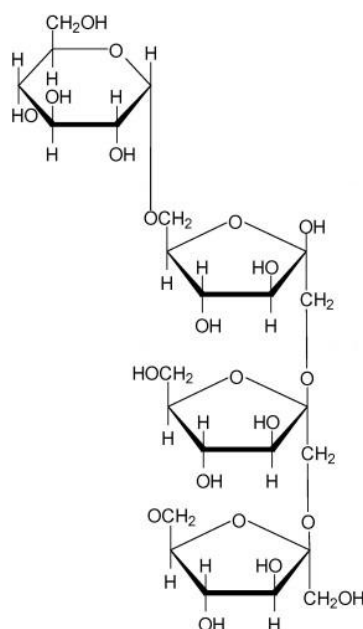
Apesar de os FOS, GOS e trans-galacto-oligossacarídeos (TOS) estarem entre os prebióticos mais comumente utilizados atualmente, (Davani-Davari et al., 2019), a inulina e o fruto-oligossacarídeos vem demonstrando efeitos promissores embora várias outras classes estejam sendo investigadas, como a lactulose, GOS, amidos e outros oligossacarídeos (Azimirad et al., 2016). Em função dos benefícios metabólicos

oferecidos à saúde do hospedeiro, os fruto-oligossacarídeos (FOS) vem sendo intensamente estudados.

#### 1.4.1 Fruto-oligossacarídeos

A oligofrutose, oligofrutanos ou Fruto-oligossacarídeos (FOS) pertencem a uma classe de carboidratos denominados frutanos, que descreve todos os oligo- ou polissacarídeos de origem vegetal, apesar de estarem presentes também em fungos e bactérias (Carabin and Flamm, 1999; Kyazze et al., 2008).

A estrutura química dos frutanos (Figura 6) explica seu efeito bifidogênico (habilidade de estimular o crescimento de bifidobactérias), pois estes carboidratos contêm ligações que são degradadas pela enzima  $\beta$ -frutosidase que é produzida pelas bifidobactérias, lactobacillus e bacterioidetes (Lockyer and Stanner, 2019).



**Figura 6. Estrutura química do FOS.**

**Fonte:** de Oliveira et al., 2011.

Cabe salientar que FOS possui status GRAS (do inglês, *Generally recognized as safe*) (Passos and Park, 2003) e de acordo com a ANVISA: “FOS (prebiótico) contribuem para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. Esta alegação pode ser utilizada desde que a recomendação de consumo diário do produto pronto para consumo forneça no mínimo 5 g de FOS, sendo que cada porção deve fornecer, no mínimo, 2,5 g de FOS (ANVISA, 2019).

Estas moléculas são encontradas naturalmente em diversos alimentos, como: alho, alcachofra, aspargo, cebola, trigo, banana, mel, açúcar mascavo, batata *yacon* e

em maior quantidade na chicória (Bornet et al., 2002; Passos and Park, 2003; Roberfroid, 2007). No entanto, nenhum desses alimentos possui um nível alto o suficiente para exercer efeito significativo como prebiótico (Lima, 2010).

Alguns estudos analisaram a relação de FOS com a composição da microbiota e a atividade fermentativa. Em resposta ao consumo de FOS, o peso do ceco foi aumentado, refletindo uma maior atividade fermentativa da microbiota. O conteúdo de AGCC foi aumentado em grupos suplementados com FOS, principalmente o propionato e o butirato. A composição da microbiota também foi modificada pela suplementação de FOS, mostrando um aumento de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Clostridium coccooides* e uma redução de *Clostridium leptum* (Bouhnik et al., 2007; Denipote et al., 2010; Le Bourgot et al., 2018). A suplementação de FOS na dieta intensificam a viabilidade e adesão dessas bactérias benéficas no TGI, mudando a composição da microbiota (Belorkar and Gupta, 2016; Flores-Maltos et al., 2016).

Há relatos também mostrando efeitos benéficos do FOS no tratamento de doenças intestinais; esses efeitos incluem um aumento na produção de AGCC, bem como redução de danos nas mucosas, infiltração de células inflamatórias e perda de peso corporal (Cherbut et al., 2003; Smith et al., 2008a; Goto et al., 2010; Koleva et al., 2012).

### 1.5 Probiótico

Os probióticos são definidos como “*microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro*” (Hill et al., 2014). Os probióticos mais bem estudados e caracterizados pertencem ao grupo de bactérias do ácido láctico (BAL). No entanto, microrganismos de outros grupos também apresentam propriedades probióticas, destacando a *Saccharomyces* sp, e bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Faecalibacterium*, entre outros (Pot et al., 2013; Bastos et al., 2016; Chang et al., 2019).

As BAL, que incluem principalmente espécies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, constituem um grupo de microrganismos Gram-positivos, anaeróbios ou aerotolerantes, não formadores de esporos e móveis, resistentes ao pH baixo e capazes de produzir ácido láctico como produto final da fermentação de carboidratos (Wang et al., 2016; Mokoena, 2017; Plavec and Berlec, 2020). Além disso, essas bactérias são utilizadas há muito tempo industrialmente em uma variedade de processos, incluindo produção de alimentos fermentados, como queijo, iogurtes, leites acidófilos, pães, vinhos, manteigas, carnes, pickles, embutidos e silagem, atuando na composição do sabor, na preservação e na produção de

suplementos ou aditivos e na produção de bacteriocinas e exopolissacarídeos (Liong, 2015; Erkmen and Bozoglu, 2016).

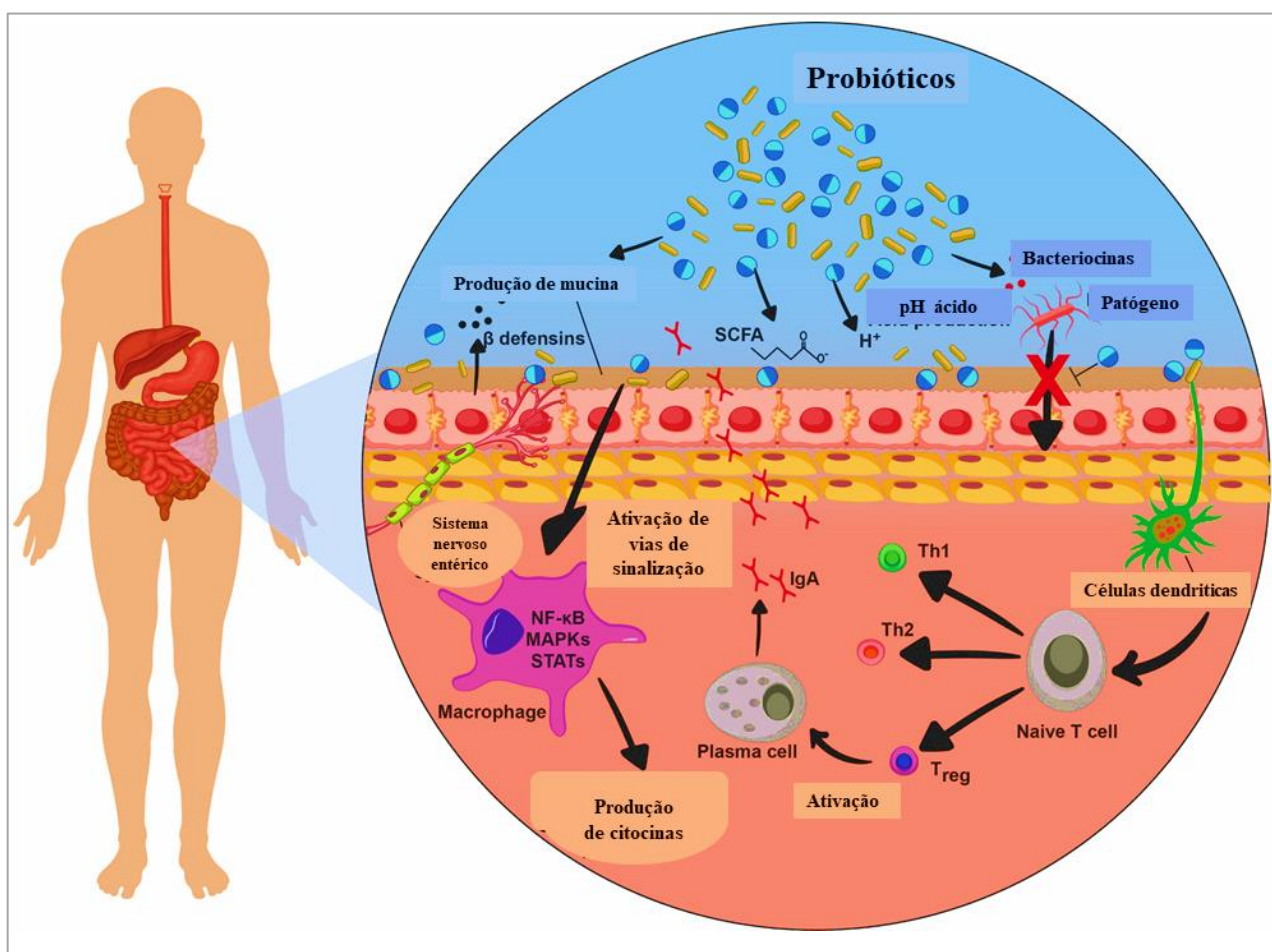
As BAL também possuem uma alta relevância biotecnológica, na manutenção da saúde e na prevenção de infecções, sendo funcionais como probióticos. Têm sido exploradas para a produção de proteínas heterólogas e metabólitos e também como veículo para entrega de vacinas gênicas e bioterapêuticas com potencial aplicação no tratamento e prevenção de diferentes condições patológicas humanas e veterinárias (Carvalho et al., 2017b; Gomes-Santos et al., 2017; Kuczkowska et al., 2019).

No que diz respeito à sua segurança para o consumo humano, algumas linhagens de BAL são consideradas GRAS pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), apresentando importante papel na manutenção da saúde. Para serem considerados probióticos, os microrganismos devem apresentar alguns atributos específicos, como: tolerar o baixo pH do lúmen gástrico, a ação das secreções biliares, pancreáticas e intestinais; estimular o sistema imunológico e não ser um colonizador perene (Wang et al., 2016; Mokoena, 2017).

Estudos têm demonstrado alguns benefícios à saúde humana atribuídos ao consumo de probióticos, principalmente em doenças do TGI, bem como em outras doenças relacionadas, como infecções entéricas (Fedorak et al., 2015; Acurcio et al., 2017), câncer (Zaharuddin et al., 2019), obesidade e diabetes tipo 2 (Saez-Lara et al., 2015; Wang et al., 2017; Hsieh et al., 2018), depressão (Wallace et al., 2020), dermatite atópica (Rather et al., 2016), entre outras.

Os principais mecanismos de ação descritos para esses microrganismos no hospedeiro incluem: i) regulação da microbiota intestinal (Shi et al., 2017); ii) proteção da barreira epitelial, mantendo a integridade das *tigh junctions* (Blackwood et al., 2017); (iii) indução de produção de mucina pelas células caliciformes (Aliakbarpour et al., 2012) e IgA secretória (sIgA), que são importantes mecanismos de defesa utilizados para manter a integridade epitelial e proteger o organismo contra agentes do ambiente externo (Ramanan and Cadwell, 2016); iv) aumento da aderência à mucosa intestinal e, conseqüentemente inibição da aderência de patógenos concomitantemente com base na relação bactéria-bactéria mediada pela competição por nutrientes disponíveis e locais de adesão mucosa, gerando exclusão competitiva de microrganismos patogênicos como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica* Typhimurium (Collado et al., 2010; Halder et al., 2017; Plaza-Díaz et al., 2017; Monteagudo-Mera et al., 2019); v) produção de substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas além dos ácidos acético e láctico, que exercem fortes efeitos inibitórios contra bactérias Gram-negativas e que foram considerados os principais compostos antimicrobianos produzidos por probióticos contra os patógenos (Alakomi et al., 2000; De Keersmaecker et al., 2006;

Castilho et al., 2019); vi) produção de AGCC (Parada Venegas et al., 2019); vii) inibição da via de sinalização de NF $\kappa$ B responsável pela produção de mediadores pró-inflamatórios; (Kaci et al., 2011; Gao et al., 2015); viii) interação com o eixo intestino-cérebro através da produção de metabólitos, como o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Kim et al., 2018); e ix) modulação das respostas inatas e/ou adaptativas do sistema imunológico do hospedeiro através da interação com células epiteliais, células dendríticas, monócitos, macrófagos e linfócitos (Azad et al., 2018; Batista et al., 2020) (Figura 7).



**Figura 7. Principais mecanismos de ação propostos para bactérias probióticas no TGI humano.**

Os principais mecanismos de ação dos probióticos incluem aumento da barreira epitelial por meio da manutenção das proteínas *tight junctions* e produção de mucinas pelas células caliciformes, adesão à mucosa intestinal e inibição concomitante da adesão de patógenos, exclusão competitiva de microorganismos patogênicos através da produção de substâncias antimicrobianas e modulação do sistema imunológico.

**Fonte:** Adaptado de Batista et al. (2020).

Entre as bactérias com potencial probiótico as mais bem estudadas pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, demonstrando excelentes propriedades

tanto em estudos *in vitro* (Presti et al., 2015; Rocha-Ramírez et al., 2017) como *in vivo* (Aoki et al., 2017; Gosmann et al., 2017).

Várias linhagens bacterianas do gênero *Lactobacillus* têm sido isoladas, caracterizadas e estudadas e têm tido seu potencial probiótico reportado, sendo relatados, na literatura, vários efeitos benéficos, principalmente no que se refere aos seus efeitos imunomodulatório e anti-inflamatório no TGI, especialmente contra danos epiteliais ocasionados pelo quimioterápico 5-FU.

Entretanto, deve ser salientado que o efeito de uma bactéria é específico para cada cepa, não podendo ser extrapolado, inclusive, para outras cepas da mesma espécie (Guarner and Malagelada, 2003). Nesse sentido, a identificação de novas linhagens bacterianas e sua avaliação na prevenção/tratamento em doenças relacionadas ao TGI são necessárias (Guarner and Malagelada, 2003).

### **1.5.1 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133**

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 é uma linhagem potencialmente probiótica, que foi isolada de leite de vaca cru, e cujos efeitos benéficos vem sendo amplamente reportados, como sua capacidade de inibir o crescimento de bactérias causadoras de contaminação e deterioração alimentar como *Pseudomonas* (KOCIUBINSKI et al., 1996, 1999) e microorganismos patogênicos como *Escherichia coli* entero-hemorrágica (Hugo et al., 2006). Foi demonstrada a capacidade desta cepa de diminuir as atividades enzimáticas bacterianas nocivas, como a nitrato redutase, comprovando capacidade de modular a atividade metabólica da microbiota intestinal (Hugo et al., 2010), e também a resistência aos peptídeos antimicrobianos derivados de enterócitos humanos cultivados, como as  $\beta$ -defensinas humanas (Hugo et al., 2012).

Também foi demonstrada que a interação da cepa CIDCA 133 com macrófagos murinos (células RAW 264.7) infectados com *Citrobacter rodentium* e *Bacillus cereus* foi capaz de estimular a fagocitose e a atividade antimicrobiana, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e óxido nítrico (NO), capacidade de promover expressão de marcadores de superfície relacionados à apresentação de antígenos, além de reduzir o nível de IL8 e aumentar o nível de TNF- $\alpha$  das células infectadas (Rolny et al., 2016; Hugo et al., 2017).

Para demonstrar o potencial terapêutico dessa linhagem em testes *in vivo*, foi realizado um estudo sobre o potencial protetor do leite fermentado por CIDCA 133 na mucosite intestinal, em modelo murino, induzido por 5-FU. Neste estudo foi possível constatar a secreção intestinal reduzida de IgA secretória, com redução na permeabilidade intestinal, redução da perda de células caliciformes e infiltração inflamatória, inferindo, dessa forma, que o leite fermentado por CIDCA 133 é capaz de

prevenir os danos à mucosa intestinal causados pelo quimioterápico 5-FU (De Jesus et al., 2019).

As bases moleculares e possíveis mecanismos atribuídos à probiose de CIDCA 133 foram também relatadas através de estudo genômico realizado por De Jesus et al. (2021), no qual foi reportado que os efeitos anti-inflamatórios da linhagem podem estar associados à sua capacidade de inibir a expressão de NFκB1 (p105) e aumentar a expressão gênica das citocinas anti-inflamatórias Il10 e Tgfb. Além disso, foi demonstrado que estes efeitos anti-inflamatórios e a capacidade antibacteriana da linhagem contra bactérias patogênicas como *S. Typhimurium*, pode ser devido a proteínas de membrana, expostas à superfície e secretadas, bem como a produção de bacteriocinas, respectivamente, identificadas nas análises *in silico* do genoma desta bactéria (De Jesus et al., 2021).

Esses estudos, portanto, apoiam o potencial efeito probiótico da cepa CIDCA 133 e demonstram suas potenciais propriedades imunomodulatórias para controlar infecções *in vitro* e *in vivo*, demonstrando, assim, que a linhagem pode ser utilizada como alternativa terapêutica em diferentes modelos de doenças infecciosas e inflamatórias.

Diversas pesquisas comprovaram o efeito benéfico dos probióticos na mucosite intestinal induzida por 5-FU (Carvalho et al., 2017d, 2021; De Jesus et al., 2019; Yeung et al., 2020). Assim, partindo deste achados e sabendo que os efeitos benéficos dos *Lactobacillus* à saúde humana são espécie e linhagem dependentes, e devido haver trabalhos demonstrando que o efeito terapêutico desses micro-organismos é potencializado após sua associação a compostos prebióticos (Trindade et al., 2018), a suplementação de CIDCA 133 com prebióticos, que resulta em uma formulação simbiótica, pode ser uma alternativa terapêutica interessante para melhorar os sintomas causados pela mucosite, além de outras doenças relacionadas ao TGI.

## 1.6 Simbióticos

Como as substâncias prebióticas estimulam a ação dos probióticos, gerando nutrição e energia, foram desenvolvidos os simbióticos, uma associação entre pré e probiótico, que tem como objetivo auxiliar que os probióticos resistam às adversidades do TGI, e intensificar os efeitos benéficos quando comparados ao uso isolado de cada um deles (Geier et al., 2006; Markowiak and Ślizewska, 2018).

O termo simbiótico foi introduzido por Gibson e Roberfroid (1995) e é definido como “*uma mistura de probióticos e prebióticos que afeta benéficamente o hospedeiro, melhorando a sobrevivência e a implantação de suplementos alimentares microbianos vivos no TGI, estimulando seletivamente o crescimento e o metabolismo de um número*

limitado de bactérias promotoras de saúde e, assim, melhorando o bem-estar do hospedeiro” (Gibson and Roberfroid, 1995).

Os principais critérios para a formulação de simbióticos devem ser a seleção de probióticos e prebióticos adequados. Dessa forma, o prebiótico deve estimular seletivamente o crescimento de microorganismos com efeito benéfico para a saúde, sem estimulação simultânea de microorganismos patogênicos. Assim, as principais espécies probióticas e prebióticos utilizados em formulações simbióticas incluem, respectivamente, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacteria* spp., *S. boulardii*, *B. coagulans*; e frutooligossacarídeo (FOS), galactooligossacarídeo (GOS), xiloseoligossacarídeo (XOS). Entre os principais efeitos benéficos para a saúde dos seres humanos, associados ao consumo de formulações simbióticas destacam-se: (i) níveis aumentados de lactobacilos e bifidobactérias e microbiota intestinal equilibrada; (ii) melhoria da capacidade imunomoduladora; (iii) prevenção de translocação bacteriana; e (iv) melhoria da função hepática e redução da incidência de infecções hospitalares em pacientes cirúrgicos (Pandey et al., 2015; Markowiak and Ślizewska, 2018).

Estudos sobre os efeitos do uso de probióticos e prebióticos já são extensos na literatura, alguns demonstram que a combinação de probióticos e prebióticos pode ter melhores resultados quando comparados ao uso apenas de probióticos, induzindo a regulação da resposta imune e dos benefícios à saúde (Morelli et al., 2003; Rastall et al., 2005). Quando ingeridos por via oral, os simbióticos podem melhorar a sobrevivência das bactérias ao cruzarem a parte superior do TGI até a chegada desses microorganismos no intestino, aumentando assim seus efeitos no intestino grosso, além disso, seus efeitos podem ser aditivos ou sinérgicos (Roberfroid, 2000). No entanto, apenas alguns estudos analisaram o impacto dos simbióticos na inflamação intestinal (La Rosa et al., 2003; Smith et al., 2008a; Trindade et al., 2018).

Foi relatado que a combinação simbiótica de *Lactobacillus paracasei* e FOS aumenta as espécies colônicas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e reduz o número de *Clostridium* e *Enterobacterium* patogênicos (Bomba et al., 2002). Além disso, a combinação de *Lactobacillus sporagens* e FOS demonstrou reduzir a diarreia associada a antibióticos em crianças (La Rosa et al., 2003).

O efeito terapêutico de uma preparação simbiótica comercial (Prolife®) contendo seis espécies de probióticos (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, subsp. *bulgaricus*, *L. sporogenes*, *S. thermophilus*, *B. bifidum* and *S. cerevisiae*) suplementado com o prebiótico glico-oligossacarídeos foi avaliado na diarreia induzida por radiação aguda. Nesse estudo, foi observado que administração do simbiótico embora não tenha sido capaz de evitar a ocorrência de diarreia, atenuou significativamente sua gravidade. Os benefícios provenientes do simbiótico contribuíram significativamente para a

reabilitação da função de absorção intestinal, conforme indicado adicionalmente pela atenuação da perda de peso corporal dos animais (Spyropoulos et al., 2013).

Outro produto comercial (Simbioflora<sup>®</sup>) que consiste em um simbiótico composto por 5,5 g de FOS mais quatro cepas probióticas (*Lactobacillus paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*), foi avaliado na mucosite intestinal induzida por 5-FU em modelo murino (300 mg/kg). Observou-se que a administração dessa formulação simbiótica foi capaz de atenuar a perda de peso dos animais, reduzir a permeabilidade intestinal, o infiltrado de eosinófilos e também melhorar os danos histológicos da mucosa intestinal com preservação tanto na altura das vilosidades como na profundidade das criptas, mas apenas o simbiótico se destacou com melhores resultados quando comparados à forma isolada do prebiótico (Trindade et al., 2018).

Sabe-se que os agentes quimioterápicos reduzem a população das bactérias comensais, levando ao desequilíbrio da microbiota intestinal e, conseqüentemente, à disfunção da barreira intestinal, eventos descritos como indutores do desenvolvimento e progressão da mucosite (Tang et al., 2017). Além disso, vários estudos demonstram que o consumo de probiótico, prebiótico ou simbiótico é capaz de regular a microbiota intestinal, sendo uma estratégia eficaz para melhorar vários distúrbios inflamatórios do trato gastrointestinal (Flint et al., 2007; Rajkumar et al., 2015; Belorkar and Gupta, 2016). Nesse sentido, esses agentes bioterapêuticos podem ser empregados como uma estratégia interessante para prevenir a mucosite.

Com base nas evidências acima, os simbióticos representam uma estratégia adjuvante promissora para a melhoria dos sintomas da mucosite. Diante disso, a hipótese do presente trabalho é que o tratamento com a associação simbiótica (probiótico *L. delbrueckii* CIDCA 133 e o prebiótico FOS) é capaz de atenuar as respostas induzidas pelo quimioterápico 5-FU no TGI.

## 2. JUSTIFICATIVA

O 5-FU é um agente quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer. Entretanto, como resultado de sua não seletividade, apresenta vários efeitos tóxicos sobre células do TGI, sendo a mucosite intestinal um dos principais efeitos adversos (Sonis, 2004).

Caracterizada por uma lesão inflamatória ulcerativa que acomete principalmente o intestino delgado, a mucosite intestinal é um efeito colateral resultante da terapia antineoplásica, caracterizada por uma lesão inflamatória ulcerativa que acomete principalmente o intestino delgado, o que acaba afetando a qualidade de vida do paciente oncológico, bem como comprometendo tanto a duração quanto a eficácia do tratamento (Sonis, 2004). Assim, sendo a mucosite é um sério problema na clínica médica, e devido a falta de tratamentos eficazes disponíveis, torna-se relevante a busca por alternativas terapêuticas que visem reduzir ou amenizar este efeito colateral.

Dados da literatura têm mostrado, em doenças intestinais, efeitos benéficos da utilização do prebiótico fruto-oligossacarídeos (FOS), como a atividade anti-inflamatória, modulação da microbiota intestinal e aumento na produção AGCC (Galdino et al., 2018). Dados preliminares de nosso grupo de pesquisa mostraram que o leite fermentado por *L. delbrueckii* CIDCA133, administrado 10 dias antes da indução da doença, apresentou efeitos imunorreguladores duradouros e foi capaz de proteger a mucosa intestinal dos danos epiteliais ocasionados pela administração de 5-FU, como redução da permeabilidade intestinal e preservação da arquitetura da mucosa intestinal (De Jesus et al., 2019).

Dessa forma, a literatura demonstra que a utilização do prebiótico FOS bem como da bactéria probiótica CIDCA 133, de maneira isolada, são capazes de prevenir a inflamação da mucosa causada por 5-FU. No entanto, o efeito combinado desses bióticos ainda não foi estudado. Portanto, este trabalho objetivou avaliar o efeito da formulação simbiótica contendo FOS e CIDCA 133 na mucosite intestinal induzida por 5-FU, em modelo murino.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da associação de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 e FOS após a administração oral na mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico 5-FU em camundongos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de FOS no crescimento da CIDCA 133 in vitro;
- Avaliar o efeito do simbiótico no tratamento da mucosite empregando 02 vias de administração, gavagem e *continuous feeding*;
- Avaliar o peso, consumo alimentar e hídrico dos animais antes e após a indução da mucosite nos diversos grupos investigados;
- Avaliar parâmetros relacionados com a integridade da mucosa intestinal, como aspectos morfológicos, escore histológico, permeabilidade intestinal e expressão de proteínas de junções firmes nos animais controle e tratados com FOS, CIDCA 133 e Simbiótico;
- Avaliar alguns parâmetros imunológicos por meio de expressão gênica de citocinas inflamatórias, anti-inflamatórias e IgA no intestino dos animais controle e tratados com FOS, CIDCA 133 e Simbiótico;
- Verificar a presença de neutrófilos e eosinófilos ativados no intestino por meio da medida da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO), respectivamente.

## **PARTE I – MÉTODO DE ADMINISTRAÇÃO: GAVAGEM**

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Linhagem bacteriana, condições de cultivo e estocagem

A bactéria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 pertence à coleção de culturas do Centro de Investigação e Desenvolvimento em Criotecnologia de Alimentos (CIDCA) da Universidade Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, Argentina. Para o crescimento da mesma foi utilizado o meio de cultivo MRS- *de Mann-Rogosa-Sharp* (Kasvi) a 37°C em estufa bacteriológica, sem agitação e em condição de microaerobiose. Para fins de estocagem, CIDCA 133 foi cultivada em meio líquido por um período de 18 horas, nas condições citadas e uma alíquota da mesma foi estocada na concentração final de 15% em uma solução estéril de glicerol (crioprotetor) e acondicionadas em ultra-freezer a -80 °C.

### 4.2 Curva de crescimento de CIDCA 133

Com o intuito de estabelecer uma relação entre a densidade óptica (D.O) e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi feita uma curva de crescimento da linhagem CIDCA 133, a qual permitiu analisar o crescimento bacteriano em função do tempo e sua relação com número de colônias formadas, e conseqüentemente determinar o ponto ideal (maior número de bactérias viáveis) para a preparação das doses que serão administradas aos animais.

Para ativação da cultura, 50 µL da cultura estocada a -80°C foram adicionados a 15 mL de MRS, e mantidos a 37°C em estufa bacteriológica, sem agitação, durante 16 horas, em microaerobiose. Posteriormente, um novo inóculo foi realizado em 50 mL de MRS nas mesmas condições descritas anteriormente, partindo de uma absorbância de 0,04 (DO<sub>600nm</sub>) e a cada 1 hora a absorbância desse inóculo foi mensurada. Também foi retirada uma alíquota de 100 µL da mesma e realizaram-se diluições seriadas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>), com plaqueamento de 100 µL das mesmas (uma diluição por hora) em placas de Petri com MRS-ágar (1,5%) e incubadas em estufa microbiológica a 37°C, por 48 horas. As colônias de cada placa em cada ponto da curva de crescimento foram contadas e o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), foi calculado de acordo com a fórmula a seguir:

$$UFC = \frac{N^{\circ} \text{ de colônias contadas} \times \text{fator de diluição}}{\text{Volume (mL) plaqueado}}$$

### 4.3 Preparação das doses

Para a confecção das doses bacterianas, 50 µL da cultura estoque foram adicionados a 15 mL de MRS, e mantidos a 37°C em estufa bacteriológica, sem agitação, durante 16 horas, em microaerobiose. Em seguida, foi feito um novo inóculo

em 50 mL de MRS partindo de uma absorbância de 0,04 ( $DO_{600nm}$ ). Quando a absorbância atingiu a  $DO_{600nm}$  1,6 (correspondente a  $1,2 \times 10^9$  UFC/mL) a cultura foi centrifugada (4000 rpm por 15 min, 4°C), o sobrenadante descartado e foi realizada uma lavagem com PBS 0,01M estéril [(0,36 g NaCl, 0,09 g KCl, 0,5 g  $Na_2HPO_4$ , 0,09g  $KH_2PO_4$ - Synth)], sendo esse processo repetido mais duas vezes. O precipitado final foi ressuspenso em PBS 0,01 M estéril e foi imediatamente armazenados em -80°C até o momento da administração aos animais, quando foi ajustado para que cada dose (0,3mL) fosse equivalente a  $10^9$  UFC.

A viabilidade das doses foi testada durante 4 dias. Para isso, foi feita uma diluição seriada ( $10^7$ ) com 100  $\mu$ L de uma dose, e posteriormente a amostra foi plaqueada em placas MRS-ágar (1,5%) e incubadas em estufa microbiológica a 37 °C, por 48 horas. Após esse período, as colônias foram contabilizadas e foi realizado o cálculo do número de UFC/mL, seguindo a fórmula:

$$UFC/mL = \frac{N^{\circ} \text{ de colônias contadas} \times \text{fator de diluição}}{\text{Volume (mL) plaqueado}}$$

#### 4.4 Preparação do Prebiótico

Foi utilizado o suplemento alimentar prebiótico FOS NewNutrition® (Nutratec), em pó, composto por fruto-oligossacarídeos de cadeia curta. A quantidade de FOS utilizada foi correspondente a 6% da dieta (Galdino et al., 2018). De acordo com o banco de dados *Mouse Phenome Database* a média de consumo de ração diária de cada camundongo corresponde a 4 g/dia (The Jackson Laboratory), com isso o quantitativo de suplementação de FOS diário foi de 240 mg/dia por animal (6%).

#### 4.5 Animais

Para o desenvolvimento do experimento *in vivo* foram utilizados camundongos machos BALB/c, com 6-8 semanas de idade, adquiridos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CeBio) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos em microisoladores no biotério do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, submetidos a ciclo diurno/noturno de 12 horas e com livre acesso à ração e água filtrada. Os protocolos experimentais utilizados foram realizados de forma a garantir o maior bem-estar dos animais durante todo o período, de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMG (protocolo nº 111/2020, em anexo).

#### 4.6 Delineamento experimental e Indução da mucosite por 5-FU

Os animais foram distribuídos em 6 grupos (n= 6 animais), sendo: **Controle (CTL)**: Gavagem com 0,3 mL de solução salina (0,01M) e sem indução de mucosite. **Simbiótico (CTL SIM)**: Gavagem com 0,3 mL de solução contendo CIDCA 133 (concentração final de  $1,2 \times 10^9$  UFC/mL) + 240 mg de FOS e sem indução de mucosite. **Mucosite (MUC)**: Gavagem com 0,3 mL de solução salina e indução de mucosite com 5-FU. **Tratado Bactéria (BAC)**: Gavagem com 0,3 mL de solução contendo CIDCA 133 (concentração final de  $1,2 \times 10^9$  UFC/mL) e indução de mucosite com 5-FU. **Tratado FOS (FOS)**: Gavagem com 0,3 mL de solução contendo 240 mg de FOS dissolvidos em solução salina e indução de mucosite. **Tratado Simbiótico (SIM)**: Gavagem com 0,3 mL de solução contendo CIDCA 133 (concentração final de  $1,2 \times 10^9$  UFC/mL) e 240 mg de FOS, e indução de mucosite com 5-FU (Tabela1).

Para a indução de mucosite intestinal, no 10º dia de tratamento, os animais dos grupos MUC, BAC, FOS e SIM receberam a injeção intraperitoneal contendo 300mg/kg de 5-FU (Faudfluor, Libbs®), enquanto que os animais dos grupos CTL e CTL SIM receberam injeção intraperitoneal de solução salina 0,9% com mesmo volume. No 13º dia os animais foram eutanasiados para realização das análises (Figura 8). A administração de FOS e/ou CIDCA 133 (grupos FOS, BAC, SIM, CTL SIM) consistiu em 240 mg de FOS e/ou CIDCA 133 ( $1,2 \times 10^9$  UFC/mL) durante 12 dias de experimentação (Figura 8).

**Tabela 1. Grupos experimentais e tratamentos realizados**

Grupos	Gavagem com solução salina	Gavagem com 240 mg de FOS	Gavagem com CIDCA133 ( $10^9$ )	5-FU intraperitoneal (300mg/kg)
CTL	+	-	-	-
CTL SIM	-	+	+	-
MUC	+	-	-	+
BAC	-	-	+	+
FOS	-	+	-	+
SIM	-	+	+	+

Grupo tratamento = (+). Grupo sem tratamento = (-) CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.



10% tamponado [4g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich), 6,5g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich), 100 mL formaldeído (Nox) 37% a 40%, q.s.p para 1000 mL de água destilada], onde foram mantidas até seu processamento. O material foi processado para inclusão em parafina e secções de 4 µm de cada amostra cortadas e devidamente processadas em lâminas as quais foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). As amostras foram avaliadas de acordo com um sistema de classificação histopatológica descrito por Howarth et al., (1996) modificado (Tabela 2). A captura das imagens e as análises das mesmas foram realizadas pelo patologista Prof. Dr. Enio Ferreira (Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas/UFMG), através de estudo duplo cego.

Para a realização das análises morfométricas do íleo foram obtidas fotografias realizadas em microscópio Olympus BX51 acoplado à câmera digital por meio do programa SPOT Advanced com aumento de 20X. Foram fotografados dez campos por lâmina. Em seguida foram realizadas as análises da altura das vilosidades e profundidade das criptas, medindo-se da base ao ápice e os dados foram expressos em micrômetros utilizando o programa *ImageJ* (Versão 1.47, Wayne Rasband/National Institute of Health, USA). A razão vilosidade/cripta foi então determinada.

**Tabela 2. Escore histológico para avaliação da secção ileal dos animais submetidos a diferentes tratamentos experimentais.**

Achados microscópicos	Escore			
	0	1	2	3
Atrofia das vilosidades				
Rompimento de bordas em escova e enterócitos de superfície				
Perda da arquitetura de criptas				
Infiltração de leucócitos				
<b>0:</b> dano mínimo, <b>3:</b> dano máximo				

**Fonte:** adaptado de Howarth et al., (1996).

#### **4.7.4 Análise do infiltrado inflamatório por meio das atividades enzimáticas de mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO)**

Aproximadamente 40 mg do tecido do íleo dos animais foi removido para a determinação indireta do infiltrado de neutrófilos (MPO) e eosinófilos (EPO), sendo em seguida armazenados em freezer -80 °C até o momento das análises. Para realização das mesmas, as amostras foram lavadas com PBS 0,01M, pesadas em balança analítica e separadas em duas partes.

A extensão do infiltrado celular por neutrófilos no intestino delgado foi mensurada por meio da atividade da enzima mieloperoxidase, conforme descrito por Souza et al., (2000). Aproximadamente 20 mg de tecido foram utilizados para dosagem desta enzima. Em seguida, as amostras foram inicialmente processadas homogeneizadas com Buffer 1 [5,84 g/L NaCl 0,1M (Synth®); 3,12 g/L Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,02M (Sigma-Aldrich®); 2,76 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.1H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich®); 5,58g/L Na<sub>2</sub>EDTA 0,015M (Sigma-Aldrich®); pH 4.7] gelado e centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet formado foi ressuscitado em solução salina (NaCl) 0,2% (proporção: 1,5 mL/100 mg de tecido) e em seguida foi adicionado solução salina 1,6% suplementado com 5% de glicose (proporção: 1,5 mL/100 mg de tecido). As amostras foram homogeneizadas, e posteriormente, centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi novamente desprezado e o precipitado ressuscitado em Buffer 2 [6,9 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.1H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich®); Hexadecyltrimethylammonium Bromide (HTAB) 0,5% (Sigma-Aldrich®), (pH 5,4)] (proporção: 1,9 mL/100 mg de tecido) em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e passaram por 3 ciclos congelamento / descongelamento, em nitrogênio líquido. As suspensões foram centrifugadas por 15 minutos a 4°C e subseqüentemente o sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático.

Para isso, se adicionaram 25 µL das amostras, em duplicata, em uma placa de 96 poços (Nunc-Immuno, MaxiSorp) juntamente com 25 µL do substrato TMB 1,6mM (3,3',5,5' – tetrametilbenzidina – Sigma-Aldrich®) diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Sigma-Aldrich®). A placa foi incubada a 37°C por 5 minutos e em seguida, foram adicionados 100 µL de 0,002% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Synth) e novamente incubou-se a 37 °C por mais 5 minutos. Com o intuito de interromper a reação, acrescentaram-se 100 uL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1M e posteriormente a absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 450 nm utilizando um leitor de microplacas (Bio-Rad modelo 450, Bio-Rad 42 Laboratories, Hercules, CA, USA), sendo o resultado expresso em concentração de MPO por mg de proteína (U/mg), com base na absorbância / 100 mg de tecido.

A extensão do infiltrado celular por eosinófilos no intestino delgado foi mensurada por meio da atividade da enzima peroxidase eosinofílica, conforme descrito por Strath and Sanderson, (1985). Aproximadamente 20 mg da porção correspondente ao íleo foram utilizadas para dosagem desta atividade enzimática. As amostras foram homogeneizadas em PBS 0,5M (proporção: 1,9 mL/100mg de tecido) e centrifugadas a 10000 rpm 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet formado foi ressuscitado em solução salina (NaCl) 0,2% (proporção: 1,5 mL/100 mg de tecido) e em seguida foi adicionado solução salina 1,6% suplementado com 5% de glicose

(Labsynth) (proporção: 1,5 mL/100 mg de tecido). As amostras foram centrifugadas novamente a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em HTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamônio) 0,5% (Sigma-Aldrich®) diluído em tampão fosfato (pH 7,4; proporção: 1,9 mL/100 mg de tecido). As suspensões passaram por 3 ciclos de congelamento / descongelamento, em nitrogênio líquido e centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (75 µL) foi adicionado, em duplicata, a uma placa de 96 poços (Nunc-Immuno, MaxiSorp) e mesmo volume do substrato *O*-fenilenediamina diidrocloreto 1,5 mM (OPD) (Sigma-Aldrich®) diluído em tampão Tris-HCl a 0,0075 mM acrescido de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 6,6 mM (Synth), foi adicionado. Posteriormente, a placa foi incubada a 20°C por 30 minutos ao abrigo da luz. Após esse período, a reação foi interrompida com adição de 50µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich) 1M. A reação enzimática foi avaliada com a medida da absorbância por espectrofotometria em comprimento de onda de 492 nm utilizando um leitor de microplacas (Bio-Rad modelo 450, Bio-Rad 42 Laboratories, Hercules, CA, USA), sendo o resultado expresso em concentração de EPO por mg de proteína (U/mg), com base na absorbância / 100 mg de tecido.

#### **4.7.5 Análise da expressão gênica relativa**

Para a análise do nível de expressão gênica relativa de genes relacionados às proteínas da junção firme e estudo do perfil das citocinas pró e anti-inflamatórias por RT-qPCR, porções de 2 cm da região ileal foram coletadas e acondicionadas em microtubos contendo 300 µL de RNA later (Invitrogen®). Em seguida as amostras foram armazenadas em freezer -20°C até o momento da análise. Posteriormente, os tecidos foram submetidos a três etapas: 1) Extração do RNA; 2) Síntese do cDNA; 3) Amplificação do cDNA pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real-qPCR).

##### **4.7.5.1 Extração do RNA**

Para a extração do RNA total utilizou-se aproximadamente 30mg de tecido íleal previamente homogeneizado no Precellys® (Bertin Technologies), sendo realizado um ciclo de 6500 rpm x 24 segundos com a utilização de 10 mg de beads magnéticas (Sigma-Aldrich®) e 0,5 mL de Trizol (Ludwig Biotec®). Em seguida, os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 10 min. A esses tubos, foram adicionados 100 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich®) e os mesmos foram agitados por inversão, vagarosamente, 10 vezes e centrifugados a 12.000 g, a 4°C, por 15 min. A fase aquosa do sobrenadante foi então transferida para um outro tubo contendo 250µL de isopropanol (Vetec®) e homogeneizados novamente por inversão (10 vezes). Em

seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g, a 4°C, por 10 min. O sobrenadante foi removido e o pellet lavado com 0,5 mL de etanol 70% (Sigma-Aldrich®). As amostras foram novamente centrifugadas, sob as mesmas condições, por um período de 10 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o procedimento de lavagem e centrifugação, repetidos. O novo sobrenadante formado foi descartado e o pellet foi submetido à secagem em temperatura ambiente. Após secagem, o pellet foi ressuspenso em 50 µL de água livre de RNase e DNase. Para analisar a integridade das amostras, as mesmas foram dispostas em gel de agarose (Kasvi®) 1,5% e utilizou-se espectrofotômetro (NanoDrop® 2000 Thermo Scientific) para a determinação da concentração (ng/µL) e da pureza do RNA, por meio da razão 260/280.

#### **4.7.5.2 Síntese cDNA**

Após a extração, as amostras de RNA (2µg) foram purificadas com 1µL DNase I do TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, para a eliminação de DNA genômico que pudesse estar presente na amostra e interferir nas análises posteriores. Posteriormente, a DNase I foi inativada a 37 °C por 30 min, com 2µL do reagente de inativação (Invitrogen). Em seguida, o cDNA foi gerado a partir de 2µg de RNA seguindo as instruções do kit Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher) (25°C por 10 minutos, em seguida a 37°C por 120 minutos, e por fim a 85°C por 5 minutos), utilizando o termociclador (MyGene™ Series Peltier Thermal Cycler).

As amostras foram então armazenadas a -20 °C para posterior amplificação pela técnica de PCR em tempo real. Para isso, as amostras foram previamente diluídas para a mesma concentração de cDNA. No presente trabalho a concentração das amostras foi padronizada para 2 µg/µL de cDNA.

#### **4.7.5.3 Amplificação do cDNA por PCR em tempo real**

O cDNA sintetizado na etapa anterior, foi amplificado pela técnica de PCR em tempo real (qPCR), utilizando primers específicos (Tabela 3) para cada gene a ser analisado. Assim, 2,5 µL das amostras de cDNA previamente diluídas para a concentração de 2µg/ul, adicionados à 7,5 µL da solução mix em placa de 96 poços (Nunc-Immuno, MaxiSorp). Para cada amostra, a solução mix foi composta de 0,5 µL de primer forward (5 pMol), 0,5 µL de primer reverse (5 pMol), 1 µL de água e 5 µL de PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Thermo®). A análise de expressão gênica foi realizada no aparelho Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR System nas seguintes condições: 50 °C por 2 min, 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60 °C por 1 min e processados no programa SDS 2.4. Todas as amostras foram

analisadas em duplicata e a quantidade de mRNA normalizada usando como referências endógenas os genes *Gapdh* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e *Actb* (Beta-actina). Os valores foram expressos pela razão da expressão dos genes alvos em comparação ao grupo controle ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). A curva de dissociação indicou que um único produto de amplificação foi obtido em cada reação.

**Tabela 3. Primers utilizados para o PCR em tempo real (qPCR) – parte I**

Gene	Sequência	Referência
<i>Gapdh</i>	F: 5'ACGGCCGCATCTTCTTGCA3' R: CGCCCAAATCCGTCCACACCGA	(Giulietti et al., 2001)
<i>Actb</i>	F: GCTGAGAGGGAAATCGTGCGTG R: CCAGGGAGGAAGAGGATGCGG	(Volynets et al., 2016)
<i>Il12</i>	F: GAGGATACTCCCAACAGACC R: AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	(Giulietti et al., 2001)
<i>Il1b</i>	F: CTCCATGAGCTTTGTACAAGG R: TGCTGATGTACCAGTTGGGG	(Song et al., 2013)
<i>Tnf</i>	F: ACGTGGAAGTGGCAGAAGAG R: CTCCTCCACTTGGTGGTTTG	(Song et al., 2013)
<i>Il10</i>	F: GGTTGCCAAGCCTTATCGGA R: ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	(Giulietti et al., 2001)

#### 4.7.8 Análise Estatística

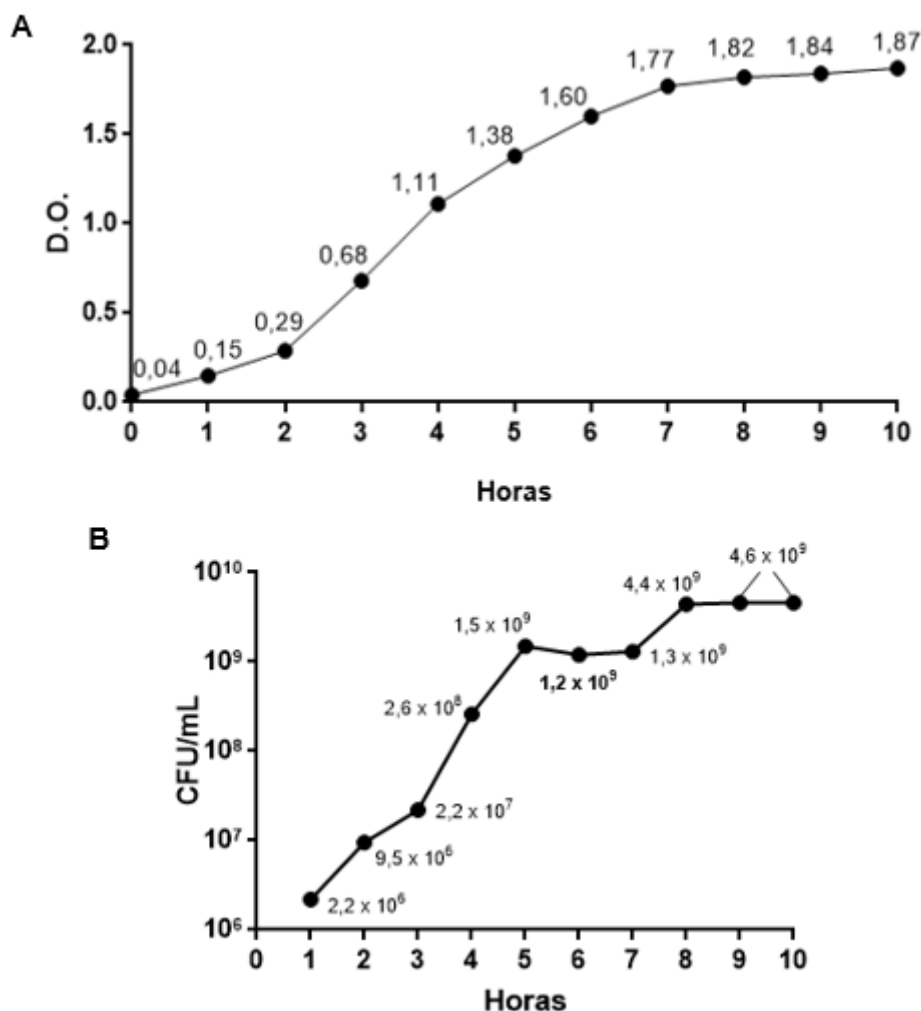
Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.01. Os dados são expressos como média  $\pm$  DP. Os resultados foram avaliados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, e se paramétricos foram analisados por ANOVA *one-way* e pós teste de *Tukey*. Os não paramétricos foram analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis* e pós teste de *Dunn's*. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como diferença estatística significativa.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Curva de crescimento CIDCA133 e número de unidades formadoras de colônias (UFC)

Foi avaliado o crescimento da cultura de CIDCA133 e verificou-se que o último ponto da fase logarítmica de crescimento foi observado após 7 horas de crescimento (Figura 9 A), Durante este intervalo, uma concentração de  $1,3 \times 10^9$  UFC/mL de CIDCA 133 foi encontrada (Figura 9 B). Para confecção das doses foi utilizado o penúltimo ponto da fase exponencial ( $DO_{600nm}=1,6$ ) equivalente a  $1,2 \times 10^9$  UFC/mL, para garantir que a maioria das células estivessem viáveis.

Na avaliação da viabilidade das doses de CIDCA133 após o processo de congelamento, foi observado que a linhagem permaneceu viável e na concentração de  $10^9$  UFC/mL por 4 dias em  $-80^\circ\text{C}$ .

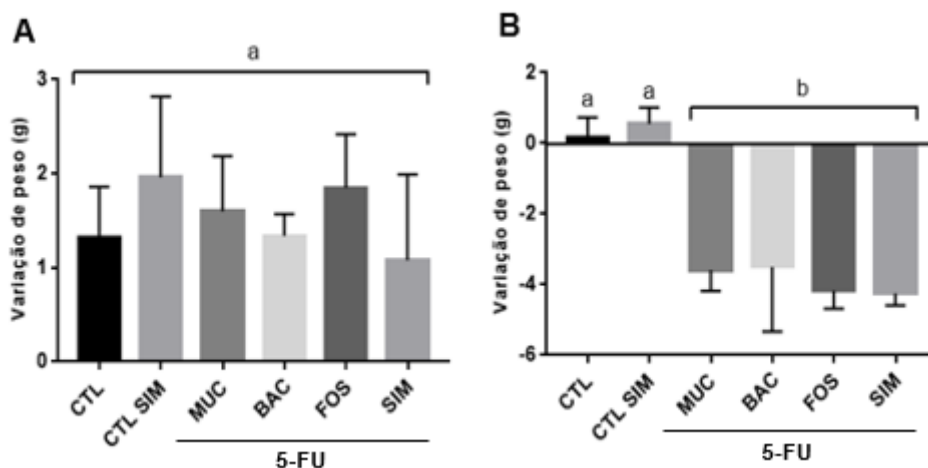


**Figura 9. Curva de crescimento de CIDCA133 (A) e Número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de CIDCA 133.**

Baseada em densidade óptica ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) medida de hora em hora por um período de 10 horas.

## 5.2 Consumo do Simbiótico, por gavagem, não influencia na perda de peso nem nos consumos alimentar e hídrico de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

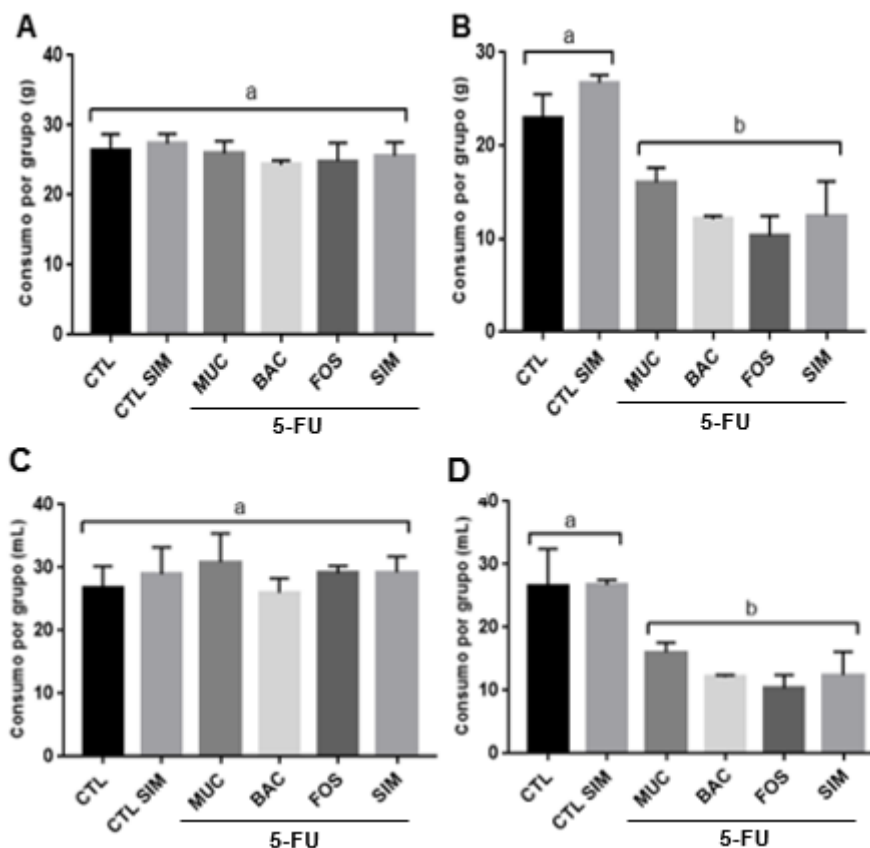
Antes da indução da mucosite não foi possível observar diferença significativa no peso dos animais entre os grupos investigados (Figura 10 A), como esperado. Após a indução da mesma foi observada perda significativa de peso nos animais dos grupos induzidos com 5-FU quando comparados aos animais dos grupos que receberam solução salina ( $p < 0,05$ ) (Figura 10 B). Dessa forma, o tratamento não foi capaz de prevenir a perda de peso.



**Figura 10. Variação de peso antes (A) e após (B) a indução da mucosite intestinal com 5-FU.**

Letras diferentes indicam diferença significativa por one-way ANOVA e *Tukey Multiple comparison Test* ( $p < 0,05$ ). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

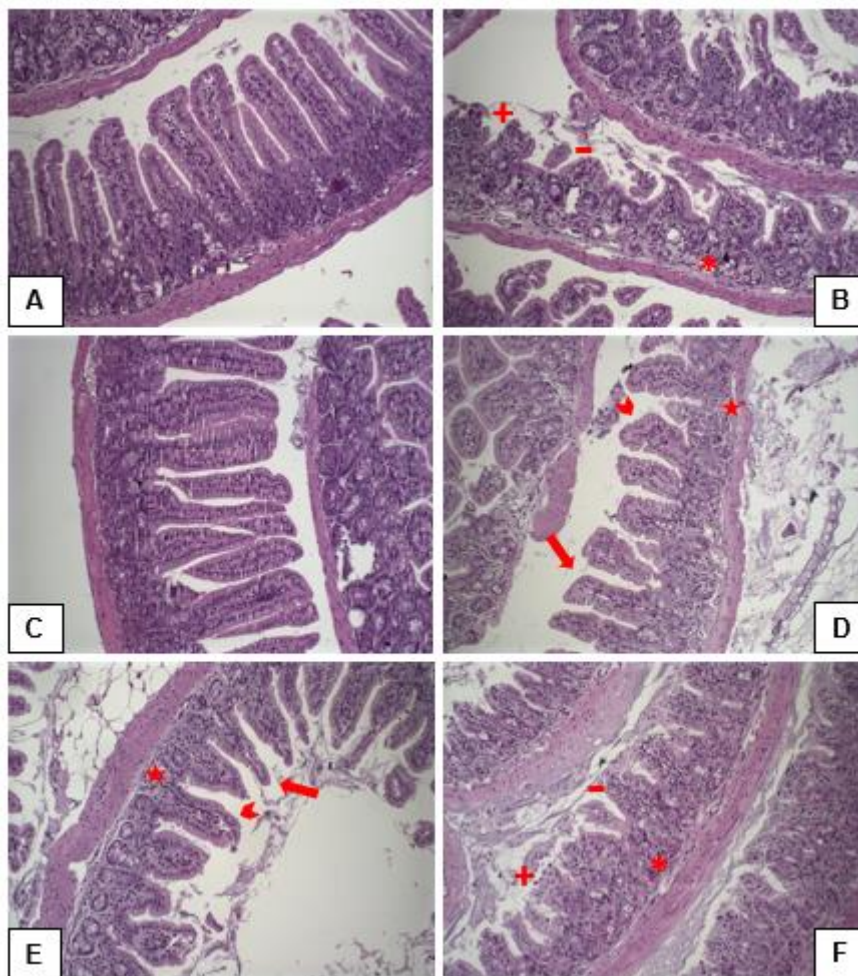
Em relação aos consumos hídrico e alimentar, antes da indução da mucosite não foram observadas diferenças significativas em ambos parâmetros (Figura 11 A e 11 C). Após a indução da mucosite observou-se redução significativa dos consumos alimentar e hídrico de todos os grupos tratados quando comparados aos controles CTL e CTL SIM ( $p < 0,05$ ) (Figura 11 B e Figura 11 D). Os tratamentos não foram capazes de prevenir a diminuição do consumo alimentar e hídrico.



**Figura 11. Variação dos consumos alimentar e hídrico antes da indução da mucosite intestinal com 5-FU (A e C) e após a indução da mucosite intestinal com 5-FU (B e D).** Letras diferentes indicam diferença significativa por one-way ANOVA e *Tukey Multiple comparison Test*) ( $p < 0,05$ ). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

### 5.3 O consumo de simbiótico por gavagem não foi capaz de melhorar os parâmetros histopatológicos no íleo de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

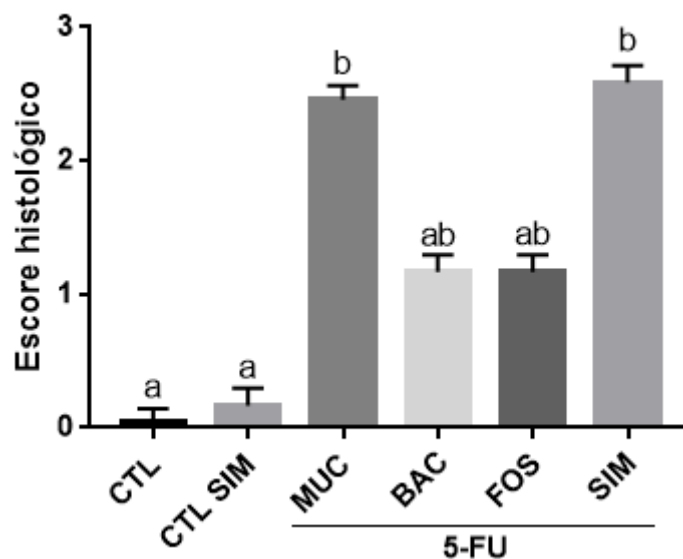
Na figura 12 observam-se as imagens histológicas do íleo dos seis grupos avaliados. Foram observados aspectos histológicos normais na mucosa intestinal dos animais dos grupos CTL e CTL SIM (Figura 12 A e C). No grupo MUC observam-se vilosidades encurtadas, rompimento da borda em escova e perda da arquitetura das criptas (Figura 12 B), como esperado. De forma inesperada, resultados similares ao grupo MUC foram observados no grupo SIM. Camundongos tratados com CIDCA 133 (BAC) e FOS apresentaram melhora na integridade da mucosa, com menor encurtamento das vilosidades e maior conservação da arquitetura das criptas (Figura 12 D e E).



**Figura 12. Análise histológica e morfométrica do íleo dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados CIDCA133, FOS e simbiótico (gavagem).**

Aspectos normais para os grupos CTL (A) e o grupo CTL SIM (C). Vilosidades encurtadas (+), rompimento da borda em escova (-) e perda da arquitetura das criptas (\*) estão presentes nos grupos MUC (B) e SIM (F). Preservação parcial das vilosidades (→), arquitetura das criptas (★) e da borda em escova (▶) são observados nos grupos BAC (D) e FOS (E). Objetiva 40x Coloração HE. CTL = controle, CTL SIM = controle simbiótico, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, SIM = simbiótico.

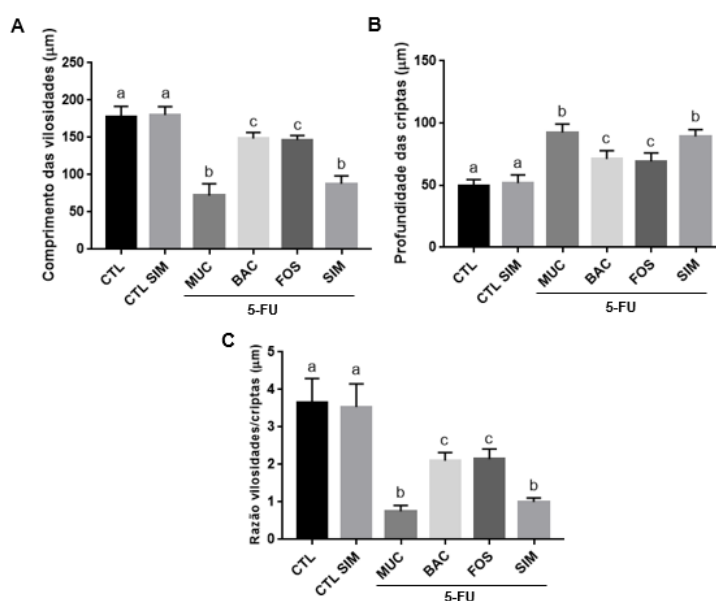
Na análise do escore histológico foi observado escore próximo a 0 nos grupos CTL e CTL SIM, indicando nenhuma ou mínimas alterações na mucosa destes animais o que era esperado por se tratarem de animais controles. Os grupos BAC e FOS não mostraram diferença significativa em relação aos grupos CTL e CTL SIM ( $p > 0,05$ ) e nestes grupos foi encontrado escore intermediário (entre 1 e 2). No grupo MUC foi encontrado escore entre 2 e 3 indicando presença de inflamação, o que pode ser observado pelas vilosidades atrofiadas, perda da arquitetura das criptas e rompimento da borda em escova. Surpreendentemente, os animais do grupo SIM apresentaram escore entre 2 e 3, não apresentando diferença significativa com o grupo MUC ( $p > 0,05$ ) (Figura 13).



**Figura 13. Efeito da administração CIDCA 133, FOS e do simbiótico (gavagem) no escore histológico.**

Letras diferentes indicam diferença significativa por *Kruskal-Wallis ANOVA* e *Dunn's Test* ( $p < 0,05$ ). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

A análise morfométrica demonstra a redução significativa no comprimento das vilosidades e um aumento significativo na profundidade das criptas do grupo MUC (Figura 14 A, B e C) em relação aos grupos CTL e CTL SIM ( $p < 0,05$ ). O grupo SIM não demonstrou diferença significativa com o grupo MUC ( $p > 0,05$ ) (Figura 14 A, B e C). Os tratamentos BAC e FOS foram capazes de preservar parcialmente a manutenção da altura das vilosidades, profundidade das criptas e razão vilosidades/criptas ( $p < 0,05$ ) (Figura 14 A, B e C).

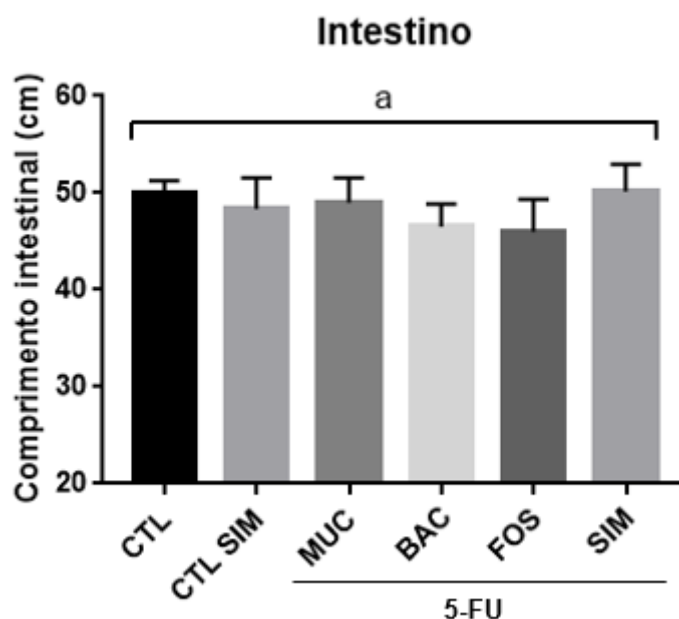


**Figura 14. Efeito da administração CIDCA 133, FOS e do simbiótico (gavagem) na análise morfométrica.**

Letras diferentes indicam diferença significativa por one-way ANOVA e *Tukey Multiple comparison Test* ( $p < 0,05$ ). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

#### 5.4 O consumo de simbiótico por gavagem não influencia no comprimento intestinal e no índice de inflamação de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.

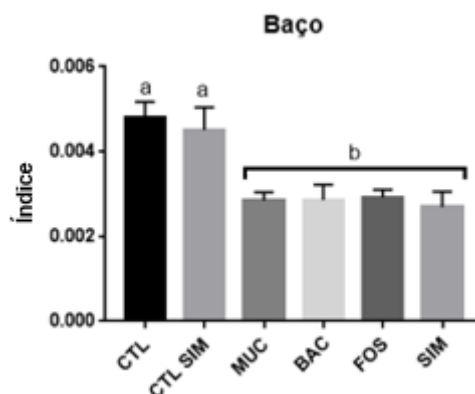
A avaliação do comprimento intestinal não mostrou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre todos os grupos avaliados (Figura 15).



**Figura 15. Efeito da administração, por gavagem, de CIDCA 133, FOS e do simbiótico no comprimento intestinal.**

Letras diferentes indicam diferença significativa por one-way ANOVA *Tukey Multiple comparison Test* ( $p < 0,05$ ). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

Adicionalmente, foi realizada a análise do índice de inflamação visceral e pode-se observar que os grupos MUC, BAC, FOS e SIM não apresentam diferença significativa entre si em relação aos órgãos avaliados (baço e timo) ( $p > 0,05$ ). Contudo, estes grupos apresentam diferença significativa quando comparados aos grupos controles (CTL e CTL SIM) ( $p < 0,05$ ) (Figura 16) como esperado.

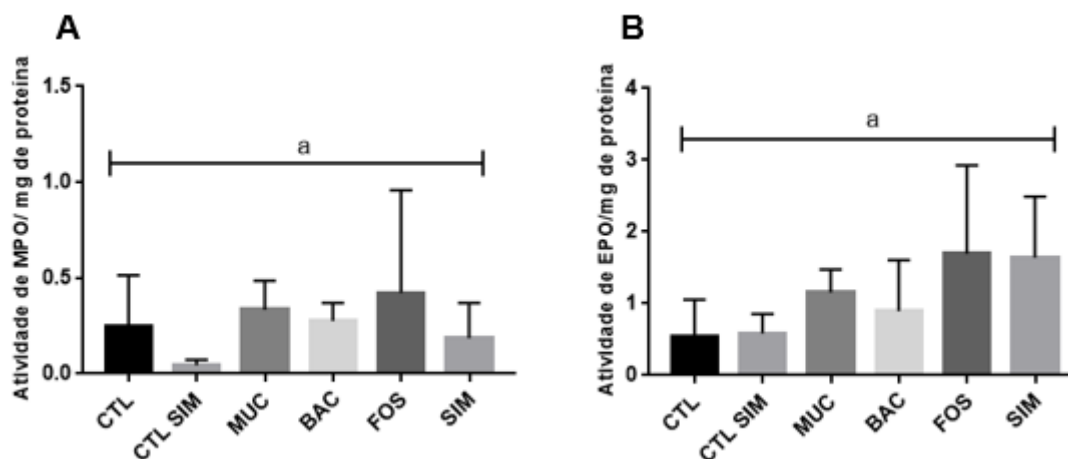


**Figura 16. Efeito da administração do simbiótico, por gavagem, sobre o índice visceral de inflamação em animais com mucosite intestinal.**

(A) Relação entre Peso do Baço e pelo peso do animal e (B) Relação entre peso do Timo e peso do animal. Letras diferentes indicam diferença significativa por one-way ANOVA e *Tukey Multiple comparison Test* ( $p < 0,05$ ). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

### 5.5 O consumo do simbiótico, por gavagem, não influencia no infiltrado inflamatório em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU

As enzimas MPO e EPO foram avaliadas no íleo, para determinação indireta do infiltrado de neutrófilos e eosinófilos. Em relação à atividade de MPO não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 17 A) ( $p > 0,05$ ). Este mesmo padrão foi encontrado quando se avaliou a atividade de EPO (Figura 17 B) ( $p > 0,05$ ).



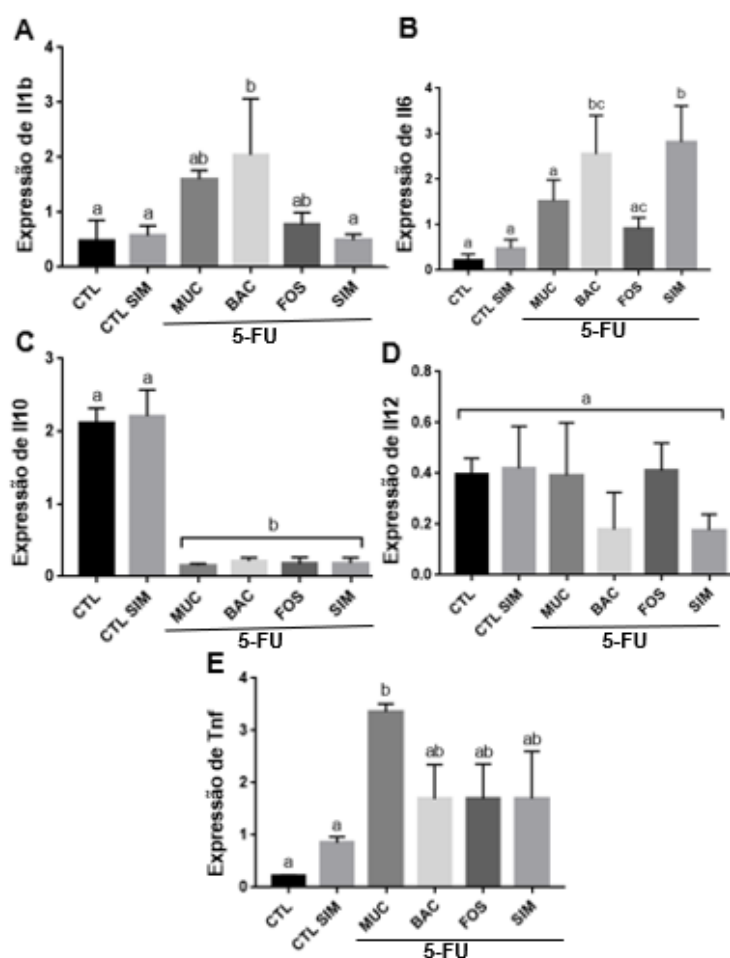
**Figura 17. Efeito da administração, por gavagem, de CIDCA 133, FOS e do simbiótico no infiltrado inflamatório no íleo de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e seus respectivos controles experimentais.**

(A) Infiltrado de neutrófilos (MPO) e (B) Infiltrado de eosinófilos (EPO). Letras diferentes indicam diferença significativa por one-way ANOVA e *Tukey Multiple comparison Test* ( $p < 0,05$ ). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

### 5.6 Consumo de Simbiótico, por gavagem, reduz a expressão gênica de *Il1b*

Os resultados da análise de expressão gênica relativa de marcadores inflamatórios na mucosa intestinal mostram que a administração do simbiótico mostrou não ser eficaz em reduzir as expressões relativas dos genes relacionados às citocinas pro-inflamatórias tais como Tnf e Il6 (Figura 18 B e E), e foi capaz de promover aumento na expressão gênica relativa do gene relacionado à citocina reguladora il10, quando comparado aos animais inflamados com 5-FU (grupo MUC) (Figura 18 C) ( $p > 0,05$ ). Quanto à expressão de Il1b, o simbiótico mostrou ser eficaz em reduzir a expressão gênica relativa dessa citocina pro-inflamatória ( $p < 0,05$ ) (Figura 18 A). A expressão de Il12 não mostrou diferença significativa entre os grupos avaliados ( $p > 0,05$ ) (Figura 18 D).

Surpreendentemente, o consumo de CIDCA 133 (grupo BAC) e do simbiótico (SIM) aumentaram a expressão gênica da citocina pro-inflamatória Il6 quando comparado ao grupo MUC (Figura 18 A) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 18. Efeito da administração, por gavagem, de CIDCA 133, FOS e simbiótico na expressão gênica relativa de Il1b, Il6, Il10, Il12 e Tnf no íleo de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e seus respectivos controles experimentais.**

Expressão gênica relativa de Il1b (A), Il6 (B), Il-10 (C), Il12 (D) e Tnf (E). Letras diferentes indicam diferença significativa por one-way ANOVA e *Tukey Multiple comparison Test* ( $p < 0,05$ ). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

**PARTE II - MÉTODO DE ADMINISTRAÇÃO:  
CONTINUOUS FEEDING**

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Linhagem bacteriana, condições de cultivo e estocagem**

Todo o procedimento foi realizado de acordo com o descrito no tópico 4.1 da parte I do presente manuscrito.

### **4.2 Prebiótico**

Todo o procedimento foi realizado de acordo com o descrito no tópico 4.4 da parte I do presente manuscrito.

### **4.3 Curva de crescimento de CIDCA 133 em meio de crescimento com Glicose x meio de crescimento com FOS**

Para avaliar se CIDCA 133 apresenta diferenças em sua taxa de crescimento usando somente glicose (presente no MRS) ou o prebiótico FOS como fonte energética, duas curvas de crescimento da CIDCA 133 foram realizadas. Uma curva de crescimento bacteriano foi feita em meio MRS (Kasvi®), ou seja, como fonte de carboidrato utilizou-se a glicose presente nesse meio de cultura. A outra curva foi realizada com o meio “MRS modificado” {10 g Peptona, 10 g Extrato de carne, 5 g Extrato de levedura, 1 mL Tween 80, Citrato de Amônio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>7</sub>] 2 g, Acetato de Sódio (CH<sub>3</sub>COONa) 5 g, Sulfato de Magnésio (MgSO<sub>4</sub>) 0,1g, Sulfato de Manganês (MnSO<sub>4</sub>) 0,05g, Fosfato Monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 2 g, pH 6,5, para 1000 mL de água destilada}, no qual a fonte de carbono glicose foi substituída pelo prebiótico FOS (NewNutrition® da Nutratec). Para tanto foram adicionados 2 g de FOS, diluído em água destilada e filtrado em filtro 0,22µm (Kasvi®).

Dessa forma, 50 µL da cultura estoque foram adicionados em 15 mL de MRS, a 37°C em estufa bacteriológica, sem agitação, durante 16 horas, em microaerobiose para ativação da cultura. Em seguida, foi feito um inóculo da bactéria crescida em meio MRS convencional e um inóculo em meio MRS modificado, partindo de uma absorbância de 0,04 (DO<sub>600nm</sub>). A cada 1 hora a densidade óptica das culturas foi mensurada, 100 µL dessas culturas foram retirados e após diluição seriada (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>) as amostras foram plaqueadas em MRS-ágar (1,5%) e incubadas em estufa microbiológica a 37°C, por 48 horas. Após a incubação foram realizadas as contagens das colônias de cada placa referente a cada um dos pontos da curva de crescimento, e número de UFC/mL foi calculado. As análises foram realizadas tanto em duplicata biológica como técnica. Para o cálculo do número de UFC/mL foi aplicada a seguinte fórmula:

$$UFC = \frac{N^{\circ} \text{ de colônias contadas} \times \text{fator de diluição}}{\text{Volume (mL) plaqueado}}$$

#### 4.4 Animais

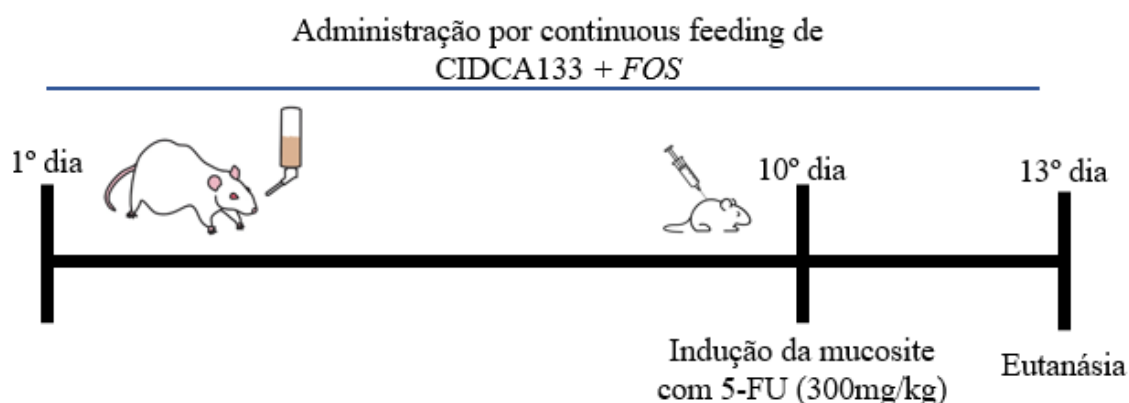
Todo o procedimento foi realizado de acordo com o descrito no tópico 4.5 da parte I do presente manuscrito. Os protocolos experimentais utilizados foram realizados de forma a garantir o maior bem-estar dos animais durante todo o período, de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMG (protocolo nº 34/2021, em anexo).

#### 4.5 Delineamento experimental e Indução da mucosite intestinal por 5-FU

Para a indução de mucosite intestinal, os animais dos grupos MUC, BAC, FOS e SIM, receberam injeção intraperitoneal contendo 300mg/kg de 5-FU (Faudfluor, Libbs®), no 10º dia de tratamento Carvalho et al., (2017). Já os animais dos grupos CTL e CTL SIM receberam injeção intraperitoneal de solução salina 0,9% com mesmo volume. No 13º dia os animais foram eutanasiados seguindo o protocolo descrito na para realização das análises (Figura 19).

Os animais foram distribuídos em 6 grupos (n= 6 animais) sendo: **Controle (CTL)**: MRS modificado sem adição de FOS e sem indução de mucosite. **Mucosite (MUC)**: MRS modificado sem adição de FOS e com indução de mucosite. **Tratado Bactéria (BAC)**: MRS contendo CIDCA 133 e com indução de mucosite. **Tratado FOS (FOS)**: MRS modificado contendo FOS e com indução de mucosite. **Controle Simbiótico (CTL SIM)**: MRS modificado contendo FOS e CIDCA 133 e sem indução de mucosite. **Tratado Simbiótico (SIM)**: MRS modificado contendo FOS e CIDCA 133 e com indução de mucosite (Tabela 5).

Os grupos CTL e MUC receberam meio modificado sem adição de FOS e o grupo BAC recebeu MRS convencional (Kasvi®), o grupo FOS e os grupos SIM receberam MRS modificado com FOS preparado como descrito no tópico 4.3 da Parte II.



**Figura 19. Delineamento experimental pela via de administração *continuous feeding*.**

Os animais receberam, por *continuous feeding*, MRS e tratamentos conforme especificados na tabela 5, durante 12 dias. No 10º dia de experimentação foram administrados 300 mg/kg de 5-FU (ou solução salina) por via *ip*. Os animais foram eutanasiados no 13º dia por aprofundamento anestésico seguido de deslocamento cervical.

**Tabela 4. Grupos experimentais e tratamentos realizados por *continuous feeding***

Grupos	MRS modificado sem FOS	MRS convencional	MRS modificado com FOS	CIDCA133	5-FU intraperitoneal
CTL	+	-	-	-	-
CTL SIM	-	-	+	+	-
MUC	+	-	-	-	+
BAC	-	+	-	+	+
FOS	-	-	+	-	+
SIM	-	-	+	+	+

Grupo com tratamento = (+). Grupo sem tratamento = (-) CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

## 4.6 Análises

### 4.6.1 Consumo alimentar/hídrico e variação ponderal

Todo o procedimento foi realizado de acordo com o descrito no tópico 4.7.1 da parte I do presente manuscrito.

### 4.6.2 Análise do comprimento intestinal e taxa de inflamação visceral

Todo o procedimento foi realizado de acordo com o descrito no tópico 4.7.2 da parte I do presente manuscrito.

### 4.6.3 Análise Histológica

Todo o procedimento foi realizado de acordo com o descrito no tópico 4.7.3 da parte I do presente manuscrito.

#### 4.6.4 Análise do infiltrado inflamatório por meio da atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO)

Todo o procedimento foi realizado de acordo com o descrito no tópico 4.7.4 da parte I do presente manuscrito.

#### 4.6.5 Análise da expressão gênica relativa de marcadores inflamatórios

Todo o procedimento foi realizado de acordo com o descrito no tópico 4.7.5 da parte I do presente manuscrito.

##### 4.6.5.1 Extração do RNA

Todo o procedimento foi realizado de acordo com o descrito no tópico 4.7.5.1 da parte I do presente manuscrito.

##### 4.6.5.2 Síntese cDNA

Todo o procedimento foi realizado de acordo com o descrito no tópico 4.7.5.2 da parte I do presente manuscrito.

##### 4.6.5.3 Amplificação do cDNA por PCR em tempo real

Todo o procedimento foi realizado de acordo com o descrito no tópico 4.7.5.3 da parte I do presente manuscrito. O cDNA sintetizado na parte II, foi amplificado pela técnica de PCR em tempo real (qPCR), utilizando primers específicos (Tabela 5).

**Tabela 5. Primers utilizados para o PCR em tempo real (qPCR) – Parte II**

Alvo	Sequência	Referência
<i>Gapdh</i>	F: ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA R: CGCCAAATCCGTCCACACCGA	(Giulietti et al., 2001)
<i>Actb</i>	F: GCTGAGAGGGAAATCGTGCGTG R: CCAGGGAGGAAGAGGATGCCG	(Volynets et al., 2016)
<i>Il12</i>	F: GAGGATACCACTCCCAACAGACC R: AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	(Giulietti et al., 2001)
<i>Il1b</i>	F: CTCCATGAGCTTTGTACAAGG R: TGCTGATGTACCAGTTGGGG	(Song et al., 2013)
<i>Tnf</i>	F: ACGTGGAAGTGGCAGAAGAG R: CTCCTCCACTTGGTGGTTTG	(Song et al., 2013)
<i>Il10</i>	F: GGTTGCCAAGCCTTATCGGA R: ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	(Giulietti et al., 2001)
<i>Il6</i>	F: GAGGATACCACTCCCAACAGACC R: AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	(Giulietti et al., 2001)
<i>Tgfb</i>	F: CAAGGGCTACCATGCCAACT R: GTACTGTGTGTCAGGCTCCAA	(Giulietti et al., 2001)
<i>Muc2</i>	F: GATGGCACCTACCTCGTTGT R: GTCCTGGCACTTGTGGAAAT	(Volynets et al., 2016)
<i>Ocludin</i>	F: CCACCTCTGTCCAGCTCTTC R: CACCGGAGTGATGGTTTTCT	(Volynets et al., 2016)

<b>Tlr4</b>	F: ATGGCATGGCTTACACCACC R: GAGGCCATTTTTGTCTCCACA	(Chang et al., 2020)
<b>Tlr2</b>	F: ACAATAGAGGGAGACGCCTTT R: AGTGTCTGGTAAGGATTCCCAT	(Chang et al., 2020)

#### 4.6.6 Permeabilidade Intestinal

A permeabilidade intestinal foi realizada 72 horas após a administração de 5-FU. Para realização desta análise utilizou-se o método baseado no emprego do ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) marcado com o radioisótopo tecnécio-99m (<sup>99m</sup>Tc-DTPA). A permeabilidade intestinal foi avaliada pela determinação da radioatividade no sangue após a administração oral, por gavagem, de <sup>99m</sup>Tc-DTPA, seguindo o protocolo de Generoso et al, (2011).

Para isso, os animais receberam, por gavagem, 0,1mL da solução contendo 18,5MBq (MegaBecquerel) de <sup>99m</sup>Tc-DTPA. Após 4 horas da gavagem os animais foram anestesiados com solução de xilazina (15mg/kg) e cloridrato de cetamina (80mg/kg), o sangue foi coletado via punção da veia axilar, colocado em tubos para a contagem da radioatividade em contador de radiação gama (Perkin Elmer Wallac, 1480 Wizard 3). Utilizou-se a seguinte fórmula para a determinação do % dose de <sup>99m</sup>Tc-DTPA no sangue:

$$\% \text{ dose de } ^{99m}\text{Tc-DTPA no sangue} = \frac{\left(\frac{\text{Cpm}}{\text{g}} \text{ de sangue}\right)}{\text{Cpm da dose (Padrão) administrada}} \times 100$$

\*cpm= contagem por minuto

#### 4.6.7 Dosagem de sIgA

Para a dosagem de sIgA o intestino delgado foi removido e todo conteúdo luminal foi retirado e diluído com PBS 0,01M (pH 7,2) suplementado com inibidor de protease (1μM de fluoreto de fenilmetilsulfonil - PMSF), na proporção de 2 mL da solução para cada 500 mg de fluido intestinal. Após armazenamento no gelo, as amostras foram centrifugadas (5000 rpm, a 4°C, por 30 minutos) e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80°C para a dosagem da referida imunoglobulina utilizando o método de ELISA.

Para a titulação de IgA, microplacas (Nunc-Immuno, MaxiSorp) foram revestidas utilizando anticorpo anti-IgA de camundongos produzidos em cabra (M-8769, Sigma®) diluído 100X em PBS 0,01M + tween 20 (0,05%) durante 18 horas a 4 °C. Em seguida, a placa foi lavada 5 vezes com PBS 0,1 M. Os fluidos intestinais previamente diluídos (1:500) em PBS 0,01M foram adicionados à placa e incubados à temperatura ambiente por 1 hora. Após isso a placa foi lavada 5 vezes com solução PBS 0,1 M. Para a detecção da sIgA foi utilizado anticorpo (100 μL) conjugado com peroxidase anti-IgA de camundongo (A-4789, Sigma®) e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 1

hora sendo posteriormente lavada. Em seguida, a placa foi revestida com 100  $\mu$ L de O-fenilenodiamina - OPD (1mg/mL Sigma®) e 0,04% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Vetec®), e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente a reação foi interrompida pela adição de 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich®) 1M. As leituras foram realizadas em um leitor de microplacas (Bio-Rad Laboratories). A concentração de sIgA total foi determinada utilizando um padrão de IgA purificado (0106-01, Southern Biotechnology®); a concentração de sIgA ( $\mu$ g/mL de fluido intestinal), foi determinada a partir de uma curva padrão do anticorpo anti- IgA (M-8769, Sigma®).

#### **4.6.9 Análise Estatística**

Todo o procedimento foi realizado de acordo com o descrito no tópico 4.7.8 da parte I do presente manuscrito.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Cinética de crescimento de CIDCA 133 influenciada por FOS**

Após crescimento de CIDCA 133 em meio MRS e meio MRS modificado usando glicose ou o prebiótico FOS, respectivamente, foi possível observar que, em comparação ao MRS convencional, a CIDCA 133 também é capaz de crescer em meio contendo FOS como única fonte de carbono porém a taxa de crescimento foi menor (Figura 20 A e B).

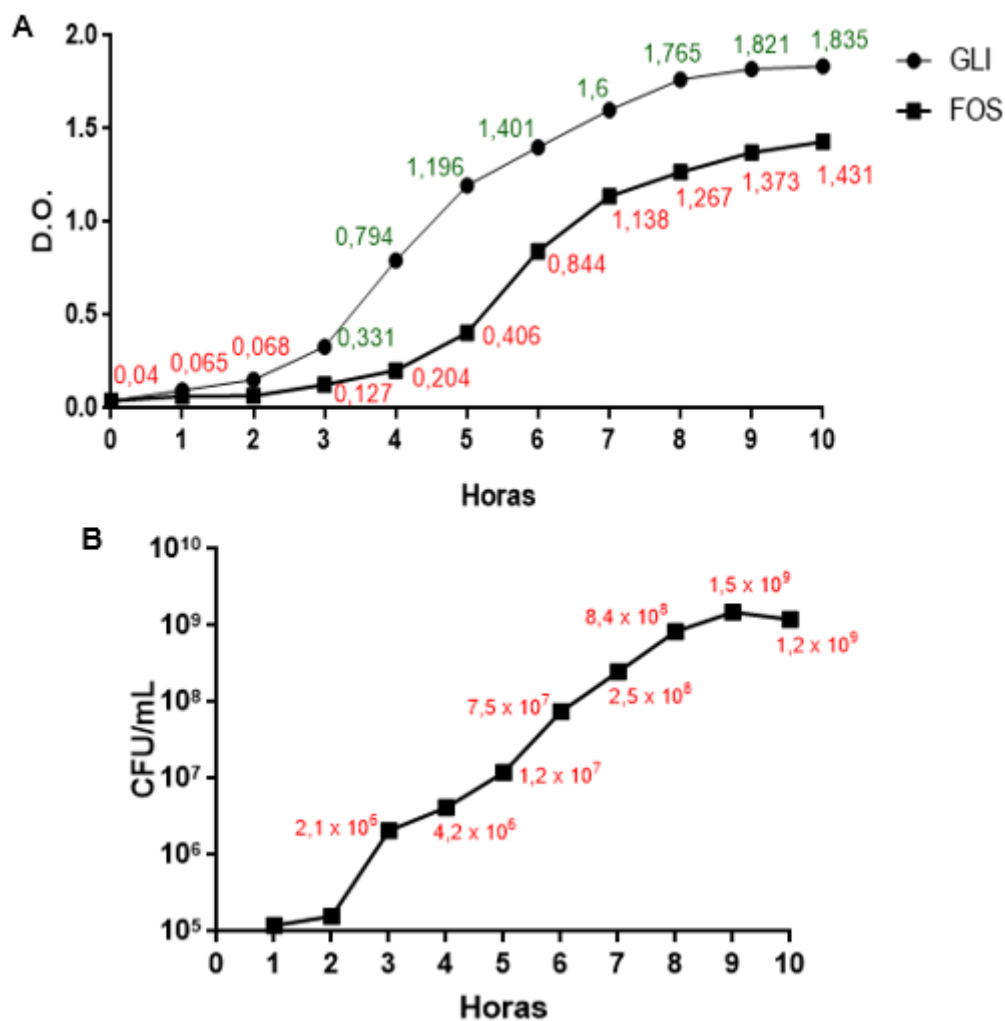
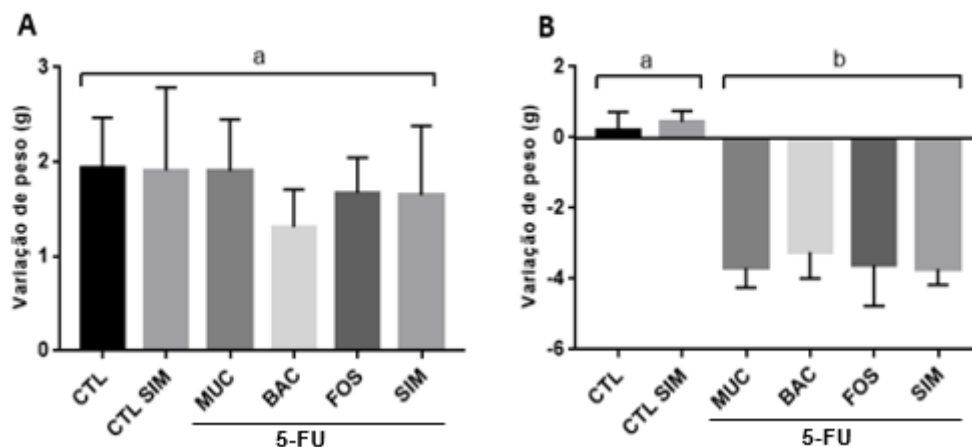


Figura 20. Cinética de crescimento de CIDCA133 em meio MRS convencional (GLI) e meio MRS modificado sem glicose e suplementado com FOS (A) e Número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de CIDCA 133 crescida em meio modificado com FOS (B).

A absorbância  $DO_{(600nm)}$  foi medida de hora em hora por um período de 10 horas.

## 5.2 Consumo de Simbiótico por *continuous feeding* não influencia na perda de peso e no consumo alimentar de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU

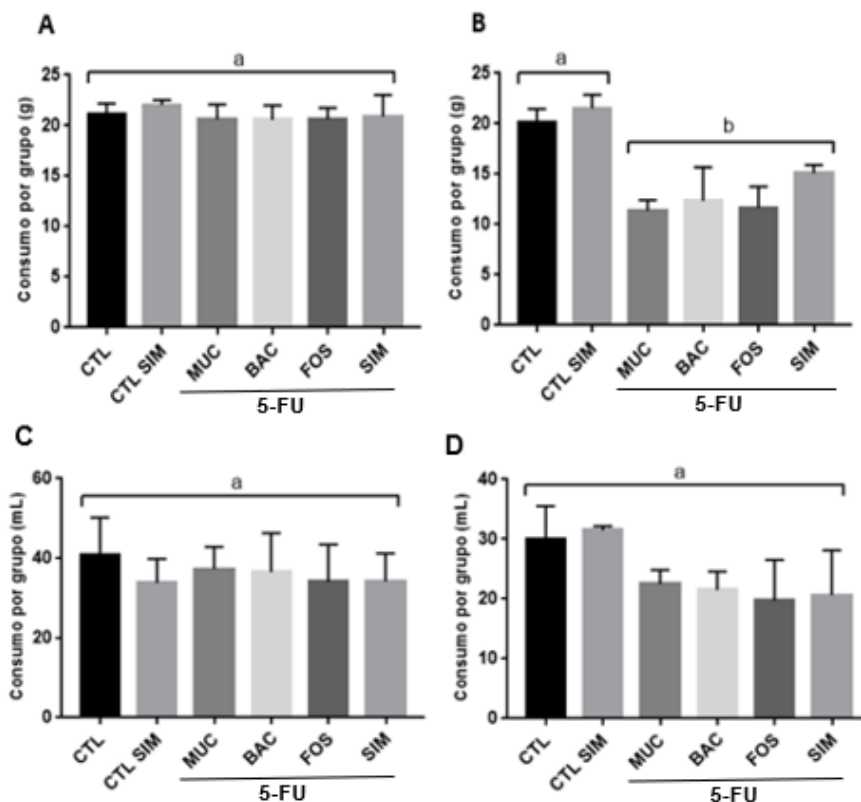
Não se observou diferença significativa no peso dos animais entre os grupos investigados antes da indução da mucosite, como esperado (Figura 21 A). Após a indução da mucosite foi observada perda significativa de peso nos animais dos grupos que foram induzidos com 5-FU quando comparados aos animais dos grupos que não tiveram a indução da mucosite ( $p > 0,05$ ) (Figura 21 B).



**Figura 21. Variação de peso antes (A) e depois (B) da indução da mucosite com 5-FU.**

Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) por one-way ANOVA *Tukey Multiple comparison Test*). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

Os consumos de ração e hídrico foram monitorados durante os 13 dias do protocolo experimental. Antes da indução da mucosite não foram observadas diferenças significativas em ambos os parâmetros (Figuras 22 A e 22 C), como esperado. Após a indução da mucosite, observou-se redução significativa do consumo alimentar dos grupos MUC, BAC, FOS e SIM comparados aos controles CTL e CTL SIM ( $p < 0,05$ ) (Figura 22 B) e não se observou diferença significativa no consumo hídrico (Figura 22 D) entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 22 D).

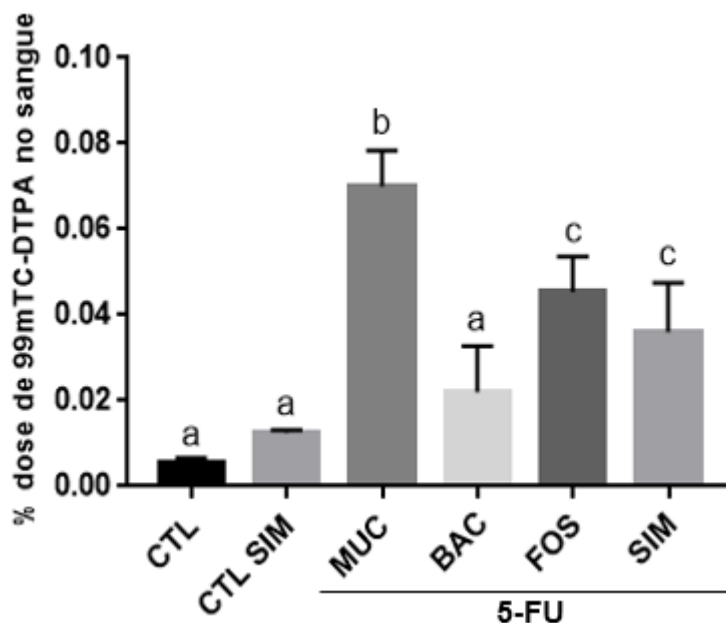


**Figura 22. Variação dos consumos alimentar e hídrico antes da indução da mucosite intestinal (A e C) e após a indução da mucosite intestinal com 5-FU (B e D).**

Letras diferentes indicam diferença significativa por one-way ANOVA e *Tukey Multiple comparison Test* ( $p < 0,05$ ). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

### 5.3 Consumo de Simbiótico por *continuous feeding* atenua o aumento da permeabilidade intestinal de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Como forma de avaliar a integridade da barreira epitelial, a permeabilidade intestinal foi mensurada medindo-se a difusão de radioatividade no sangue após a administração oral de  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA. Conforme esperado, os animais inflamados com 5-FU (grupo MUC) apresentaram uma maior permeabilidade intestinal em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). O tratamento simbiótico (SIM), assim como a bactéria probiótica (BAC) e o prebiótico (FOS) isoladamente, foram capazes de reduzir significativamente a permeabilidade intestinal dos animais que receberam o antineoplásico ( $p < 0,05$ ) (Figura 23).

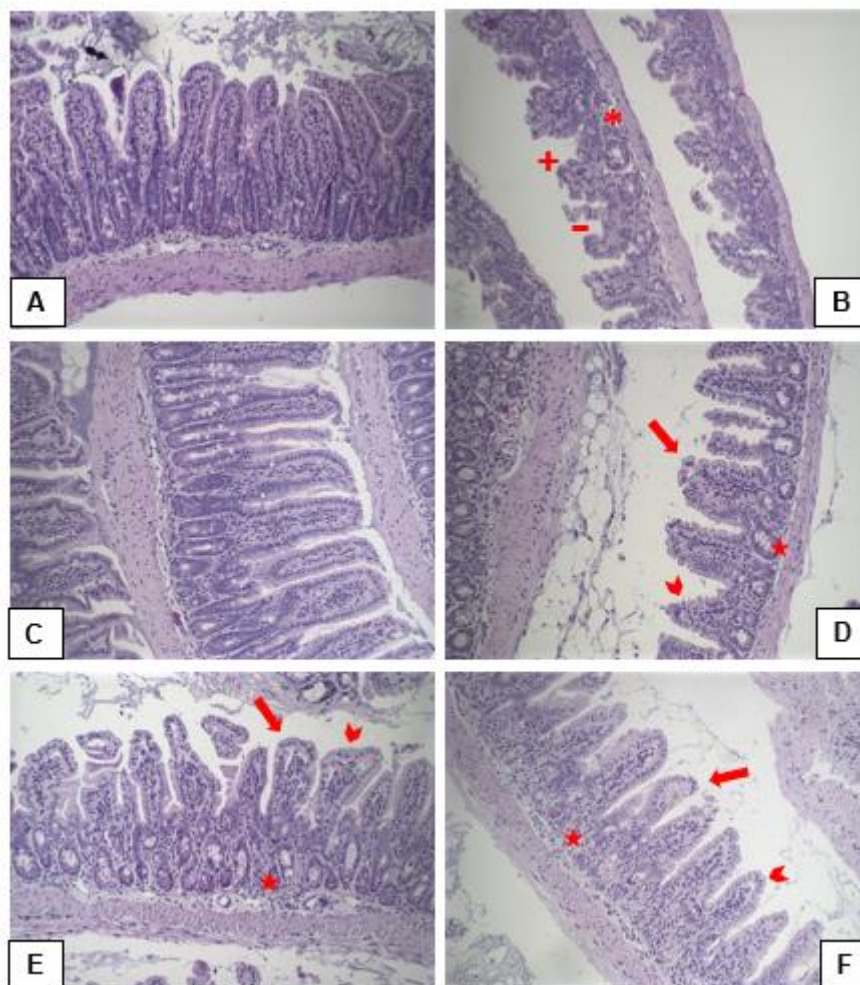


**Figura 23.** Efeito da administração por *continuous feeding* de CIDCA 133, FOS e do simbiótico na permeabilidade intestinal 72 horas após a indução da mucosite.

Letras diferentes indicam diferença significativa por one-way ANOVA e *Tukey Multiple comparison Test* ( $p < 0,05$ ). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

#### **5.4 Consumo de Simbiótico por *continuous feeding* melhora os aspectos histopatológicos de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU**

A figura 24 apresenta as imagens histológicas do íleo dos seis grupos avaliados. Foram observados aspectos histológicos normais, com arquitetura epitelial conservada na mucosa intestinal dos animais dos grupos controle CTL e CTL SIM (Figura 24 A e C). No grupo MUC observou-se vilosidades encurtadas, rompimento da borda em escova e perda da arquitetura das criptas (Figura 24 B), o que representa que a indução da mucosite nos animais foi bem sucedida. Animais dos grupos BAC e FOS apresentaram melhora na integridade da mucosa (Figura 24 D e E), mas os animais que receberam o simbiótico (SIM) apresentaram maior preservação do epitélio quando comparados aos grupos MUC, inclusive apresentando preservação da borda em escova (Figura 24 F).



**Figura 24. Análise histológica e morfométrica do íleo dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados CIDCA133, FOS e simbiótico por *continuous feeding*.**

Aspectos normais para os grupos CTL (A) e o grupo CTL SIM (C). Vilosidades encurtadas (+), rompimento da borda em escova (-) e perda da arquitetura das criptas (\*) estão presentes no grupo MUC (B). Preservação parcial das vilosidades (→) e arquitetura das criptas (★) são observados nos grupos BAC (D) e FOS (E), já no grupo SIM (E) há uma maior preservação das vilosidades (→), arquitetura das criptas (★) e preservação da borda em escova (▶). Coloração HE. CTL = controle, CTL SIM = controle simbiótico, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, SIM = simbiótico.

No sistema de escore foi observado escore próximo de 0 nos grupos CTL e CTL SIM, indicando ausência de alterações na mucosa destes animais, como esperado em animais saudáveis. No grupo MUC foi encontrado score entre 2 e 3, indicando presença de inflamação, o que pode ser observado pelas vilosidades atrofiadas, perda da arquitetura das criptas e rompimento da borda em escova (Figura 25). Nos grupos BAC e FOS foi encontrado escore entre 1 e 2; já no grupo SIM o escore foi próximo a 1 (Figura 25), manifestando notória melhoria no epitélio intestinal dos animais. Assim, os resultados aqui apresentados demonstram que a administração do simbiótico foi capaz de atenuar as alterações histopatológicas e morfométricas no íleo de animais inflamados com 5-FU.

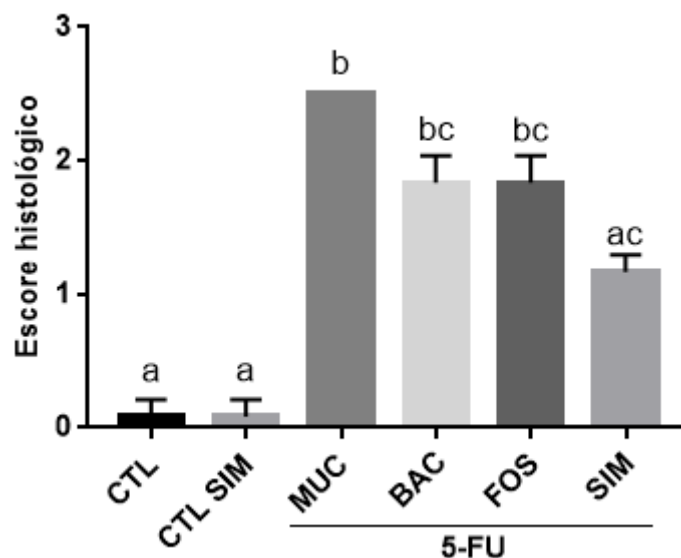
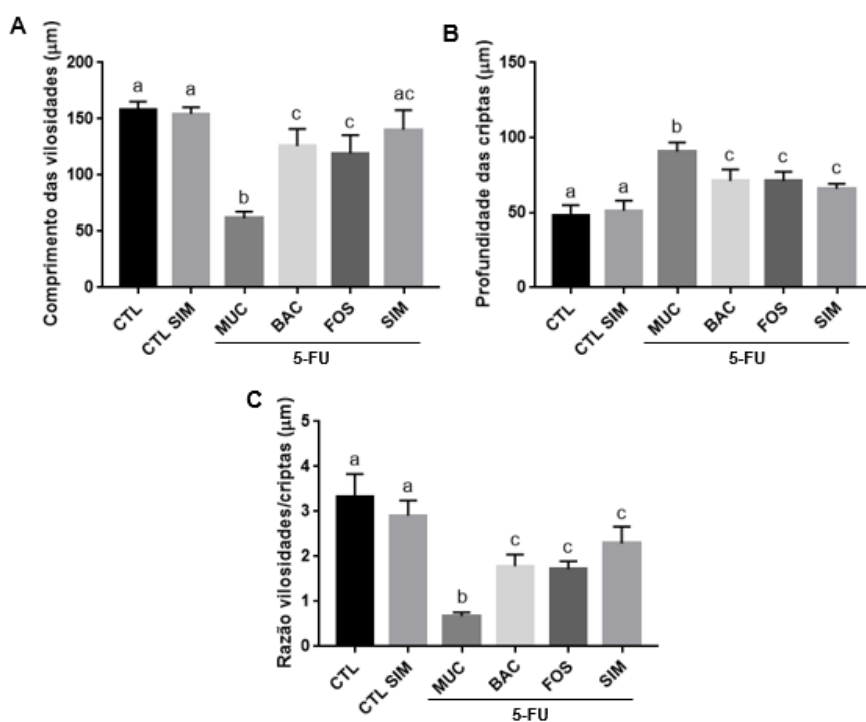


Figura 25. Efeito da administração por *continuous feeding* de CIDCA 133, FOS e do simbiótico no escore histológico.

Letras diferentes indicam diferença significativa por *Kruskal-Wallis ANOVA* e *Dunn's Test* ( $p < 0,05$ ). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

A análise morfométrica demonstrou a redução significativo do comprimento das vilosidades e um aumento significativo da profundidade das criptas (Figura 26 A, B e C) do grupo MUC em relação aos grupos CTL e CTL SIM ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos BAC, FOS e SIM foram capazes de preservar parcialmente a manutenção da altura das vilosidades, profundidade das criptas e razão das vilosidades/criptas ( $p < 0,05$ ) sendo que o grupo SIM apresentou melhores resultados (Figura 26 A, B e C).

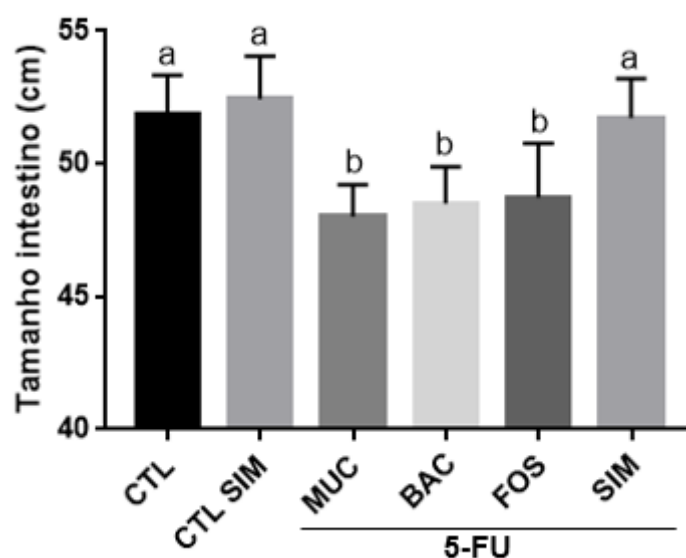


**Figura 26. Efeito da administração por *continuous feeding* de CIDCA 133, FOS e do simbiótico na análise morfométrica.**

Letras diferentes indicam diferença significativa por one-way ANOVA e *Tukey Multiple comparison Test* ( $p < 0,05$ ). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

### 5.5 Consumo de Simbiótico administrado por *continuous feeding* previne o encurtamento do intestino delgado de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU

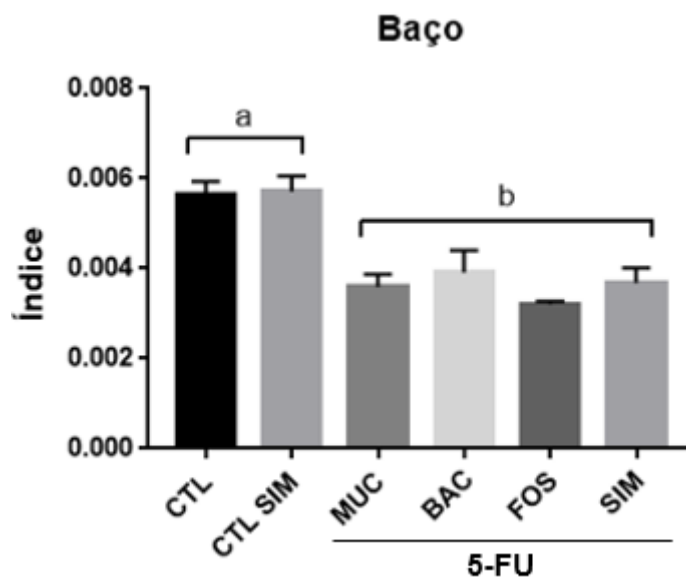
Na avaliação do comprimento intestinal observou-se diminuição significativa do tamanho intestinal nos grupos inflamados com 5-FU (MUC). No entanto, em relação aos outros tratamentos fornecidos (BAC e FOS), a administração do simbiótico teve efeito positivo em atenuar esse encurtamento quando comparado ao grupo MUC ( $p < 0,05$ ). Assim, o simbiótico mostrou-se eficaz em prevenir o encurtamento do comprimento intestinal ocasionado pelo quimioterápico 5-FU (Figura 27).



**Figura 27. Efeito da administração por *continuous feeding* de CIDCA 133, FOS e do simbiótico na avaliação do comprimento intestinal.**

Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) por one-way ANOVA *Tukey Multiple comparison Test*). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

Em relação a inflamação visceral do baço, é possível observar que tanto o tratamento com FOS e BAC, como o tratamento com simbiótico não foram capazes de atenuar o índice de inflamação visceral do baço em animais inflamados com 5-FU (MUC) ( $p > 0,05$ ) (Figura 28).



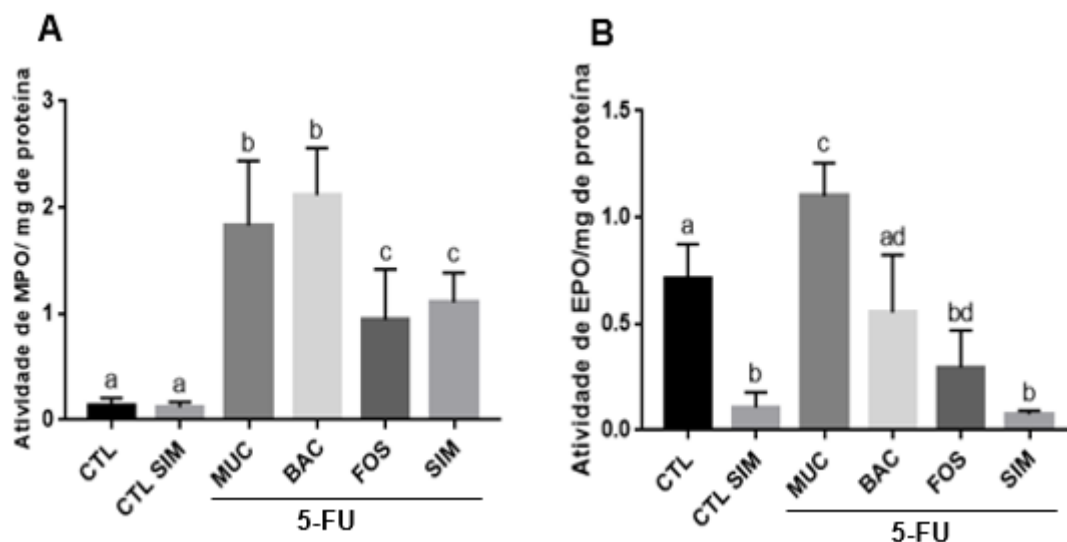
**Figura 28. Efeito da administração por continuous feeding de CIDCA 133, FOS e do simbiótico na avaliação do índice do baço.**

Letras diferentes indicam diferença significativa por one-way ANOVA e *Tukey Multiple comparison Test* ( $p < 0,05$ ). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

### **5.6 Consumo de Simbiótico por *continuous feeding* reduz o infiltrado inflamatório em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU**

As enzimas MPO e EPO foram avaliadas no íleo, para determinação indireta do infiltrado de neutrófilos e eosinófilos, respectivamente. A figura 29 A mostra a atividade de MPO aumentada no grupo MUC, como esperado. Os grupos FOS e SIM apresentam diferença estatística significativa quando comparados ao grupo MUC ( $p < 0,05$ ), mostrando-se eficazes na prevenção do infiltrado de neutrófilos na mucosa intestinal. No entanto, os animais inflamados que receberam CIDCA 133, apresentaram valores de infiltração de neutrófilos estatisticamente iguais ao grupo MUC ( $p > 0,05$ ).

No que se refere à atividade de EPO (Figura 29 B), foi possível observar um aumento da atividade dessa enzima nos animais do grupo MUC em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). A administração de FOS, CIDCA 133 (BAC) e do simbiótico (SIM) foram capazes de prevenir a atividade dessa enzima no íleo dos animais inflamados, demonstrando, portanto, redução do infiltrado inflamatório na mucosa intestinal ( $p < 0,05$ ).

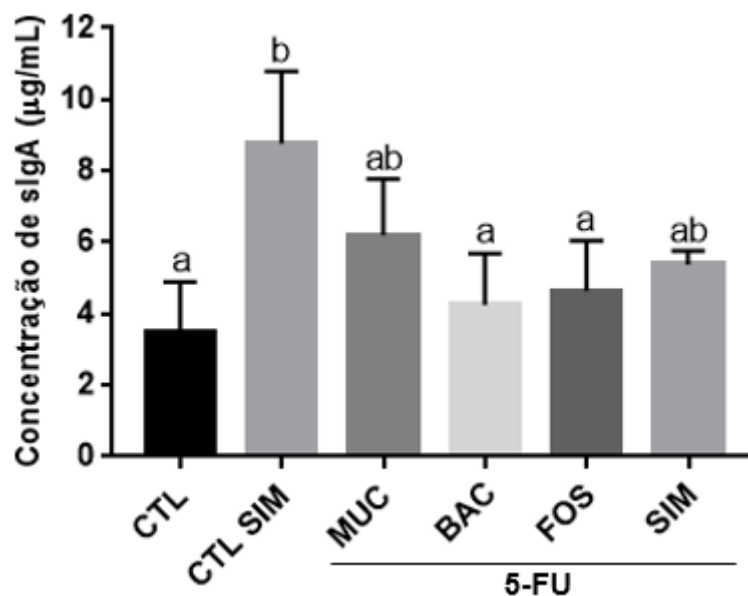


**Figura 29. Efeito da administração por *continuous feeding* de CIDCA 133, FOS e do simbiótico no infiltrado inflamatório no íleo de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e seus respectivos controles experimentais.**

(A) Infiltrado de neutrófilos (MPO) e (B) Infiltrado de eosinófilos (EPO). Letras diferentes indicam diferença significativa por one-way ANOVA e *Tukey Multiple comparison Test* ( $p < 0,05$ ). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

### **5.7 Consumo de Simbiótico por *continuous feeding* não reduz os níveis de IgA secretória (sIgA) de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU**

Na análise dos níveis de sIgA foi observado aumento significativo no grupo CTL SIM em relação ao CTL ( $p < 0,05$ ) e não houve diferença entre o grupo CTL SIM e os grupos MUC e SIM ( $p > 0,05$ ). Os grupos BAC e FOS foram capazes de manter os níveis de sIgA similares ao CTL ( $p > 0,05$ ) (Figura 30).



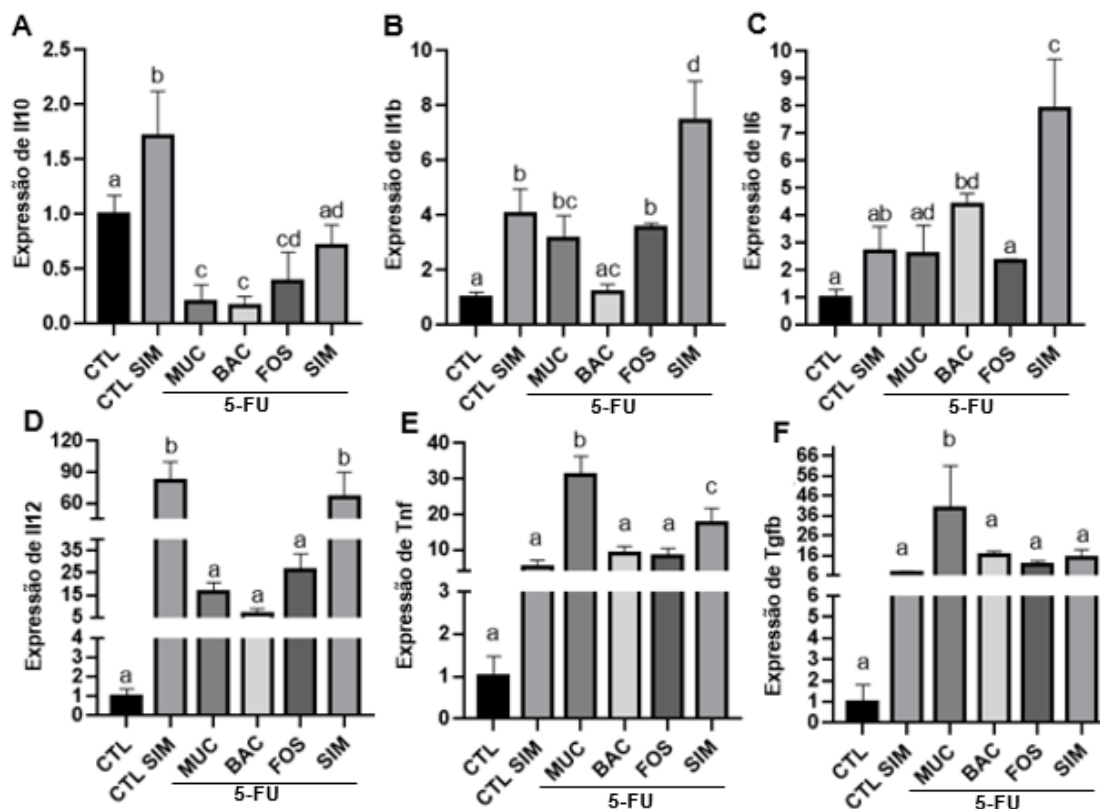
**Figura 30.** Efeito da administração por *continuous feeding* de CIDCA 133, FOS e do simbiótico na dosagem de sIgA intestinal.

Letras diferentes indicam diferença significativa por one-way ANOVA e *Tukey Multiple comparison Test* ( $p < 0,05$ ). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

### 5.8 Consumo de Simbiótico por *continuous feeding* aumenta a expressão gênica de *Il10* e reduz a expressão gênica de *Tnf* e *Tgfb* em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Em relação à expressão de marcadores anti-inflamatórios, foi possível observar uma redução na expressão gênica de *Tgfb*, e um aumento na expressão gênica de *il10* após o consumo do simbiótico (SIM), quando comparado ao grupo MUC ( $p < 0.05$ ) (Figura 31 A, E e F). No entanto, o tratamento com o simbiótico aumentou a expressão dos marcadores inflamatórios *Il1b*, *Il6*, *Il12* e *Tnf* quando comparado ao grupo controle ( $p < 0.05$ ) (Figura 31 B,C e D).

Ao avaliar o efeito dos tratamentos com FOS e BAC, foi possível observar que quando comparados ao grupo inflamado com 5-FU (MUC) esses tratamentos foram eficazes somente na redução da expressão gênica de *Tnf* e *Tgfb* ( $p < 0.05$ ).

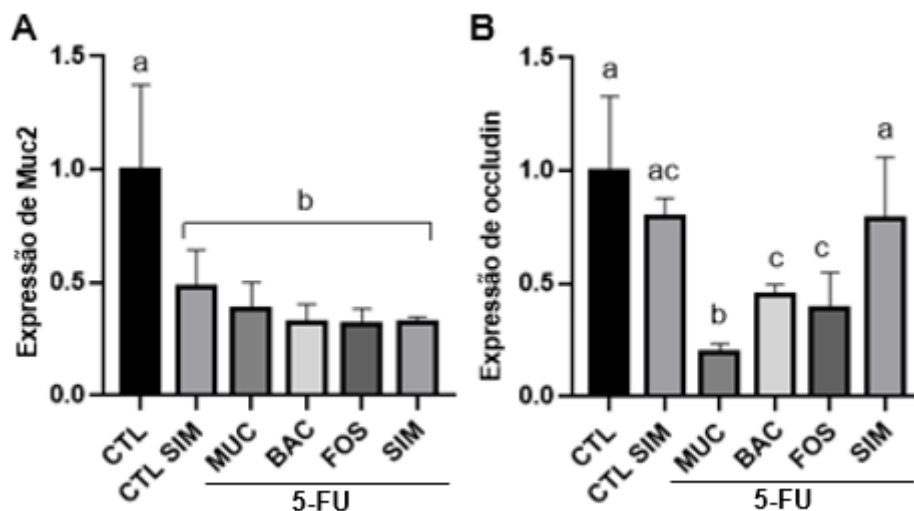


**Figura 31. Efeito da administração por *continuous feeding* de CIDCA 133, FOS e do simbiótico na expressão gênica de IL10, IL1b, IL6, IL12, Tnf e Tgfb no íleo.**

Expressão gênica de IL10 (A), expressão gênica de IL1b (B), expressão gênica de IL6 (C), expressão gênica de IL12 (D), expressão gênica de Tnf (E), expressão de Tgfb (F). Letras diferentes indicam diferença significativa por one-way ANOVA e *Tukey Multiple comparison Test* ( $p < 0,05$ ). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

### 5.9 Consumo de Simbiótico por *continuous feeding* aumenta a expressão gênica de Ocludina em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Em relação à expressão de marcadores da barreira epitelial, foi possível observar que o consumo do simbiótico (SIM) assim como o consumo de FOS e BAC não influenciam na expressão gênica de Muc2 em animais inflamados com 5-FU (MUC) (Figura 32 A), mas aumentam a expressão gênica da proteína de junção firme ocludina ( $p < 0,05$ ); o consumo do simbiótico teve maior efeito, mostrando ser eficaz na manutenção da função de barreira epitelial (Figura 32 B).



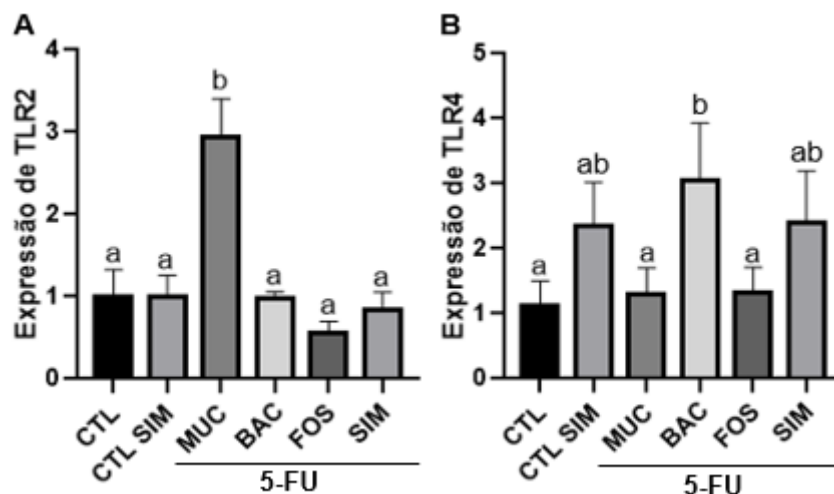
**Figura 32.** Efeito da administração por *continuous feeding* de CIDCA 133, FOS e do simbiótico na expressão gênica de Muc2 e Occludina no íleo de animais inflamados com 5-FU

Expressão gênica de Muc2 (A), expressão gênica de Occludina (B). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) por one-way ANOVA *Tukey Multiple comparison Test*). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

#### 5.10 Consumo de Simbiótico por *continuous feeding* foi capaz de prevenir o aumento da expressão gênica de Tlr2 em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Na figura 33 A, observa-se aumento na expressão de Tlr2 do grupo MUC quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). No grupo SIM a expressão desta proteína apresentou níveis semelhantes aos controles CTL e CTL SIM ( $p > 0,05$ ).

A expressão de Tlr4 está aumentada no grupo BAC quando comparada aos grupos CTL, MUC e FOS ( $p < 0,05$ ). No grupo SIM a expressão gênica de este receptor não apresentou diferença quando comparada aos controles (CTL e CTL SIM) e ao grupo BAC ( $p > 0,05$ ) (Figura 33 B).



**Figura 33. Efeito da administração por *continuous feeding* de CIDCA 133, FOS e do simbiótico na expressão gênica de Tlr2 e Tlr4 no íleo**

Expressão gênica de Tlr2 (A), expressão gênica de Tlr4 (B). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) por one-way ANOVA *Tukey Multiple comparison Test*). CTL = controle, MUC = mucosite, BAC = bactéria CIDCA133, FOS = FOS, SIM = simbiótico, CTL SIM = controle simbiótico.

## 6 DISCUSSÃO

A mucosite intestinal é um dos principais efeitos adversos ocasionado pelas drogas antineoplásicas, como o 5-FU, no TGI dos pacientes em quimioterapia (Lee, 2014; Phillips et al., 2018). Esta doença resulta em danos a mucosa intestinal, com redução das vilosidades, aumento da profundidade e destruição das criptas e intensa reação inflamatória com consequente ulceração (Duncan and Grant, 2003; Hamouda et al., 2017; Basile et al., 2019), que comprometem a função de barreira intestinal. A mucosite também pode levar a uma disbiose já que ocorre efeito deletério da microbiota e também o rompimento das junções firmes (Tang et al., 2017; de Miranda et al., 2019), além disso pode provocar sintomas sistêmicos ao organismo como perda de peso corpóreo, redução do consumo hídrico e alimentar, redução do comprimento intestinal, presença de infiltrado inflamatório e aumento de secreção de sIgA no lumen intestinal (Ferreira et al., 2012; Yeung et al., 2015; Carvalho et al., 2017d; Li et al., 2017).

Encontrar alternativas terapêuticas para prevenir, reduzir ou até mesmo tratar os danos à mucosa intestinal causados por quimioterápicos, torna-se de fundamental importância durante o tratamento de diversos tipos de cânceres. Nesse contexto, o uso de prebióticos e probióticos têm sido descritos como terapias eficazes para o tratamento das desordens inflamatórias intestinais. Estudos demonstram que eles conseguem aumentar a integridade da mucosa intestinal, preservar a altura das vilosidades, aumentar a produção e liberação de mucinas e consequentemente melhorar a composição do biofilme que recobre a mucosa, demonstrando assim, o grande potencial

desses microrganismos, bem como das fibras para diminuir os danos à mucosa e consequentemente melhorar possíveis infecções intestinais (Bellavia et al., 2014; Yasmin et al., 2015; Caetano et al., 2016; Jacouton et al., 2017; Kato et al., 2017; Chang et al., 2018).

Galdino et al. (2018) demonstraram que a suplementação do FOS no pré-tratamento foi capaz de minimizar os efeitos da mucosite induzida por 5-FU em modelo murino experimental, em adição, Carvalho et al. (2021) avaliaram a suplementação profilática e terapêutica do FOS sobre a mucosite intestinal, mostrando que o tratamento com FOS foi mais eficaz do que o pré-tratamento na redução dos danos induzidos pelo 5-FU sobre a barreira intestinal. Adicionalmente, De Jesus et al. (2019) investigaram o efeito terapêutico do leite fermentado pela linhagem *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA133 sobre os danos à mucosa intestinal ocasionados pelo 5-FU demonstrando um efeito benéfico e protetor. Diante disso e associando estes dois promissores resultados para combater os danos ocasionados à mucosa intestinal por antineoplásicos, mais especificamente pelo 5-FU o presente trabalho visa o estudo da associação da linhagem probiótica *L. delbrueckii* CIDCA133 com o prebiótico FOS, e assim, avaliar a ação dessa formulação simbiótica como estratégia promissora para o tratamento da mucosite intestinal.

Os oligossacarídeos têm a capacidade de promover a proliferação de LAB *in vitro* (Mital et al., 1975; Gopal et al., 2001), porém, nem todos os oligossacarídeos podem ser utilizados por elas já que nem todas as LAB possuem um sistema enzimático que metaboliza oligossacarídeos de maneira eficiente (Ward et al., 2006; Lee et al., 2008). No presente estudo, foi demonstrado que *L. delbrueckii* CIDCA133 pode crescer em meio contendo Fruto-oligossacarídeos, indicando que a linhagem apresenta um sistema de carboidrases capaz de hidrolisar e transportar oligossacarídeos. Se bem, a taxa de crescimento de CIDCA133 foi menor quando cultivada em FOS do que quando cultivada em glicose, resultados similares foram encontrados por Cao et al. (2019) que estudaram os efeitos de diferentes oligossacarídeos (FOS, GOS e MOS) em *L. plantarum* ATCC14917 e observaram que a taxa de crescimento destes microrganismos foi menor quando cultivados em meio com oligossacarídeos do que quando cultivados em meio com glicose como fonte de carbono (Cao et al., 2019). Glicose é uma fonte de carboidrato fácil de ser assimilada pela maioria das espécies da microbiota intestinal (Moraes et al., 2014), o FOS pode ser uma alternativa interessante mesmo que esteja acondicionado a uma menor taxa de crescimento, já que por ser uma fonte de energia mais restrita, pode evitar o crescimento indesejado de bactérias e outros microrganismos patogênicos.

No presente trabalho, observou-se que camundongos dos grupos MUC, BAC, FOS e SIM inflamados pela ação do 5-FU apresentaram diminuição da ingestão alimentar e significativa perda de peso corporal 72 horas após a indução da mucosite. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios que utilizaram o mesmo fármaco para a indução da inflamação intestinal (Generoso et al., 2015; Leocádio et al., 2015; Carvalho et al., 2017a; Trindade et al., 2018). O tratamento com FOS, investigado por outros autores em modelo de mucosite induzida pelo 5-FU, não foi capaz de reduzir a perda de peso como também de preservar o consumo alimentar, tendo contribuído para a perda de peso (Barros et al., 2017; Galdino et al., 2018; Wang et al., 2019; Carvalho et al., 2021). Embora os achados de De Jesus et al. (2018) demonstraram que a cepa CIDCA 133 não teve efeito sobre a redução da ingestão alimentar e hídrica dos animais inflamados com 5-FU, ela foi capaz de prevenir a perda da massa corporal quando administrada em leite fermentado (De Jesus et al., 2019).

Um dos principais efeitos relacionados à mucosite intestinal é a perda da arquitetura intestinal, acompanhado por destruição da mucosa e o estabelecimento de um intenso processo inflamatório (Howarth et al., 1996; Duncan and Grant, 2003; Sonis, 2004; Lee, 2014). Os animais que receberam o quimioterápico 5-FU apresentaram danos na mucosa no íleo, sendo possível observar atrofia das vilosidades e perda da arquitetura das criptas, ulceração e intensa resposta inflamatória, estando esses achados de acordo com as alterações da mucosite descritas por Sonis, (2004) e os escores histológicos propostos por Howarth et al. (1996).

Quando os tratamentos foram administrados por gavagem, os grupos BAC e FOS mostraram uma recuperação da mucosa intestinal parcial assim como demonstrado por De Jesus, et al. (2019) em leite fermentado por CIDCA 133 e por Carvalho et al. (2021) no tratamento total com FOS. Já o grupo SIM apresentou características similares ao grupo MUC com atrofia das vilosidades, perda da arquitetura das criptas e danos a mucosa. Embora CIDCA 133 e FOS sejam capazes de reduzir, isoladamente, a inflamação ileal, a combinação simbiótica proposta no presente trabalho, contrariamente ao esperado, não foi capaz de fornecer qualquer proteção adicional, tendo os animais destes grupos apresentados características similares aos do grupo MUC. Esses achados corroboram com os descritos por Smith et al. (2008) que investigaram os efeitos da combinação simbiótica da cepa *L. fermentum* BR11 e do FOS administradas por gavagem, e observaram que o tratamento não foi eficaz na redução das alterações induzidas por 5-FU, já que não foram observadas diferenças entre o score histológico do grupo tratamento simbiótico e o grupo controle tratado com 5-FU (Smith et al 2008).

Na abordagem por *continuous feeding*, os grupos FOS e BAC apresentaram características semelhantes ao grupo MUC. O grupo SIM teve uma recuperação parcial da mucosa intestinal, com maior preservação da altura das vilosidades e profundidade das criptas quando comparados ao grupo MUC, dessa forma com base nas análises morfométricas pode-se dizer que a administração do simbiótico apresenta melhor eficácia que a administração de CIDCA133 ou FOS isolados quando administrados em *continuous feeding*. No trabalho de Trindade et al. (2017) observou-se que os camundongos que tiveram a mucosite induzida e foram tratados com simbiótico apresentaram manutenção significativa da arquitetura das vilosidades e criptas e o infiltrado inflamatório foi semelhante ao grupo controle, demonstrando, portanto, o efeito benéfico da formulação simbiótica.

A presença de infiltrado inflamatório é uma característica frequentemente relatada na mucosite (Sonis, 2004), tendo sido descrita em diferentes trabalhos que avaliaram a mucosite intestinal induzida por 5-FU como De Barros et al. (2016), Galdino et al. (2018) e Soares et al. (2008). Neutrófilos são as primeiras células efetoras recrutadas para o local da inflamação, onde sua principal função é matar e digerir bactérias e fungos (Abbas et al., 2012). Em resposta a inflamação, os neutrófilos liberam grânulos contendo mieloperoxidase (MPO) que tem sua atividade aumentada após a administração de 5-FU (Cruvinel et al., 2010; Vinolo et al., 2011). Quando os tratamentos foram administrados por gavagem, não foi possível observar diferença na concentração de MPO entre os grupos estudados. No entanto, na administração por *continuous feeding* observou-se maior infiltrado de neutrófilos no íleo dos animais do grupo MUC e do grupo BAC comparado aos controles. Nos grupos FOS e SIM houve redução da infiltração, indicando que estes tratamentos preveniram o recrutamento de neutrófilos. Acredita-se, portanto, que os efeitos no grupo SIM foram devidos aos efeitos do prebiótico corroborando com o demonstrado por Galdino et al. (2018) e Carvalho et al. (2021).

Os leucócitos desempenham papel fundamental no processo inflamatório, induzindo a inflamação através da produção e liberação de grânulos, em sua maioria proteínas e a peroxidase de eosinófilos (EPO), que tem papel citotóxico na destruição de parasitas (Cruvinel et al., 2010; Murphy et al., 2010). A EPO é muito utilizada para estudo indireto da atividade dos eosinófilos em tecidos e seu aumento foi relatado em modelo de mucosite intestinal após administração de 5-FU (Ferreira et al., 2012; Soares et al., 2013; Pereira et al., 2016). A presença de eosinófilos na mucosa intestinal em doenças inflamatórias intestinais está associada a condições clínicas desfavoráveis, como má-absorção, perda de peso e alterações na arquitetura da mucosa (Sonis, 2004). Nos animais tratados por *continuous feeding*, o grupo CTL SIM mostrou infiltrado de

eosinófilos ainda menor que o grupo CTL, demonstrando que o simbiótico foi capaz de auxiliar no processo de promoção da saúde e de manter a homeostase dos animais, evitando ação inflamatória. Animais que receberam tratamentos com probiótico e prebiótico, isoladamente, foram capazes de minimizar o infiltrado de eosinófilos, corroborando com os achados de Galdino et al, (2018), De Jesus et al, (2019) e Carvalho et al, (2021). O grupo SIM apresentou a maior redução entre os grupos tratados, semelhante ao grupo CTL SIM corroborando com os achados de Trindade et al. (2018) que também encontraram redução na mensuração da EPO em modelo de mucosite com uso de simbiótico como tratamento (Trindade et al., 2018).

Deve-se ressaltar que outro importante componente imunológico da barreira intestinal é a sIgA, protegendo a mucosa de toxinas e microrganismos patogênicos (Mantis et al., 2011; Monteiro, 2014). A produção de sIgA foi avaliada na Parte II desse estudo. Surpreendentemente, a administração de 5-FU não aumentou a produção de sIgA, contrariando estudos prévios (DE JESUS et al., 2019. Barroso et al., 2021; Carvalho et al., 2021). Além disso, não houve diferença estatística na produção dessa imunoglobulina nos animais inflamados e tratados com FOS, CIDCA 133 e simbiótico. Tais achados corroboram com Cordeiro et al, (2018), que também não observaram nenhuma diferença entre animais inflamados e não inflamados com 5-FU.

Por outro lado, foi possível observar que formulação simbiótica sem indução da mucosite foi capaz de estimular a produção dessa imunoglobulina. Dados relacionados a produção de IgA são controversos, sendo sugerido que o aumento na sua produção pode estar relacionado ao controle de microrganismos patogênicos durante processos infecciosos, enquanto a redução na sua produção está relacionado à manutenção de bactérias comensais (Lycke and Bemark, 2017). Assim, o aumento da produção de sIgA em animais não inflamados pode ser efeito da linhagem probiótica, como um mecanismo imunológico de proteção contra possíveis infecções.

Uma característica importante da patobiologia da mucosite são as ulcerações causadas na mucosa, o que gera um desgaste da barreira intestinal, deixando o intestino permissível a passagem de agentes exógenos e antígenos nocivos presentes no lúmen (Rao and Samak, 2013; de Barros et al., 2018). Na investigação da permeabilidade intestinal se utilizou a macromolécula DTPA marcada com tecnécio-99m, que raramente atravessa a barreira intestinal em condições fisiológicas (Generoso et al., 2011). A ocorrência de rupturas no epitélio intestinal com afrouxamento das junções firmes, responsáveis pelo controle da permeabilidade paracelular, permite que o fármaco radiomarcado que apresenta características hidrofílicas atravesse estes espaços podendo assim ser identificado no sangue (Sheth et al., 2003; Andrade et al., 2015). A análise da permeabilidade intestinal foi realizada no protocolo de administração

por *continuous feeding* e o grupo MUC apresentou aumento da permeabilidade intestinal quando comparado aos demais grupos corroborando com os achados de outros autores que também demonstraram aumento da permeabilidade intestinal 72 horas após a administração de 5-FU (Generoso et al., 2015; de Barros et al., 2018; Trindade et al., 2018). Este aumento está relacionado com os achados histológicos e de diminuição da expressão relativa da proteína de junção firme ocludina que mostram o comprometimento da barreira intestinal no referido grupo. Observa-se níveis fisiológicos de permeabilidade intestinal no grupo tratado BAC, (semelhante aos grupos CTL e CTL SIM) corroborando com os achados de De Jesus et al. (2019). No entanto, os animais inflamados tratados com FOS, CIDCA 133 e com o simbiótico foram capazes de prevenir o aumento da permeabilidade, sendo este efeito possivelmente relacionado ao aumento na expressão gênica da proteína de junção firme ocludina e à capacidade desses bióticos em preservar o epitélio intestinal dos danos inflamatórios e epiteliais ocasionados por 5-FU. Esses achados corroboram estudos prévios de De Jesus et al. (2019), Carvalho et al. (2021) e Trindade et al. (2018) que demonstraram que tanto probiótico, como prebiótico e simbiótico são capazes de reduzir a permeabilidade intestinal de animais inflamados com 5-FU, reforçando assim a barreira intestinal.

A mucosite intestinal induzida por quimioterapia também estimula a produção de EROS que ativa o fator de transcrição inflamatório NF- $\kappa$ B, aumentando a produção de citocinas inflamatórias, como IL-1B, IL-6, IL-12 e também do fator de necrose tumoral (Tnf). A regulação positiva dessas citocinas causa lesões na mucosa provocando danos adicionais ao tecido e favorecendo o avanço das fases da mucosite (Sonis, 2004; Logan et al., 2007; Maeda et al., 2010).

Citocinas são importantes mediadores da patobiologia da mucosite (Sonis et al., 2004). Assim, investigou-se nesse trabalho a capacidade da formulação simbiótica em modular a expressão gênica de marcadores inflamatórios.

Nesse sentido, usando o método de administração por gavagem, os animais inflamados com 5-FU e sem tratamento, apresentaram aumento na expressão gênica de citocinas pro-inflamatórias Il1b, Il6 e Il12, como esperado, e reportado previamente por Li et al. (2018) e Barroso et al. (2021). Surpreendentemente, animais tratados com CIDCA 133 ou simbiótico apresentaram regulação aumentada da expressão de Il6.

Por outro lado, animais inflamados com 5-FU (grupo MUC), tratados por *continuous feeding*, aumentaram a expressão gênica de Tlr2, Tnf e Tgfb. O tratamento com FOS ou a formulação simbiótica reduziu a expressão gênica desses mediadores inflamatórios, sendo possivelmente este efeito relacionado a expressão gênica aumentada da citocina reguladora Il10. Foi possível observar também que o tratamento com o simbiótico aumentou a expressão gênica das citocinas Il6, Il12 e Il1b. Estes

achados sugerem que além de possuir um papel imunoregulador (aumentando a expressão de citocinas anti-inflamatórias e reduzindo as pró-inflamatórias), a formulação simbiótica possui a função imunoestimulatória, possivelmente aumentando a expressão dessas citocinas como sendo um mecanismo utilizado para combater possíveis infecções decorrentes da disbiose ocasionada pelo quimioterápico, conforme já reportado em outros estudos (Rolny et al., 2016; Hugo et al., 2017). Além disso, tem sido sugerido que Il6 favorece a expansão clonal de linfócitos B produtores de IgA (Galdeano et al., 2007).

A severidade da mucosite ocasionada por agentes quimioterápicos tem influência crucial da microbiota intestinal (Vliet et al., 2010). Assim, os danos celulares causados pelo uso de quimioterápicos levam à disbiose intestinal fazendo com que a microbiota alterada ative sensores da resposta imune inata através da ativação dos receptores *Toll-likes* (Gibson et al., 2015). Dessa forma, as TLRs possuem papel importante na regulação da barreira epitelial intestinal e da imunidade inata. No presente estudo foi observada regulação positiva da expressão de Tlr2 em animais inflamados com 5-FU, que podem estar associados à disbiose ocasionada pelo fármaco e consequentemente ao aumento da expressão gênica da citocina inflamatória Tnf. A diminuição da expressão gênica de Tlr2 e de Tnf após a administração tanto de CIDCA 133, como de FOS e do simbiótico sugere que estes bióticos regulam positivamente a microbiota intestinal para um estado homeostático, influenciando na resolução dos danos epiteliais ocasionados por 5-FU, conforme demonstrando em outros estudos (Justino et al., 2015; Sougiannis et al., 2019; Barroso et al., 2021). Além disso, o efeito anti-inflamatório observado após a administração do FOS ou do simbiótico pode ser atribuído ao aumento da citocina Il10, uma molécula imunorreguladora que é necessária para manter a homeostase imunológica no intestino pelo declínio das respostas inflamatórias ocasionadas por citocinas pró-inflamatórias no local do dano tecidual (Gérard et al., 1993; Sultani et al., 2012; Barroso et al., 2021).

Tgfb é outro importante mediador associado à progressão da mucosite oral (Han et al., 2013). No presente estudo foi observado um aumento da expressão de Tgfb após administração de 5-FU. Esses dados são consistentes com o estudo de Han et al. (2013), que observaram aumento da proteína Tgfb e atividades de sinalização em lesões de mucosite oral humana e mucosite oral induzida por radiação em camundongos. Estudos mostram que os níveis de Tgfb1 aumentam rapidamente após lesão devido à sua secreção por queratinócitos, plaquetas e macrófagos (Singer and Clark, 1999) e níveis aumentados de Tgfb1 recrutam leucócitos rapidamente para se acumularem no local da lesão. Os leucócitos infiltrados secretam quimiocinas e citocinas inflamatórias, estimulando a resposta inflamatória (Wang et al., 2013). Portanto, a

redução de Tgfb observada no presente estudo após tratamento com CIDCA 133, FOS e simbiótico, evidencia a capacidade anti-inflamatória desses bióticos.

Dados na literatura mostram que *Lactobacillus acidophilus* aumentou a regulação da expressão do gene Muc2 em resposta aos danos intestinais por 5-FU (Oh, 2017). Resultados similares foram obtidos utilizando o probiótico misto VSL#3<sup>®</sup> contendo quatro linhagens de *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* e *L. bulgaricus*), três linhagens de *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. breve* e *B. infantis*) e uma linhagem de *Streptococcus salivaris ssp. thermophilus* (Caballero-franco et al., 2007). No presente estudo, quando administrados por *continuous feeding* nenhum dos tratamentos manteve a regulação da expressão do gene Muc2 similar ao grupo CTL.

As alterações epiteliais e inflamatórias observadas na mucosite após administração de 5-FU culminam em perda da integridade da barreira intestinal, deixando o intestino permissível a passagem de agentes exógenos e antígenos nocivos presentes no lúmen (Rao and Samak, 2013; de Barros et al., 2018). Este processo ocorre devido a ruptura das proteínas de junções firmes que vedam o espaço intercelular (Youmba et al., 2012) levando conseqüentemente à translocação de bactérias patogênicas pela corrente sanguínea para outros órgãos (Barroso et al., 2021). A ocorrência de rupturas no epitélio intestinal com afrouxamento das junções firmes, responsáveis pelo controle da permeabilidade paracelular, permite que o fármaco marcado radioativamente atravesse estes espaços podendo assim ser identificado no sangue (Sheth et al., 2003; Andrade et al., 2015).

Alguns estudos sustentam a hipótese que probióticos e prebióticos aumentam a expressão de genes envolvidos na formação das proteínas de junção firme, como Ewaschuk et al. (2008) que observaram que a administração de metabólitos após filtrar o meio de crescimento de *Bifidobacterium* Y1 por gavagem aumentou a expressão de genes relacionados às proteínas zonulina-1 e ocludina em células epiteliais humanas. So et al., (2018) encontraram expressão de ocludina aumentada nos grupos com síndrome do intestino irritável (SII) tratados com probiótico. Em modelo animal suíno suplementado com FOS foi demonstrado expressão aumentada de ocludina (Zhao et al., 2019). Carvalho et al., (2019) demonstraram que o tratamento com FOS foi capaz de manter a expressão de ocludina em níveis semelhantes aos controles. Os resultados encontrados neste trabalho de permeabilidade intestinal encontram-se respaldados pela manutenção da expressão de ocludina a níveis fisiológicos após a administração do simbiótico, uma vez que ocorreu redução da permeabilidade intestinal.

No presente estudo, a combinação simbiótica de CIDCA 133 com FOS não foi efetiva, quando administrada por gavagem, em conferir mais proteção do que os constituintes individuais. Muitos protocolos usam a gavagem para aplicação de

quantidades exatas dos microorganismos administrados, porém estudos mostram que a tolerância oral induzida por esse método é menos intensa do que um sistema de alimentação contínua, como fazer a administração da substância contida na comida ou na água da mamadeira (Faria et al., 2003). Os efeitos da tolerância oral induzida pela gavagem apresentam variações em relação à linhagem de camundongos, assim como sua idade e também o tempo de duração da administração. *Continuous feeding* induz um efeito que é duradouro e independe da idade ou linhagem do camundongo (Faria et al., 2003; Oliveira et al., 2015). Quando administrado por *continuous feeding* o simbiótico evitou danos a mucosa ocasionados pelo 5-FU, atenuou a permeabilidade intestinal, inflamação do tecido da mucosa e diminuiu a ativação de eosinófilos e neutrófilos, conforme observado no presente trabalho.

Tomados em conjunto, esses achados sugerem que diferentes prebióticos e probióticos podem exercer efeitos diferenciais na mucosite intestinal e em outras condições intestinais. Investigações sistemáticas do tipo e dose dos prebióticos e probióticos são indicadas para identificar os bióticos mais eficazes para alívio potencial dos sintomas da mucosite intestinal.

## 7 CONCLUSÃO

*L. delbrueckii* CIDCA 133 e FOS isoladamente possuem um pequeno impacto no tratamento de mucosite intestinal induzida por 5-FU quando administradas por gavagem, no entanto a combinação simbiótica deles não foi capaz de fornecer nenhuma proteção adicional.

O tratamento com simbiótico (*L. delbrueckii* CIDCA 133 + FOS) administrado por *continuous feeding*, na mucosite experimental, apresentou efeito benéfico reduzindo o infiltrado inflamatório, com preservação parcial da arquitetura da mucosa intestinal e conseqüente redução da permeabilidade intestinal, apresentando melhores resultados do que a CIDCA 133 e o FOS individualmente. Quando administrado por *continuous feeding*, o simbiótico promoveu a manutenção de níveis fisiológicos da expressão da proteína de junção firme Ocludina, além de manter produção de sIgA a níveis fisiológicos, apesar do simbiótico não se mostrar capaz de reduzir citocinas inflamatórias como Tnf, Il1b, Il6 e Il12.

Essas descobertas podem envolver diferentes mecanismos que podem promover a homeostase da mucosa intestinal. A aplicação de probióticos e prebióticos como potencial terapia para mucosite induzida por quimioterapia necessita de mais investigação.

## 8 PERSPECTIVAS

- Avaliar o produção de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes dos animais tratados.
- Avaliar o efeito do simbiótico sobre a produção de muco através de imunohistoquímica.
- Avaliar efeito de CIDCA 133 em associação com outros prebióticos, como MOS e GOS e inulina.
- Avaliar a microbiota intestinal antes e após o uso do simbiótico por meio do microbioma.

## REFERÊNCIAS

- Abbas, A. k., Lichtman, A. H., and Pillai, S. H. I. V. (2012). *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Acurcio, L. B., Sandes, S. H. C., Bastos, R. W., Sant'anna, F. M., Pedroso, S. H. S. P., Reis, D. C., et al. (2017). Milk fermented by *Lactobacillus* species from Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice against *Salmonella Typhimurium* infection. *Benef. Microbes* 8, 579–588. doi:10.3920/BM2016.0163.
- Akram, W., Garud, N., and Joshi, R. (2019). Role of inulin as prebiotics on inflammatory bowel disease. *Drug Discov. Ther.* 13, 1–8. doi:10.5582/ddt.2019.01000.
- Alakomi, H.-L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., and Helander, I. M. (2000). Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2001–2005. doi:10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000.
- Alenghat, T., Osborne, L. C., Saenz, S. A., Kobuley, D., Ziegler, C. G. K., Mullican, S. E., et al. (2013). Histone deacetylase 3 coordinates commensal-bacteria-dependent intestinal homeostasis. *Nature* 504, 153–7. doi:10.1038/nature12687.
- Aliakbarpour, H. R., Chamani, M., Rahimi, G., Sadeghi, A. A., and Qujeq, D. (2012). The *Bacillus subtilis* and Lactic Acid Bacteria Probiotics Influences Intestinal Mucin Gene Expression, Histomorphology and Growth Performance in Broilers. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 25, 1285–93. doi:10.5713/ajas.2012.12110.
- Andrade, M. E. R., Araújo, R. S., de Barros, P. A. V., Soares, A. D. N., Abrantes, F. A., Generoso, S. de V., et al. (2015). The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. *Clin. Nutr.* 34, 1080–1087. doi:10.1016/j.clnu.2015.01.012.
- ANVISA (2019). Alegações de propriedade funcional aprovadas. Available at: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/alegacoes-de-propriedade-funcional-aprovadas\\_anvisa.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/alegacoes-de-propriedade-funcional-aprovadas_anvisa.pdf).
- Aoki, R., Kamikado, K., Suda, W., Takii, H., Mikami, Y., Suganuma, N., et al. (2017). A proliferative probiotic *Bifidobacterium* strain in the gut ameliorates progression of metabolic disorders via microbiota modulation and acetate elevation. *Sci. Rep.* 7, 43522. doi:10.1038/srep43522.
- Azad, M. A. K., Sarker, M., and Wan, D. (2018). Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles. *Biomed Res. Int.* 2018, 1–10. doi:10.1155/2018/8063647.

- Barros, P. A. V. de, Generoso, S. de V., Andrade, M. E. R., da Gama, M. A. S., Lopes, F. C. F., de Sales e Souza, É. L., et al. (2017). Effect of Conjugated Linoleic Acid-enriched Butter After 24 hours of Intestinal Mucositis Induction. *Nutr. Cancer* 69, 168–175. doi:10.1080/01635581.2016.1225100.
- Barroso, F. A. L., de Jesus, L. C. L., de Castro, C. P., Batista, V. L., Ferreira, Ê., Fernandes, R. S., et al. (2021). Intake of *Lactobacillus delbrueckii* (pExu:hsp65) Prevents the Inflammation and the Disorganization of the Intestinal Mucosa in a Mouse Model of Mucositis. *Microorganisms* 9, 107. doi:10.3390/microorganisms9010107.
- Basile, D., Di Nardo, P., Corvaja, C., Garattini, S. K., Pelizzari, G., Lisanti, C., et al. (2019). Mucosal Injury during Anti-Cancer Treatment: From Pathobiology to Bedside. *Cancers (Basel)*. 11, 857. doi:10.3390/cancers11060857.
- Bastos, R. W., Pedroso, S. H. S. P., Vieira, A. T., Moreira, L. M. C., França, C. S., Cartelle, C. T., et al. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 treatment reduces intestinal damage in a murine model of irinotecan-induced mucositis. *Benef. Microbes* 7, 549–557. doi:10.3920/BM2015.0190.
- Batista, V. L., da Silva, T. F., de Jesus, L. C. L., Coelho-Rocha, N. D., Barroso, F. A. L., Tavares, L. M., et al. (2020). Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis. *Front. Microbiol.* 11. doi:10.3389/fmicb.2020.544490.
- Bellavia, M., Rappa, F., Lo Bello, M., Brecchia, G., Tomasello, G., Leone, A., et al. (2014). *Lactobacillus casei* and *bifidobacterium lactis* supplementation reduces tissue damage of intestinal mucosa and liver after 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid treatment in mice. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 28, 251–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25001657>.
- Belorkar, S. A., and Gupta, A. K. (2016). Oligosaccharides: a boon from nature's desk. *AMB Express* 6, 82. doi:10.1186/s13568-016-0253-5.
- Blackwood, B. P., Yuan, C. Y., Wood, D. R., Nicolas, J. D., Grothaus, J. S., and Hunter, C. J. (2017). Probiotic *Lactobacillus* Species Strengthen Intestinal Barrier Function and Tight Junction Integrity in Experimental Necrotizing Enterocolitis. *J. probiotics Heal.* 5. doi:10.4172/2329-8901.1000159.
- Blair, S. A., Kane, S. V., Clayburgh, D. R., and Turner, J. R. (2006). Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. *Lab. Invest.* 86, 191–201. doi:10.1038/labinvest.3700373.
- Bomba, A., Nemcová, R., Gancarcíková, S., Herich, R., Guba, P., and Mudronová, D. (2002). Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. *Br. J. Nutr.* 88 Suppl 1, S95-9. doi:10.1079/BJN2002634.
- Bornet, F. R. J., Brouns, F., Tashiro, Y., and Duvillier, V. (2002). Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Dig. Liver Dis.* 34, S111–S120. doi:10.1016/S1590-8658(02)80177-3.
- Bouhnik, Y., Achour, L., Paineau, D., Riottot, M., Attar, A., and Bornet, F. (2007). Four-week short chain fructo-oligosaccharides ingestion leads to increasing fecal bifidobacteria and cholesterol excretion in healthy elderly volunteers. *Nutr. J.* 6, 42. doi:10.1186/1475-2891-6-42.
- Caetano, B., de Moura, N., Almeida, A., Dias, M., Sivieri, K., and Barbisan, L. (2016). Yacon

- (*Smallanthus sonchifolius*) as a Food Supplement: Health-Promoting Benefits of Fructooligosaccharides. *Nutrients* 8, 436. doi:10.3390/nu8070436.
- Cao, P., Wu, L., Wu, Z., Pan, D., Zeng, X., Guo, Y., et al. (2019). Effects of oligosaccharides on the fermentation properties of *Lactobacillus plantarum*. *J. Dairy Sci.* 102, 2863–2872. doi:10.3168/jds.2018-15410.
- Carabin, I. G., and Flamm, W. G. (1999). Evaluation of Safety of Inulin and Oligofructose as Dietary Fiber. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 30, 268–282. doi:10.1006/rtph.1999.1349.
- Carvalho, P. L. A., Andrade, M. E. R., Trindade, L. M., Leocádio, P. C. L., Alvarez-Leite, J. I., dos Reis, D. C., et al. (2021). Prophylactic and therapeutic supplementation using fructooligosaccharide improves the intestinal homeostasis after mucositis induced by 5-fluorouracil. *Biomed. Pharmacother.* 133, 111012. doi:10.1016/j.biopha.2020.111012.
- Carvalho, R. D., Breyner, N., Menezes-Garcia, Z., Rodrigues, N. M., Lemos, L., Maioli, T. U., et al. (2017a). Secretion of biologically active pancreatitis-associated protein I (PAP) by genetically modified dairy *Lactococcus lactis* NZ9000 in the prevention of intestinal mucositis. *Microb. Cell Fact.* 16, 27. doi:10.1186/s12934-017-0624-x.
- Carvalho, R. D., Breyner, N., Menezes-Garcia, Z., Rodrigues, N. M., Lemos, L., Maioli, T. U., et al. (2017b). Secretion of biologically active pancreatitis-associated protein I (PAP) by genetically modified dairy *Lactococcus lactis* NZ9000 in the prevention of intestinal mucositis. *Microb. Cell Fact.* 16, 27. doi:10.1186/s12934-017-0624-x.
- Carvalho, R. D., Breyner, N., Menezes-Garcia, Z., Rodrigues, N. M., Lemos, L., Maioli, T. U., et al. (2017c). Secretion of biologically active pancreatitis-associated protein I (PAP) by genetically modified dairy *Lactococcus lactis* NZ9000 in the prevention of intestinal mucositis. *Microb. Cell Fact.* 16, 27. doi:10.1186/s12934-017-0624-x.
- Carvalho, R. D. D. O., do Carmo, F. L. R., de Oliveira Junior, A., Langella, P., Chatel, J.-M., Bermúdez-Humarán, L. G., et al. (2017d). Use of Wild Type or Recombinant Lactic Acid Bacteria as an Alternative Treatment for Gastrointestinal Inflammatory Diseases: A Focus on Inflammatory Bowel Diseases and Mucositis. *Front. Microbiol.* 8, 800. doi:10.3389/fmicb.2017.00800.
- Cassidy, S., and Syed, B. A. (2017). Colorectal cancer drugs market. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 525–526. doi:10.1038/nrd.2017.59.
- Castilho, N. P. A., Colombo, M., Oliveira, L. L. de, Todorov, S. D., and Nero, L. A. (2019). *Lactobacillus curvatus* UFV-NPAC1 and other lactic acid bacteria isolated from calabresa, a fermented meat product, present high bacteriocinogenic activity against *Listeria monocytogenes*. *BMC Microbiol.* 19, 63. doi:10.1186/s12866-019-1436-4.
- Chang, C.-J., Lin, T.-L., Tsai, Y.-L., Wu, T.-R., Lai, W.-F., Lu, C.-C., et al. (2019). Next generation probiotics in disease amelioration. *J. Food Drug Anal.* 27, 615–622. doi:10.1016/j.jfda.2018.12.011.
- Chang, C.-T., Ho, T.-Y., Lin, H., Liang, J.-A., Huang, H.-C., Li, C.-C., et al. (2012). 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- $\kappa$ B activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. *PLoS One* 7, e31808. doi:10.1371/journal.pone.0031808.
- Chang, C.-W., Lee, H.-C., Li, L.-H., Chiang Chiau, J.-S., Wang, T.-E., Chuang, W.-H., et al. (2020). Fecal Microbiota Transplantation Prevents Intestinal Injury, Upregulation of Toll-Like Receptors, and 5-Fluorouracil/Oxaliplatin-Induced Toxicity in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 21. doi:10.3390/ijms21020386.

- Chang, C.-W., Liu, C.-Y., Lee, H.-C., Huang, Y.-H., Li, L.-H., Chiau, J.-S. C., et al. (2018). Lactobacillus casei Variety rhamnosus Probiotic Preventively Attenuates 5-Fluorouracil/Oxaliplatin-Induced Intestinal Injury in a Syngeneic Colorectal Cancer Model. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.00983.
- Cherbut, C., Michel, C., and Lecannu, G. (2003). The Prebiotic Characteristics of Fructooligosaccharides Are Necessary for Reduction of TNBS-Induced Colitis in Rats. *J. Nutr.* 133, 21–27. doi:10.1093/jn/133.1.21.
- Cinausero, M., Aprile, G., Ermacora, P., Basile, D., Vitale, M. G., Fanotto, V., et al. (2017). New Frontiers in the Pathobiology and Treatment of Cancer Regimen-Related Mucosal Injury. *Front. Pharmacol.* 8. doi:10.3389/fphar.2017.00354.
- Collado, M. C., Gueimonde, M., and Salminen, S. (2010). “Probiotics in Adhesion of Pathogens,” in *Bioactive Foods in Promoting Health* (Elsevier), 353–370. doi:10.1016/B978-0-12-374938-3.00023-2.
- Cordeiro, B. F., Oliveira, E. R., da Silva, S. H., Savassi, B. M., Acurcio, L. B., Lemos, L., et al. (2018). Whey Protein Isolate-Supplemented Beverage, Fermented by Lactobacillus casei BL23 and Propionibacterium freudenreichii 138, in the Prevention of Mucositis in Mice. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.02035.
- Cruvinel, W. de M., Mesquita, D., Araújo, J. A. P., Catelan, T. T. T., de Souza, A. W. S., da Silva, N. P., et al. (2010). Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev. Bras. Reumatol.* 50, 434–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21125178>.
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., et al. (2019). Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods (Basel, Switzerland)* 8. doi:10.3390/foods8030092.
- de Barros, P. A. V., Rabelo Andrade, M. E., de Vasconcelos Generoso, S., Mendes Miranda, S. E., dos Reis, D. C., Lacerda Leocádio, P. C., et al. (2018). Conjugated linoleic acid prevents damage caused by intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in an experimental model. *Biomed. Pharmacother.* 103, 1567–1576. doi:10.1016/j.biopha.2018.04.133.
- De Jesus, L. C. L., Drumond, M. M., de Carvalho, A., Santos, S. S., Martins, F. S., Ferreira, Ê., et al. (2019). Protective effect of Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis CIDCA 133 in a model of 5 Fluorouracil-Induced intestinal mucositis. *J. Funct. Foods* 53, 197–207. doi:10.1016/j.jff.2018.12.027.
- De Keersmaecker, S. C. J., Verhoeven, T. L. A., Desair, J., Marchal, K., Vanderleyden, J., and Nagy, I. (2006). Strong antimicrobial activity of Lactobacillus rhamnosus GG against Salmonella typhimurium is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 259, 89–96. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00250.x.
- de Miranda, J. A. L., Barreto, J. E. F., Martins, D. S., de Souza Pimentel, P. V., da Silva Costa, D. V., e Silva, R. R., et al. (2019). Protective Effect of Cashew Gum (Anacardium occidentale L.) on 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis. *Pharmaceuticals* 12, 51. doi:10.3390/ph12020051.
- de Oliveira, A. J. B., Gonçalves, R. A. C., Chierrito, T. P. C., dos Santos, M. M., de Souza, L. M., Gorin, P. A. J., et al. (2011). Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni. *Food Chem.* 129, 305–311. doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.057.

- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., and Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* 54, 2325–2340. doi:10.1194/jlr.R036012.
- Denipote, F. G., Trindade, E. B. S. de M., and Burini, R. C. (2010). Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. *Arq. Gastroenterol.* 47, 93–98. doi:10.1590/S0004-28032010000100016.
- Duncan, M., and Grant, G. (2003). Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18, 853–874. doi:10.1046/j.1365-2036.2003.01784.x.
- Erkmen, O., and Bozoglu, T. F. eds. (2016). “Basic Principles of Food Fermentation,” in *Food Microbiology: Principles into Practice* (Wiley), 228–252. doi:10.1002/9781119237860.ch39.
- Ewaschuk, J. B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., Backer, J., et al. (2008). Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 295, G1025–G1034. doi:10.1152/ajpgi.90227.2008.
- Faria, A. M. C., Maron, R., Ficker, S. M., Slavin, A. J., Spahn, T., and Weiner, H. L. (2003). Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor- $\beta$ /interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Autoimmun.* 20, 135–145. doi:10.1016/S0896-8411(02)00112-9.
- Fedorak, R. N., Feagan, B. G., Hotte, N., Leddin, D., Dieleman, L. A., Petrunia, D. M., et al. (2015). The Probiotic VSL#3 Has Anti-inflammatory Effects and Could Reduce Endoscopic Recurrence After Surgery for Crohn’s Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 928-935.e2. doi:10.1016/j.cgh.2014.10.031.
- Ferreira, T. M., Leonel, A. J., Melo, M. A., Santos, R. R. G., Cara, D. C., Cardoso, V. N., et al. (2012). Oral Supplementation of Butyrate Reduces Mucositis and Intestinal Permeability Associated with 5-Fluorouracil Administration. *Lipids* 47, 669–678. doi:10.1007/s11745-012-3680-3.
- Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P., and Louis, P. (2007). Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environ. Microbiol.* 9, 1101–1111. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01281.x.
- Flores-Maltos, D. A., Mussatto, S. I., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R., Teixeira, J. A., and Aguilar, C. N. (2016). Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36, 259–267. doi:10.3109/07388551.2014.953443.
- Franco-Robles, E., and López, M. G. (2015). Implication of Fructans in Health: Immunomodulatory and Antioxidant Mechanisms. *Sci. World J.* 2015, 1–15. doi:10.1155/2015/289267.
- Galdeano, C. M., de Moreno de LeBlanc, A., Vinderola, G., Bonet, M. E. B., and Perdígón, G. (2007). Proposed Model: Mechanisms of Immunomodulation Induced by Probiotic Bacteria. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 485–492. doi:10.1128/CVI.00406-06.
- Galdino, F. M. P., Andrade, M. E. R., Barros, P. A. V. de, Generoso, S. de V., Alvarez-Leite, J. I., Almeida-Leite, C. M. de, et al. (2018). Pretreatment and treatment with fructooligosaccharides attenuate intestinal mucositis induced by 5-FU in mice. *J. Funct. Foods* 49, 485–492. doi:10.1016/j.jff.2018.09.012.
- Gao, S., Li, D., Liu, Y., Zha, E., Zhou, T., and Yue, X. (2015). Oral immunization with recombinant

- hepatitis E virus antigen displayed on the *Lactococcus lactis* surface enhances ORF2-specific mucosal and systemic immune responses in mice. *Int. Immunopharmacol.* 24, 140–145. doi:10.1016/j.intimp.2014.10.032.
- Geier, M. S., Butler, R. N., and Howarth, G. S. (2006). Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer? *Cancer Biol. Ther.* 5, 1265–9. doi:10.4161/cbt.5.10.3296.
- Gendler, S. J., and Spicer, A. P. (1995). Epithelial mucin genes. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 607–34. doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.003135.
- Generoso, S. de V., Rodrigues, N. M., Trindade, L. M., Paiva, N. C., Cardoso, V. N., Carneiro, C. M., et al. (2015). Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. *Lipids Health Dis.* 14, 54. doi:10.1186/s12944-015-0052-z.
- Generoso, S. V., Viana, M. L., Santos, R. G., Arantes, R. M. E., Martins, F. S., Nicoli, J. R., et al. (2011). Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. *Eur. J. Nutr.* 50, 261–269. doi:10.1007/s00394-010-0134-7.
- Gérard, C., Bruyns, C., Marchant, A., Abramowicz, D., Vandenabeele, P., Delvaux, A., et al. (1993). Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J. Exp. Med.* 177, 547–550. doi:10.1084/jem.177.2.547.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., et al. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 491–502. doi:10.1038/nrgastro.2017.75.
- Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401–1412. doi:10.1093/jn/125.6.1401.
- Gibson, R. J., Bowen, J. M., and Coller, J. K. (2015). What are the predictive factors in the risk and severity of chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity? *Futur. Oncol.* 11, 2367–2370. doi:10.2217/fon.15.138.
- Gidley, M. J., and Yakubov, G. E. (2019). Functional categorisation of dietary fibre in foods: Beyond ‘soluble’ vs ‘insoluble.’ *Trends Food Sci. Technol.* 86, 563–568. doi:10.1016/j.tifs.2018.12.006.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., and Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25, 386–401. doi:10.1006/meth.2001.1261.
- Gomes-Santos, A. C., de Oliveira, R. P., Moreira, T. G., Castro-Junior, A. B., Horta, B. C., Lemos, L., et al. (2017). Hsp65-Producing *Lactococcus lactis* Prevents Inflammatory Intestinal Disease in Mice by IL-10- and TLR2-Dependent Pathways. *Front. Immunol.* 8, 30. doi:10.3389/fimmu.2017.00030.
- Gopal, P. K., Sullivan, P. A., and Smart, J. B. (2001). Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Int. Dairy J.* 11, 19–25. doi:10.1016/S0958-6946(01)00026-7.
- Gosmann, C., Anahtar, M. N., Handley, S. A., Farcasanu, M., Abu-Ali, G., Bowman, B. A., et al.

- (2017). Lactobacillus-Deficient Cervicovaginal Bacterial Communities Are Associated with Increased HIV Acquisition in Young South African Women. *Immunity* 46, 29–37. doi:10.1016/j.immuni.2016.12.013.
- Goto, H., Takemura, N., Ogasawara, T., Sasajima, N., Watanabe, J., Ito, H., et al. (2010). Effects of Fructo-Oligosaccharide on DSS-Induced Colitis Differ in Mice Fed Nonpurified and Purified Diets. *J. Nutr.* 140, 2121–2127. doi:10.3945/jn.110.125948.
- Guarner, F., and Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet (London, England)* 361, 512–9. doi:10.1016/S0140-6736(03)12489-0.
- Guichard, N., Guillarme, D., Bonnabry, P., and Fleury-Souverain, S. (2017). Antineoplastic drugs and their analysis: a state of the art review. *Analyst* 142, 2273–2321. doi:10.1039/C7AN00367F.
- Halder, D., Mandal, M., Chatterjee, S., Pal, N., and Mandal, S. (2017). Indigenous Probiotic Lactobacillus Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria. *Biomedicines* 5, 31. doi:10.3390/biomedicines5020031.
- Hamouda, N., Sano, T., Oikawa, Y., Ozaki, T., Shimakawa, M., Matsumoto, K., et al. (2017). Apoptosis, Dysbiosis and Expression of Inflammatory Cytokines are Sequential Events in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 121, 159–168. doi:10.1111/bcpt.12793.
- Han, G., Bian, L., Li, F., Cotrim, A., Wang, D., Lu, J., et al. (2013). Preventive and therapeutic effects of Smad7 on radiation-induced oral mucositis. *Nat. Med.* 19, 421–428. doi:10.1038/nm.3118.
- Hardy, H., Harris, J., Lyon, E., Beal, J., and Foey, A. D. (2013). Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients* 5, 1869–912. doi:10.3390/nu5061869.
- Herbers, A. H. E., de Haan, A. F. J., van der Velden, W. J. F. M., Donnelly, J. P., and Blijlevens, N. M. A. (2014). Mucositis not neutropenia determines bacteremia among hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.* 16, 279–285. doi:10.1111/tid.12195.
- Hernandez-Hernandez, O., Muthaiyan, A., Moreno, F. J., Montilla, A., Sanz, M. L., and Ricke, S. C. (2012). Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of Lactobacillus. *Food Microbiol.* 30, 355–361. doi:10.1016/j.fm.2011.12.022.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506–514. doi:10.1038/nrgastro.2014.66.
- Holmgren, J., and Czerkinsky, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* 11, S45-53. doi:10.1038/nm1213.
- Howarth, G. S., Francis, G. L., Cool, J. C., Xu, X., Byard, R. W., and Read, L. C. (1996). Milk Growth Factors Enriched from Cheese Whey Ameliorate Intestinal Damage by Methotrexate When Administered Orally to Rats. *J. Nutr.* 126, 2519–2530. doi:10.1093/jn/126.10.2519.
- Hsieh, M.-C., Tsai, W.-H., Jheng, Y.-P., Su, S.-L., Wang, S.-Y., Lin, C.-C., et al. (2018). The beneficial effects of Lactobacillus reuteri ADR-1 or ADR-3 consumption on type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Sci. Rep.* 8, 16791. doi:10.1038/s41598-018-35014-1.

- Hugo, A. A., De Antoni, G. L., and Pérez, P. F. (2006). Lactobacillus delbrueckii subsp lactis strain CIDCA 133 inhibits nitrate reductase activity of Escherichia coli. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 191–196. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.024.
- Hugo, A. A., De Antoni, G. L., and Pérez, P. F. (2010). Lactobacillus delbrueckii subsp lactis (strain CIDCA 133) resists the antimicrobial activity triggered by molecules derived from enterocyte-like Caco-2 cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 335–340. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02796.x.
- Hugo, A. A., Rolny, I. S., Romanin, D., and Pérez, P. F. (2017). Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis (strain CIDCA 133) stimulates murine macrophages infected with Citrobacter rodentium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 48. doi:10.1007/s11274-017-2219-4.
- Hugo, A. A., Tymczynszyn, E. E., Gómez-Zavaglia, A., and Pérez, P. F. (2012). Effect of human defensins on lactobacilli and liposomes. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1491–1497. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05433.x.
- Jacouton, E., Chain, F., Sokol, H., Langella, P., and Bermúdez-Humarán, L. G. (2017). Probiotic Strain Lactobacillus casei BL23 Prevents Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Front. Immunol.* 8. doi:10.3389/fimmu.2017.01553.
- Justino, P. F. C., Melo, L. F. M., Nogueira, A. F., Morais, C. M., Mendes, W. O., Franco, A. X., et al. (2015). Regulatory role of Lactobacillus acidophilus on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 75, 559–567. doi:10.1007/s00280-014-2663-x.
- Kaci, G., Lakhdari, O., Doré, J., Ehrlich, S. D., Renault, P., Blottière, H. M., et al. (2011). Inhibition of the NF- $\kappa$ B Pathway in Human Intestinal Epithelial Cells by Commensal Streptococcus salivarius. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4681–4684. doi:10.1128/AEM.03021-10.
- Kato, S., Hamouda, N., Kano, Y., Oikawa, Y., Tanaka, Y., Matsumoto, K., et al. (2017). Probiotic Bifidobacterium bifidum G9-1 attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice via suppression of dysbiosis-related secondary inflammatory responses. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 44, 1017–1025. doi:10.1111/1440-1681.12792.
- Kim, N., Yun, M., Oh, Y. J., and Choi, H.-J. (2018). Mind-altering with the gut: Modulation of the gut-brain axis with probiotics. *J. Microbiol.* 56, 172–182. doi:10.1007/s12275-018-8032-4.
- KOCIUBINSKI, G. L., PÉREZ, P. F., AÑÓN, M. C., and DE ANTONI, G. L. (1996). A Method of Screening for Highly Inhibitory Lactic Acid Bacteria. *J. Food Prot.* 59, 739–745. doi:10.4315/0362-028X-59.7.739.
- KOCIUBINSKI, G., PÉREZ, P., and DE ANTONI, G. (1999). Screening of Bile Resistance and Bile Precipitation in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *J. Food Prot.* 62, 905–912. doi:10.4315/0362-028X-62.8.905.
- Koleva, P. T., Valcheva, R. S., Sun, X., Gänzle, M. G., and Dieleman, L. A. (2012). Inulin and fructo-oligosaccharides have divergent effects on colitis and commensal microbiota in HLA-B27 transgenic rats. *Br. J. Nutr.* 108, 1633–1643. doi:10.1017/S0007114511007203.
- Komura, M., Fukuta, T., Genda, T., Hino, S., Aoe, S., Kawagishi, H., et al. (2014). A short-term ingestion of fructo-oligosaccharides increases immunoglobulin A and mucin concentrations in the rat cecum, but the effects are attenuated with the prolonged ingestion. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 1592–602. doi:10.1080/09168451.2014.925782.
- Kuczowska, K., Copland, A., Øverland, L., Mathiesen, G., Tran, A. C., Paul, M. J., et al. (2019).

- Inactivated *Lactobacillus plantarum* Carrying a Surface-Displayed Ag85B-ESAT-6 Fusion Antigen as a Booster Vaccine Against *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Front. Immunol.* 10. doi:10.3389/fimmu.2019.01588.
- Kyazze, G., Dinsdale, R., Hawkes, F. R., Guwy, A. J., Premier, G. C., and Donnison, I. S. (2008). Direct fermentation of fodder maize, chicory fructans and perennial ryegrass to hydrogen using mixed microflora. *Bioresour. Technol.* 99, 8833–9. doi:10.1016/j.biortech.2008.04.047.
- La Rosa, M., Bottaro, G., Gulino, N., Gambuzza, F., Di Forti, F., Inì, G., et al. (2003). [Prevention of antibiotic-associated diarrhea with *Lactobacillus* sporogens and fructo-oligosaccharides in children. A multicentric double-blind vs placebo study]. *Minerva Pediatr.* 55, 447–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14608267>.
- Le Bourgot, C., Apper, E., Blat, S., and Respondek, F. (2018). Fructo-oligosaccharides and glucose homeostasis: a systematic review and meta-analysis in animal models. *Nutr. Metab. (Lond)*. 15, 9. doi:10.1186/s12986-018-0245-3.
- Lee, C. S. (2014). Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: The role of inflammation. *World J. Gastroenterol.* 20, 3751. doi:10.3748/wjg.v20.i14.3751.
- Lee, J.-H., Karamychev, V., Kozyavkin, S., Mills, D., Pavlov, A., Pavlova, N., et al. (2008). Comparative genomic analysis of the gut bacterium *Bifidobacterium longum* reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth. *BMC Genomics* 9, 247. doi:10.1186/1471-2164-9-247.
- Leforestier, G., Blais, A., Blachier, F., Marsset-Baglieri, A., Davila-Gay, A.-M., Perrin, E., et al. (2009). Effects of galacto-oligosaccharide ingestion on the mucosa-associated mucins and sucrase activity in the small intestine of mice. *Eur. J. Nutr.* 48, 457–64. doi:10.1007/s00394-009-0036-8.
- Leocádio, P. C. L., Antunes, M. M., Teixeira, L. G., Leonel, A. J., Alvarez-Leite, J. I., Machado, D. C. C., et al. (2015). L-Arginine Pretreatment Reduces Intestinal Mucositis as Induced by 5-FU in Mice. *Nutr. Cancer* 67, 486–493. doi:10.1080/01635581.2015.1004730.
- Li, H.-L., Lu, L., Wang, X.-S., Qin, L.-Y., Wang, P., Qiu, S.-P., et al. (2017). Alteration of Gut Microbiota and Inflammatory Cytokine/Chemokine Profiles in 5-Fluorouracil Induced Intestinal Mucositis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 455. doi:10.3389/fcimb.2017.00455.
- Lima, G. C. (2010). Efeito dos oligossacarídeos FOS e GOS na microbiota intestinal e pH do conteúdo cecal de ratas Wistar em desenvolvimento.
- Liong, M.-T. ed. (2015). *Beneficial Microorganisms in Food and Nutraceuticals*. Cham: Springer International Publishing doi:10.1007/978-3-319-23177-8.
- Liu, L., Zhang, W., Song, Y., Wang, W., Zhang, Y., Wang, T., et al. (2018). Recombinant *Lactococcus lactis* co-expressing OmpH of an M cell-targeting ligand and IBDV-VP2 protein provide immunological protection in chickens. *Vaccine* 36, 729–735. doi:10.1016/j.vaccine.2017.12.027.
- Lockyer, S., and Stanner, S. (2019). Prebiotics – an added benefit of some fibre types. *Nutr. Bull.* 44, 74–91. doi:10.1111/nbu.12366.
- Logan, R. M., Gibson, R. J., Sonis, S. T., and Keefe, D. M. K. (2007). Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. *Oral Oncol.* 43, 395–401. doi:10.1016/j.oraloncology.2006.04.011.

- Logan, R. M., Stringer, A. M., Bowen, J. M., Gibson, R. J., Sonis, S. T., and Keefe, D. M. K. (2009). Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? *Cancer Chemother. Pharmacol.* 63, 239–251. doi:10.1007/s00280-008-0732-8.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., and Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3, 330–338. doi:10.1038/nrc1074.
- Lycke, N. Y., and Bemark, M. (2017). The regulation of gut mucosal IgA B-cell responses: recent developments. *Mucosal Immunol.* 10, 1361–1374. doi:10.1038/mi.2017.62.
- Maeda, T., Miyazono, Y., Ito, K., Hamada, K., Sekine, S., and Horie, T. (2010). Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65, 1117–1123. doi:10.1007/s00280-009-1119-1.
- Mantis, N. J., Rol, N., and Corthésy, B. (2011). Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* 4, 603–611. doi:10.1038/mi.2011.41.
- Markowiak, P., and Ślizewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog.* 10, 1–20. doi:10.1186/s13099-018-0250-0.
- Marshman, E., Booth, C., and Potten, C. S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *BioEssays* 24, 91–98. doi:10.1002/bies.10028.
- Martins, C. G., Wagner, S. C., and Linden, R. (2013). Individualização Farmacocinética das Doses de 5-Fluoruracil no Câncer Colorretal. *Rev. Bras. Cancerol* 59, 271–280.
- MITAL, B. K., and STEINKRAUS, K. H. (1975). UTILIZATION OF OLIGOSACCHARIDES BY LACTIC ACID BACTERIA DURING FERMENTATION OF SOY MILK. *J. Food Sci.* 40, 114–118. doi:10.1111/j.1365-2621.1975.tb03749.x.
- Miura, K., Kinouchi, M., Ishida, K., Fujibuchi, W., Naitoh, T., Ogawa, H., et al. (2010). 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs. *Cancers (Basel)*. 2, 1717–1730. doi:10.3390/cancers2031717.
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules* 22. doi:10.3390/molecules22081255.
- Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., and Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 6463–6472. doi:10.1007/s00253-019-09978-7.
- Monteiro, R. C. (2014). Immunoglobulin A as an anti-inflammatory agent. *Clin. Exp. Immunol.* 178, 108–110. doi:10.1111/cei.12531.
- Moraes, A. C. F. de, Silva, I. T. da, Almeida-Pititto, B. de, and Ferreira, S. R. G. (2014). Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 58, 317–327. doi:10.1590/0004-2730000002940.
- Morelli, L., Zonenschain, D., Callegari, M. L., Grossi, E., Maisano, F., and Fusillo, M. (2003). Assessment of a new synbiotic preparation in healthy volunteers: survival, persistence of probiotic strains and its effect on the indigenous flora. *Nutr. J.* 2, 11. doi:10.1186/1475-2891-2-11.
- Murphy, K., Travers, P., and Walport, M. (2010). *Imunobiologia de Janeway*. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed.

- Nussbaumer, S., Bonnabry, P., Veuthey, J.-L., and Fleury-Souverain, S. (2011). Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta* 85, 2265–2289. doi:10.1016/j.talanta.2011.08.034.
- Oliveira, R. P., Santiago, A. F., Ficker, S. M., Gomes-Santos, A. C., and Faria, A. M. C. (2015). Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long-lasting effects. *J. Immunol. Methods* 421, 36–43. doi:10.1016/j.jim.2015.02.005.
- Pandey, K. R., Naik, S. R., and Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *J. Food Sci. Technol.* 52, 7577–7587. doi:10.1007/s13197-015-1921-1.
- Parada Venegas, D., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., et al. (2019). Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front. Immunol.* 10. doi:10.3389/fimmu.2019.00277.
- Passos, L. M. L., and Park, Y. K. (2003). Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. *Ciência Rural* 33, 385–390. doi:10.1590/s0103-84782003000200034.
- Patel, S., and Goyal, A. (2012). The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech* 2, 115–125. doi:10.1007/s13205-012-0044-x.
- Pereira, V. B. M., Melo, A. T., Assis-Júnior, E. M., Wong, D. V. T., Brito, G. A. C., Almeida, P. R. C., et al. (2016). A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 77, 323–332. doi:10.1007/s00280-015-2938-x.
- Peterson, L. W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 141–53. doi:10.1038/nri3608.
- Phillips, E., France, A., Thatvihan, G., Nnaemeka, U., and Zaidi, S. (2018). Mucositis and Cardiotoxicity Due to 5-Fluorouracil. *Am. J. Ther.* 25, e712–e714. doi:10.1097/MJT.0000000000000725.
- Plavec, T. V., and Berlec, A. (2020). Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms* 8. doi:10.3390/microorganisms8020297.
- Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F., Vilchez-Padial, L., and Gil, A. (2017). Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Chronic Diseases. *Nutrients* 9, 555. doi:10.3390/nu9060555.
- Pot, B., Foligné, B., Daniel, C., and Grangette, C. (2013). “Understanding Immunomodulatory Effects of Probiotics,” in, 75–90. doi:10.1159/000351388.
- Presti, I., D’Orazio, G., Labra, M., La Ferla, B., Mezzasalma, V., Bizzaro, G., et al. (2015). Evaluation of the probiotic properties of new Lactobacillus and Bifidobacterium strains and their in vitro effect. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 5613–26. doi:10.1007/s00253-015-6482-8.
- Rajkumar, H., Kumar, M., Das, N., Kumar, S. N., Challa, H. R., and Nagpal, R. (2015). Effect of Probiotic Lactobacillus salivarius UBL S22 and Prebiotic Fructo-oligosaccharide on Serum Lipids, Inflammatory Markers, Insulin Sensitivity, and Gut Bacteria in Healthy Young Volunteers. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 20, 289–298. doi:10.1177/1074248414555004.
- Raju, J., Roberts, J., Chen, Q., Aziz, S. A., Caldwell, D., Bird, R. P., et al. (2015). Fermentable Carbohydrates Differentially Affect Colon Tumor Formation in Azoxymethane-Induced Male Fischer 344 Rats. *J. Nutr.* 146, 737–744. doi:10.3945/jn.115.214833.
- Ramanan, D., and Cadwell, K. (2016). Intrinsic Defense Mechanisms of the Intestinal Epithelium.

*Cell Host Microbe* 19, 434–41. doi:10.1016/j.chom.2016.03.003.

- Rao, R. K., and Samak, G. (2013). Protection and Restitution of Gut Barrier by Probiotics: Nutritional and Clinical Implications. *Curr. Nutr. Food Sci.* 9, 99–107. doi:10.2174/1573401311309020004.
- Rastall, R. A., Gibson, G. R., Gill, H. S., Guarner, F., Klaenhammer, T. R., Pot, B., et al. (2005). Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52, 145–52. doi:10.1016/j.femsec.2005.01.003.
- Rather, I. A., Bajpai, V. K., Kumar, S., Lim, J., Paek, W. K., and Park, Y.-H. (2016). Probiotics and Atopic Dermatitis: An Overview. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00507.
- Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: The Concept Revisited. *J. Nutr.* 137, 830S–837S. doi:10.1093/jn/137.3.830S.
- Roberfroid, M. B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1682S–1687S. doi:10.1093/ajcn/71.6.1682S.
- Rocha-Ramírez, L. M., Pérez-Solano, R. A., Castañón-Alonso, S. L., Moreno Guerrero, S. S., Ramírez Pacheco, A., García Garibay, M., et al. (2017). Probiotic Lactobacillus Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. *J. Immunol. Res.* 2017, 4607491. doi:10.1155/2017/4607491.
- Rodrigues, F. A. de P., Medeiros, P. H. Q. S. de, Prata, M. de M. G., and Lima, A. Â. M. (2016). “Fisiologia da barreira instestinal epitelial,” in *Sistema digestório: integração básico-clínica* (Blucher), 441–477.
- Rolny, I. S., Tiscornia, I., Racedo, S. M., Pérez, P. F., and Bollati-Fogolín, M. (2016). Lactobacillus delbrueckii subsp lactis CIDCA 133 modulates response of human epithelial and dendritic cells infected with Bacillus cereus. *Benef. Microbes* 7, 749–760. doi:10.3920/BM2015.0191.
- Saez-Lara, M. J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J., and Gil, A. (2015). The Role of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Other Related Diseases: A Systematic Review of Randomized Human Clinical Trials. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–15. doi:10.1155/2015/505878.
- Salvo Romero, E., Alonso Cotoner, C., Pardo Camacho, C., Casado Bedmar, M., and Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev. Española Enfermedades Dig.* 108. doi:10.17235/reed.2015.3846/2015.
- Sanders, M. E., Akkermans, L. M. A., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J., Hörmannspenger, G., et al. (2010). Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* 1, 164–85. doi:10.4161/gmic.1.3.12127.
- Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., and Prapulla, S. G. (2005). Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 442–457. doi:10.1016/j.tifs.2005.05.003.
- Sheth, P., Basuroy, S., Li, C., Naren, A. P., and Rao, R. K. (2003). Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Oxidative Stress-induced Disruption of Tight Junctions. *J. Biol. Chem.* 278, 49239–49245. doi:10.1074/jbc.M305654200.
- Shi, Y., Zhai, Q., Li, D., Mao, B., Liu, X., Zhao, J., et al. (2017). Restoration of cefixime-induced gut microbiota changes by Lactobacillus cocktails and fructooligosaccharides in a mouse

- model. *Microbiol. Res.* 200, 14–24. doi:10.1016/j.micres.2017.04.001.
- Singer, A. J., and Clark, R. A. F. (1999). Cutaneous Wound Healing. *N. Engl. J. Med.* 341, 738–746. doi:10.1056/NEJM199909023411006.
- Smith, C. L., Geier, M. S., Yazbeck, R., Torres, D. M., Butler, R. N., and Howarth, G. S. (2008a). Lactobacillus fermentum BR11 and fructo-oligosaccharide partially reduce jejunal inflammation in a model of intestinal mucositis in rats. *Nutr. Cancer* 60, 757–67. doi:10.1080/01635580802192841.
- Smith, C. L., Geier, M. S., Yazbeck, R., Torres, D. M., Butler, R. N., and Howarth, G. S. (2008b). Lactobacillus fermentum BR11 and Fructo-Oligosaccharide Partially Reduce Jejunal Inflammation in a Model of Intestinal Mucositis in Rats. *Nutr. Cancer* 60, 757–767. doi:10.1080/01635580802192841.
- So, D., Whelan, K., Rossi, M., Morrison, M., Holtmann, G., Kelly, J. T., et al. (2018). Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 107, 965–983. doi:10.1093/ajcn/nqy041.
- Soares, P. M. G., Mota, J. M. S. C., Souza, E. P., Justino, P. F. C., Franco, A. X., Cunha, F. Q., et al. (2013). Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. *Cytokine* 61, 46–49. doi:10.1016/j.cyto.2012.10.003.
- Song, M.-K., Park, M.-Y., and Sung, M.-K. (2013). 5-Fluorouracil-induced changes of intestinal integrity biomarkers in BALB/c mice. *J. cancer Prev.* 18, 322–9. doi:10.15430/jcp.2013.18.4.322.
- Sonis, S. T. (2002). The biologic role for nuclear factor-kappaB in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13, 380–389. doi:10.1177/154411130201300502.
- Sonis, S. T. (2004). The pathobiology of mucositis. *Nat. Rev. Cancer* 4, 277–284. doi:10.1038/nrc1318.
- Sougiannis, A. T., VanderVeen, B. N., Enos, R. T., Velazquez, K. T., Bader, J. E., Carson, M., et al. (2019). Impact of 5 fluorouracil chemotherapy on gut inflammation, functional parameters, and gut microbiota. *Brain. Behav. Immun.* 80, 44–55. doi:10.1016/j.bbi.2019.02.020.
- Souza, D. G., Cara, D. C., Cassali, G. D., Coutinho, S. F., Silveira, M. R., Andrade, S. P., et al. (2000). Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1800–1808. doi:10.1038/sj.bjp.0703756.
- Spyropoulos, B. G., Theodoropoulos, G., Misiakos, E. P., Stoidis, C. N., Zapatis, H., Diamantopoulou, K., et al. (2013). The effect of synbiotics on acute radiation-induced diarrhea and its association with mucosal inflammatory and adaptive responses in rats. *Dig. Dis. Sci.* 58, 2487–98. doi:10.1007/s10620-013-2700-3.
- Strath, M., and Sanderson, C. J. (1985). Production and functional properties of eosinophils from bone marrow cultures. *J. Cell Sci.* 74, 207–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4030907>.
- Sultani, M., Stringer, A. M., Bowen, J. M., and Gibson, R. J. (2012). Anti-Inflammatory Cytokines: Important Immunoregulatory Factors Contributing to Chemotherapy-Induced Gastrointestinal Mucositis. *Chemother. Res. Pract.* 2012, 1–11. doi:10.1155/2012/490804.

- Tang, Y., Wu, Y., Huang, Z., Dong, W., Deng, Y., Wang, F., et al. (2017). Administration of probiotic mixture DM#1 ameliorated 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis and dysbiosis in rats. *Nutrition* 33, 96–104. doi:10.1016/j.nut.2016.05.003.
- The Jackson Laboratory Mouse Phenome Database. Available at: <https://phenome.jax.org/>.
- Thorpe, D. (2019). The role of mucins in mucositis. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care* 13, 114–118. doi:10.1097/SPC.0000000000000423.
- Touchefeu, Y., Montassier, E., Nieman, K., Gastinne, T., Potel, G., Bruley des Varannes, S., et al. (2014). Systematic review: the role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis - current evidence and potential clinical applications. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, n/a-n/a. doi:10.1111/apt.12878.
- Trindade, L. M., Martins, V. D., Rodrigues, N. M., Souza, E. L. S., Martins, F. S., Costa, G. M. F., et al. (2018). Oral administration of Simbioflora® (synbiotic) attenuates intestinal damage in a mouse model of 5-fluorouracil-induced mucositis. *Benef. Microbes* 9, 477–486. doi:10.3920/BM2017.0082.
- Van Tassell, M. L., and Miller, M. J. (2011). Lactobacillus adhesion to mucus. *Nutrients* 3, 613–36. doi:10.3390/nu3050613.
- Vandenplas, Y., Veereman-Wauters, G., Greef, E. De, Peeters, S., Casteels, A., Mahler, T., et al. (2011). Probiotics and prebiotics in prevention and treatment of diseases in infants and children. *J. Pediatr. (Rio. J.)* 87. doi:<https://doi.org/10.1590/S0021-75572011000400004>.
- Vinolo, M. A. R., Rodrigues, H. G., Hatanaka, E., Sato, F. T., Sampaio, S. C., and Curi, R. (2011). Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *J. Nutr. Biochem.* 22, 849–55. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.07.009.
- Vogt, L., Meyer, D., Pullens, G., Faas, M., Smelt, M., Venema, K., et al. (2015). Immunological properties of inulin-type fructans. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55, 414–36. doi:10.1080/10408398.2012.656772.
- Volynets, V., Rings, A., Bárdos, G., Ostaff, M. J., Wehkamp, J., and Bischoff, S. C. (2016). Intestinal barrier analysis by assessment of mucins, tight junctions, and  $\alpha$ -defensins in healthy C57BL/6J and BALB/cJ mice. *Tissue barriers* 4, e1208468. doi:10.1080/21688370.2016.1208468.
- Wallace, C. J. K., Foster, J. A., Soares, C. N., and Milev, R. V. (2020). The Effects of Probiotics on Symptoms of Depression: Protocol for a Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. *Neuropsychobiology* 79, 108–116. doi:10.1159/000496406.
- Wang, G., Li, X., Zhao, J., Zhang, H., and Chen, W. (2017). Lactobacillus casei CCFM419 attenuates type 2 diabetes via a gut microbiota dependent mechanism. *Food Funct.* 8, 3155–3164. doi:10.1039/C7FO00593H.
- Wang, J., Zhao, J., Chu, E. S., Mok, M. T., Go, M. Y., Man, K., et al. (2013). Inhibitory role of Smad7 in hepatocarcinogenesis in mice and in vitro. *J. Pathol.* 230, 441–452. doi:10.1002/path.4206.
- Wang, M., Gao, Z., Zhang, Y., and Pan, L. (2016). Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: a realistic therapeutic option. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5691–701. doi:10.1007/s00253-016-7557-x.
- Wang, Y., Han, Q., and Zhang, H. (2019). Evaluation of the toxicity of 5-fluorouracil on three digestive enzymes from the view of side effects. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol.*

*Spectrosc.* 220, 117105. doi:10.1016/j.saa.2019.05.010.

- Ward, R. E., Niñonuevo, M., Mills, D. A., Lebrilla, C. B., and German, J. B. (2006). In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4497–9. doi:10.1128/AEM.02515-05.
- Weiss, G. A., and Hennet, T. (2017). Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 2959–2977. doi:10.1007/s00018-017-2509-x.
- Yasmin, A., Butt, M. S., Afzaal, M., van Baak, M., Nadeem, M. T., and Shahid, M. Z. (2015). Prebiotics, gut microbiota and metabolic risks: Unveiling the relationship. *J. Funct. Foods* 17, 189–201. doi:10.1016/j.jff.2015.05.004.
- Yeung, C.-Y., Chan, W.-T., Jiang, C.-B., Cheng, M.-L., Liu, C.-Y., Chang, S.-W., et al. (2015). Amelioration of Chemotherapy-Induced Intestinal Mucositis by Orally Administered Probiotics in a Mouse Model. *PLoS One* 10, e0138746. doi:10.1371/journal.pone.0138746.
- Yeung, C., Chiang Chiau, J., Cheng, M., Chan, W., Chang, S., Chang, Y., et al. (2020). Modulations of probiotics on gut microbiota in a 5-fluorouracil-induced mouse model of mucositis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 35, 806–814. doi:10.1111/jgh.14890.
- Yu, J. (2013). Intestinal stem cell injury and protection during cancer therapy. *Transl. Cancer Res.* 2, 384–396. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24683536>.
- Zaharuddin, L., Mokhtar, N. M., Muhammad Nawawi, K. N., and Raja Ali, R. A. (2019). A randomized double-blind placebo-controlled trial of probiotics in post-surgical colorectal cancer. *BMC Gastroenterol.* 19, 131. doi:10.1186/s12876-019-1047-4.
- Zhang, L., Jin, Y., Peng, J., Chen, W., Lisha, L., and Lin, J. (2019). Qingjie Fuzheng Granule attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucosal damage. *Biomed. Pharmacother.* 118, 109223. doi:10.1016/j.biopha.2019.109223.
- Zhang, N., Yin, Y., Xu, S.-J., and Chen, W.-S. (2008). 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules* 13, 1551–1569. doi:10.3390/molecules13081551.
- Zhao, W., Yuan, M., Li, P., Yan, H., Zhang, H., and Liu, J. (2019). Short-chain fructo-oligosaccharides enhances intestinal barrier function by attenuating mucosa inflammation and altering colonic microbiota composition of weaning piglets. *Ital. J. Anim. Sci.* 18, 976–986. doi:10.1080/1828051X.2019.1612286.

## ANEXOS

## Protocolos CEUA:

1-



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do efeito anti-inflamatório da linhagem probiótica *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA133 associada com o prebiótico Fruto-oligossacarídeos (FOS), em modelo murino ? de mucosite BALB/c induzida pelo quimioterápico 5-fluorouracil", protocolo do CEUA: 111/2020 sob a responsabilidade de Vasco Ariston de Carvalho Azevedo 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) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 03/08/2020.

Vigência da Autorização	03/08/2020 a 02/08/2025
Finalidade	Pesquisa
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / Camundongo BALB/c
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério CeBio
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / Camundongo BALB/c
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério CeBio
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / Camundongo BALB/c
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério CeBio
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / Camundongo BALB/c
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério CeBio
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / Camundongo BALB/c
Nº de animais	6

Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério CeBio

Considerações posteriores:

03/08/2020	Aprovado na reunião "on line" do dia 03/08/2020. Validade: 03/08/2020 à 02/08/2025.
------------	--

Belo Horizonte, 02/04/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [ceua@prpq.ufmg.br](mailto:ceua@prpq.ufmg.br)

2-



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito da formulação simbiótica (Lactobacillus delbrueckii CIDCA133 + Fruto-oligossacarídeos) administrada por continuous feeding na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil", protocolo do CEUA: 34/2021 sob a responsabilidade de Vasco Ariston de Carvalho Azevedo 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) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 22/03/2021.

Vigência da Autorização	22/03/2021 a 21/03/2026
Finalidade	Pesquisa
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / Camundongo BALB/c
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / Camundongo BALB/c
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / Camundongo BALB/c
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / Camundongo BALB/c
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / Camundongo BALB/c
Nº de animais	6

Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG

Considerações posteriores:

22/03/2021	Aprovado na reunião on-line do dia 22/03/2021. Validade: 22/03/2021 à 21/03/2026
------------	---

Belo Horizonte, 02/04/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)