

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

Gabriela Munis Campos

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ENTEROPROTETOR DE *LACTICASEIBACILLUS*  
*RHAMNOSUS* L156.4 EM MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR  
5-FLUOROURACIL**

Belo Horizonte  
2023  
Gabriela Munis Campos

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ENTEROPROTETOR DE *LACTICASEIBACILLUS*  
*RHAMNOSUS* L156.4 EM MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR  
5-FLUOROURACIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Ecologia e Evolução da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Coorientador: Dr. Túlio Marcos Santos.

Belo Horizonte  
2023

043

Campos, Gabriela Munis.

Avaliação do efeito enteroprotetor de *Lactobacillus rhamnosus* L156.4 em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil [manuscrito] / Gabriela Munis Campos. – 2023.

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

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo. Coorientador: Dr. Túlio Marcos Santos..

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

1. Genética. 2. Tratamento Farmacológico. 3. Inflamação. 4. Probióticos. 5. Imunomodulação. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Santos, Túlio Marcos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



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

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

<b>ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO</b>	<b>345/2023</b> <b>entrada</b>
<b>Gabriela Munis Campos</b>	<b>2º/2021</b> <b>CPF: 136.569.466-63</b>

Às nove horas do dia 04 de agosto de 2023, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Avaliação do efeito enteroprotetor de Lacticaseibacillus rhamnosus L156.4 em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-fluoruracil**", requisito para obtenção do grau de Mestre em Genética. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Vasco Ariston de Carvalho Azevedo	UFMG	283.171.225-49	Aprovada
Tulio Marcos Santos	PUC/MG	675.862.016-68	Aprovada
Ana Lúcia Brunialti Godard	UFMG	107.961.538-50	Aprovada
Valbert Nascimento Cardoso	UFMG	279.060.276-04	Aprovada
Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho	UFBA	080.173.536-00	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 04 de agosto de 2023.**

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador

Tulio Marcos Santos - Coorientador

Ana Lúcia Brunialti Godard

Valbert Nascimento Cardoso

Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por Ana Lucia Brunialti Godard, Professora do Magistério Superior, em 04/08/2023, às 11:19, 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 Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior, em 04/08/2023, às 11:33, 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 Túlio Marcos Santos, Usuário Externo, em 04/08/2023, às 12:18, 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 Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho, Usuário Externo, em 04/08/2023, às 13:34, 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 Valbert Nascimento Cardoso, Professor do Magistério Superior, em 04/08/2023, às 15:00, 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 2513338 e o código CRC 03D6F539.



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

### FOLHA DE APROVAÇÃO

**"Avaliação do efeito enteroprotetor de Lactocaseibacillus rhamnosus L156.4 em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-fluoruracil"**

Gabriela Munis Campos

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador  
UFMG

Tulio Marcos Santos - Coorientador  
PUC/MG

Ana Lúcia Brunialti Godard  
UFMG

Valbert Nascimento Cardoso  
UFMG

Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho  
UFBA

Belo Horizonte, 04 de agosto de 2023.



Documento assinado eletronicamente por Ana Lúcia Brunialti Godard, Professora do Magistério Superior, em 04/08/2023, às 11:20, 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 Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior, em 04/08/2023, às 11:33, 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 Túlio Marcos Santos, Usuário Externo, em 04/08/2023, às 12:18, 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 Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho, Usuário Externo, em 04/08/2023, às 13:33, 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 Valbert Nascimento Cardoso, Professor do Magistério Superior, em 04/08/2023, às 15:00, 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 2513354 e o código CRC 64F96422.

---

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Professor Dr. Vasco Azevedo, e ao meu coorientador, Dr. Tulio Santos, pela oportunidade de aprendizado e por acreditarem no meu potencial durante todo o Mestrado.

Agradeço também à minha família, principalmente ao meu pai, José Francisco Campos, pelo apoio e por estar sempre presente em minha vida e atuação profissional.

Aos meus amigos que têm estado ao meu lado ao longo dos anos: Gabriel Laguardia, Lara Trigo, Lara Oliveira, Alice Lima, Lucas Viana, Letícia Miranda e Mylena Kaizer. Amo muito vocês e sou muito grata por caminhararmos ao longo da vida juntos.

Agradeço às amigas que construí durante esses dois anos no Laboratório de Genética Celular e Molecular, por todas as risadas, conselhos e ensinamentos: Fernanda Lima, Andria Freitas, Juliana Laguna, Rhayane Viegas, Ludmila Quaresma, Gabriel Camargos, Joyce Dutra. Gostaria de destacar Luis Lima, que me ensinou o que é ser um pesquisador com todo o coração e a levar a vida de forma mais leve.

Agradeço a Monique por estar presente em todos os momentos ao longo desses dois anos e por todo o companheirismo.

Às secretárias Márcia Natália e Fernanda Magalhães por todos os conselhos.

A todos os colaboradores que ajudaram ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

*“Cada peça tem uma razão de ser qual é”*

*Izabel Allende*

## RESUMO

A mucosite é uma inflamação ulcerativa que ocorre no trato gastrointestinal durante o tratamento de câncer com quimioterápicos, como o 5-fluorouracil (5-FU), impactando diretamente a qualidade de vida dos pacientes e a eficácia da terapia oncológica. O uso de linhagens probióticas pode ser uma estratégia terapêutica eficaz para mitigar os severos danos intestinais causados pela quimioterapia com 5-FU. No entanto, uma vez que os efeitos dos probióticos dependem da espécie e linhagem específicas, é importante avaliar novos probióticos em relação às suas propriedades anti-inflamatórias e outros benefícios para a saúde do hospedeiro. Neste contexto, a linhagem *L. rhamnosus* L156.4, isolada de camundongos NIH, foi investigada quanto ao seu potencial terapêutico. Estudos *in vitro* demonstraram que essa linhagem apresenta ação antagonista contra bactérias patogênicas e inibe o crescimento de fungos filamentosos. Com base nesses resultados promissores, o presente estudo buscou avaliar o efeito enteroprotetor *in vivo* da administração oral dessa cepa bacteriana em um modelo murino de mucosite intestinal induzida pelo 5-FU (300mg/Kg). A linhagem *L. rhamnosus* L156.4 foi administrada aos animais por gavagem na concentração de  $10^9$  UFC/mL. Os resultados obtidos revelaram que o tratamento com *L. rhamnosus* L156.4 foi capaz de prevenir a presença de infiltrado inflamatório no trato gastrointestinal dos animais e melhorar o escore histopatológico, bem como a arquitetura da mucosa intestinal dos animais, quando comparados ao grupo controle com mucosite induzida por 5-FU. No entanto, observou-se que essa cepa não foi eficaz em prevenir o encurtamento do intestino, atenuar a perda de peso ou diminuir a permeabilidade intestinal nos animais inflamados. Em conclusão, a administração oral de *L. rhamnosus* L156.4 demonstrou efeitos benéficos ao melhorar alguns parâmetros relacionados à mucosite intestinal experimental induzida pelo 5-FU. Embora não tenha sido capaz de prevenir completamente todos os efeitos adversos da quimioterapia, esses resultados sugerem que essa cepa bacteriana *L. rhamnosus* L156.4 possui potencial como estratégia terapêutica complementar no manejo da mucosite intestinal. Estudos adicionais são necessários para aprofundar o conhecimento sobre seus mecanismos de ação e determinar a melhor forma de utilização clínica dessa cepa probiótica.

**Palavras-chave:** Quimioterapia; inflamação intestinal. probióticos; inflamação; imunomodulação.

## ABSTRACT

Mucositis is an ulcerative inflammation in the gastrointestinal tract during cancer treatment with chemotherapeutic drugs, such as 5-fluorouracil (5-FU), directly impacting patients' quality of life and the efficacy of cancer therapy. Probiotic strains may be an effective therapeutic strategy to mitigate the severe intestinal damage caused by 5-FU chemotherapy. However, since the effects of probiotics depend on the specific species and strain, it is important to evaluate new probiotics concerning their anti-inflammatory properties and other host health benefits. In this context, *Lacticaseibacillus rhamnosus* strain L156.4, isolated from NIH mice, was investigated for its therapeutic potential. *in vitro* studies demonstrated that this strain exhibits antagonistic action against pathogenic bacteria and inhibits the growth of filamentous fungi. Based on these promising results, the present study sought to evaluate the *in vivo* enteroprotective effect of oral administration of this bacterial strain in a murine model of intestinal mucositis induced by 5-FU (300mg/Kg). *L. rhamnosus* strain L156.4 was administered to the animals by gavage at  $10^9$  CFU/mL concentration. The results obtained revealed that the treatment with *L. rhamnosus* L156.4 was able to prevent the presence of inflammatory infiltrate in the gastrointestinal tract of the animals and improve the histopathological score as well as the architecture of the intestinal mucosa of the animals when compared to the control group with 5-FU-induced mucositis. However, it was observed that this strain was not effective in preventing intestinal shortening, attenuating weight loss, or decreasing intestinal permeability in the inflamed animals. In conclusion, oral administration of *L. rhamnosus* L156.4 demonstrated beneficial effects by improving some parameters related to 5-FU-induced experimental intestinal mucositis. Although it could not completely prevent all adverse effects of chemotherapy, these results suggest that this bacterial strain *L. rhamnosus* L156.4 has potential as a complementary therapeutic strategy in the managing intestinal mucositis. Further studies are needed to deepen the knowledge about its mechanisms of action and to determine the best way to clinically utilize this probiotic strain.

**Keywords:** Chemotherapy; intestinal inflammation. probiotics; inflammation; immunomodulation.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 MUCOSA DO TRATO GASTROINTESTINAL .....	11
1.2 ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO DO ANTINEOPLÁSICO 5-FLUORURACIL (5-FU).....	14
1.3 MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU .....	17
1.4 SINAIS, SINTOMAS E FORMAS DE TRATAMENTO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU .....	19
1.5 PROBIÓTICOS .....	20
1.6 LACTOBACILLUS E SEUS EFEITOS CONTRA DANOS INTESTINAIS.....	22
1.7 <i>LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS</i> GG .....	23
1.8 <i>LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS</i> L156.4.....	25
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>28</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
4.1 BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	28
4.2 ANIMAIS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	29
4.3 ANÁLISE DO PESO CORPORAL.....	30
4.4 PERMEABILIDADE INTESTINAL.....	31
4.5 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS E ESCORES HISTOPATOLÓGICOS .....	31
4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO).....	32
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	33
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
5.1 <i>LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS</i> L156.4 NÃO PREVINE O ENCURTAMENTO DO INTESTINODELGADO DE ANIMAIS COM MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU .....	34
5.2 <i>LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS</i> L156.4 NÃO ATENUA A PERDA DE PESO DOS ANIMAIS COM MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU .....	35
5.3 <i>LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS</i> L156.4 REDUZIU O INFILTRADO INFLAMATÓRIO EM ANIMAIS COM MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU .....	36
5.4 TRATAMENTO COM <i>LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS</i> L156.4 NÃO ATENUA O AUMENTO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL NO MODELO MURINO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU .....	37
5.5 <i>LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS</i> L156.4 MELHORA OS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS EMORFOMÉTRICOS NO ÍLEO DE CAMUNDONGOS COM MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FU .....	38
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>8 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>47</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>48</b>
<b>10 ANEXO 1- PROTOCOLO 6/2023 CEUA/UFMG</b> .....	<b>62</b>
<b>11 APÊNDICE A – PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>63</b>
11.1 ARTIGO DE REVISÃO: <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> AS AN INTERLEUKIN DELIVERY SYSTEM FORPROPHYLAXIS AND TREATMENT OF INFLAMMATORY AND AUTOIMMUNE DISEASES.....	63
11.2 REVISÃO SISTEMÁTICA: ANAEROBIC DIGESTION USING COCOA RESIDUES AS SUBSTRATE: SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. ....	77
11.3 EFFECTIVE BIOCORROSIVE CONTROL IN OIL INDUSTRY FACILITIES: 16S rRNA GENE METABARCODING FOR MONITORING MICROBIAL COMMUNITIES IN PRODUCED WATER .....	78
11.3 GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR 11 DELIVERED BY DAIRY <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> STRAINS MODULATES INFLAMMATION AND PREVENTS MUCOSAL DAMAGE IN A MICE MODEL OF	

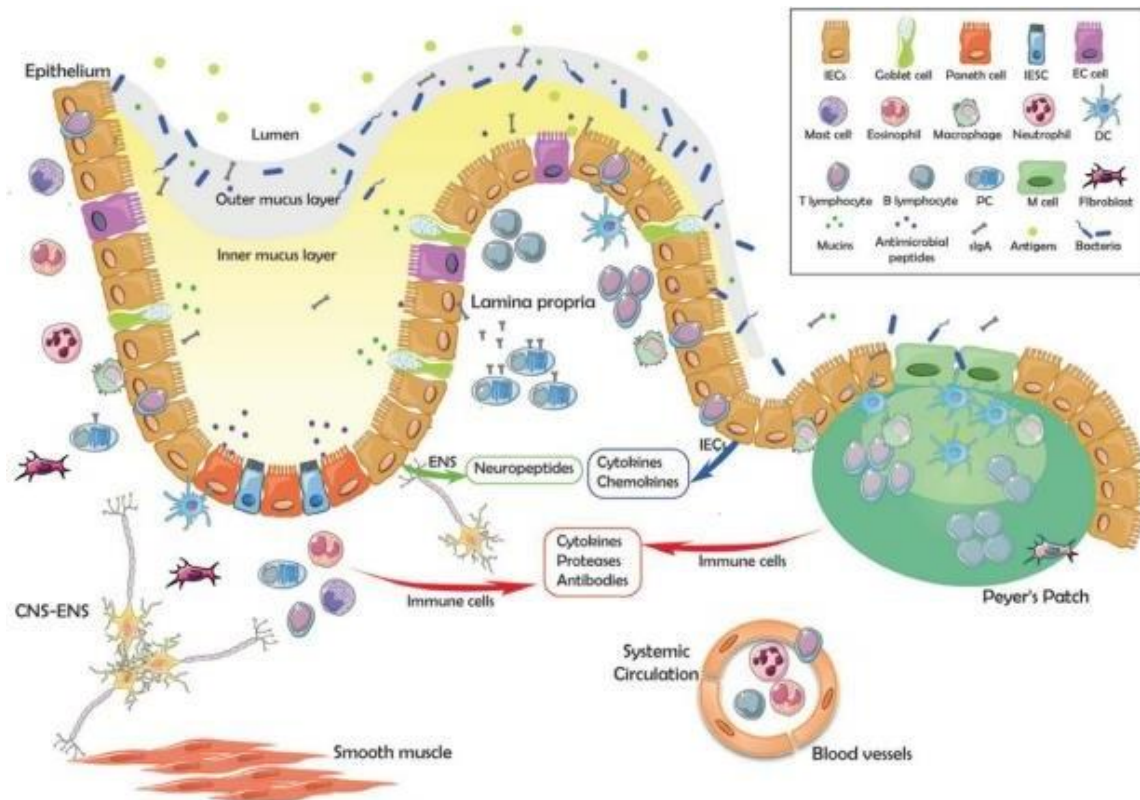
INTESTINAL MUCOSITIS.....	79
11.4 SYNERGISTIC SYNBIOTIC CONTAINING FRUCTOOLIGOSACCHARIDES AND <i>LACTOBACILLUS DELBRUECKII</i> CIDCA 133 ALLEVIATES CHEMOTHERAPY-INDUCED INTESTINAL MUCOSITIS IN MICE. ....	80
11.5 LYOPHILIZED SYMBIOTIC MITIGATES MUCOSITIS INDUCED BY 5-FLUOROURACIL.....	81
<b>12 CURRÍCULO LATTES .....</b>	<b>82</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 MUCOSA DO TRATO GASTROINTESTINAL

A mucosa do trato gastrointestinal (TGI) desempenha um papel fundamental na interação entre o ambiente externo e os tecidos do organismo, oferecendo, dentre outras funções, proteção contra agentes potencialmente prejudiciais (Salvo-Romero et al. 2015; König et al. 2016). Ela possui uma estrutura anatômica semelhante e é revestida por uma barreira epitelial delicada, cuja principal função é evitar a invasão de microrganismos. No entanto, as características que permitem atividades fisiológicas, como a absorção de nutrientes, também tornam as mucosas suscetíveis a invasões e infecções patogênicas. Assim, para garantir a proteção adequada, as mucosas contam com um sistema imunológico especializado e altamente adaptativo conhecido como sistema imune de mucosas (Holmgren and Czerkinsky 2005; Hardy et al. 2013).

A primeira linha de defesa do trato gastrointestinal é a camada de muco que recobre toda a superfície intestinal. Os componentes da camada de muco são mucinas, peptídeos antimicrobianos (AMPs), Imunoglobulina A secretória (sIgA) e bactérias comensais que impedem a colonização de patógenos por inibição competitiva e pela síntese de metabólitos que contribuem para homeostase intestinal, formando a primeira linha de defesa contra invasão de patógenos e antígenos externos (Salvo-Romero et al. 2015; Camilleri et al. 2012; König et al. 2016; Vancamelbeke and Vermeire 2017). As mucinas, constituem uma família de proteínas de alto peso molecular que são secretadas constitutivamente por células caliciformes ao longo de toda a extensão do epitélio intestinal, sendo assim, os principais componentes (Figura 1). A principal mucina secretada é denominada de mucina-2 (MUC2) (Gendler and Spicer 1995; L. W. Peterson and Artis 2014; Tassell and Miller 2011). Além disso, as mucinas estão envolvidas na proliferação celular e na inibição da apoptose (M. E. V. Johansson et al. 2011).



**Figura 1. Ilustração esquemática da anatomia da barreira intestinal e seus componentes.** A mucosa intestinal apresenta uma camada de células epiteliais e uma região subepitelial que contém a lâmina própria, o sistema nervoso entérico, 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 está a camada de muco, a microbiota e IgA secretória. Abaixo da camada epitelial está a lâmina própria constituída por macrófagos, células dendríticas, plasmócitos, neutrófilos e um tecido linfóide estruturado constituído por placas de Peyer, que contém células M, células dendríticas e linfócitos. **Fonte:** Salvo-Romero et al (2015).

Abaixo da camada de muco encontra-se a camada epitelial, que é constituída principalmente por uma única camada de células epiteliais denominadas enterócitos que estão organizadas entre vilosidades e criptas (Figura 1). Esta camada de células é selada por proteínas denominadas *tight junctions* (Ocludina, Claudina, Zonulina-1), que possuem o papel de vedar entre as células epiteliais adjacentes, impedindo assim a passagem paracelular de agentes exógenos tais como microrganismos e antígenos (Pastorelli et al. 2013; Zihni et al. 2016; Suzuki 2020).

Além dos enterócitos, outras células especializadas desempenham diversos papéis no epitélio intestinal como as células caliciformes (células secretoras de mucinas e peptídeos

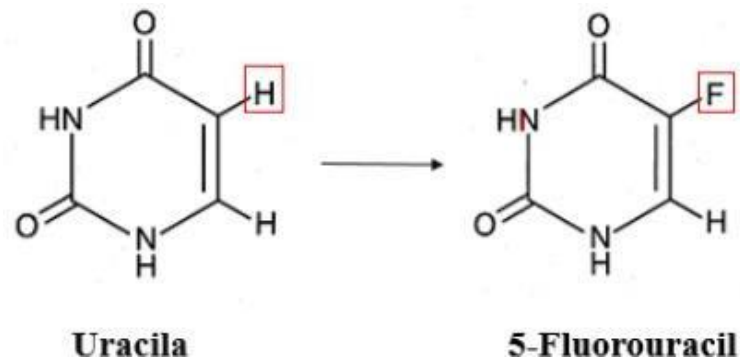


função de iniciar respostas imunes adaptativas por meio das células T (Nijhuis, Olivier, and de Jonge 2010). Já as células M são responsáveis pela captação de antígenos através da camada de células epiteliais e pela absorção de antígenos do lúmen intestinal (Salvo-Romero et al. 2015).

No intestino, é crucial ressaltar a interação entre o hospedeiro e a microbiota residente, que coevoluiu com o hospedeiro, estabelecendo uma relação simbiótica (Lane, Zisman, and Suskind 2017; Chang et al. 2012). Essas interações desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase intestinal. No entanto, quando essa relação simbiótica é afetada, a microbiota intestinal pode contribuir para o desenvolvimento de doenças infecciosas, aumentando a abundância de microrganismos patogênicos e desencadeando diversas doenças inflamatórias e autoimunes (Zheng et al. 2020a; Dieterich, Schink, and Zopf 2018). Com isso a interação entre o sistema imunológico e a microbiota intestinal apresenta um papel crucial na manutenção da homeostase intestinal.

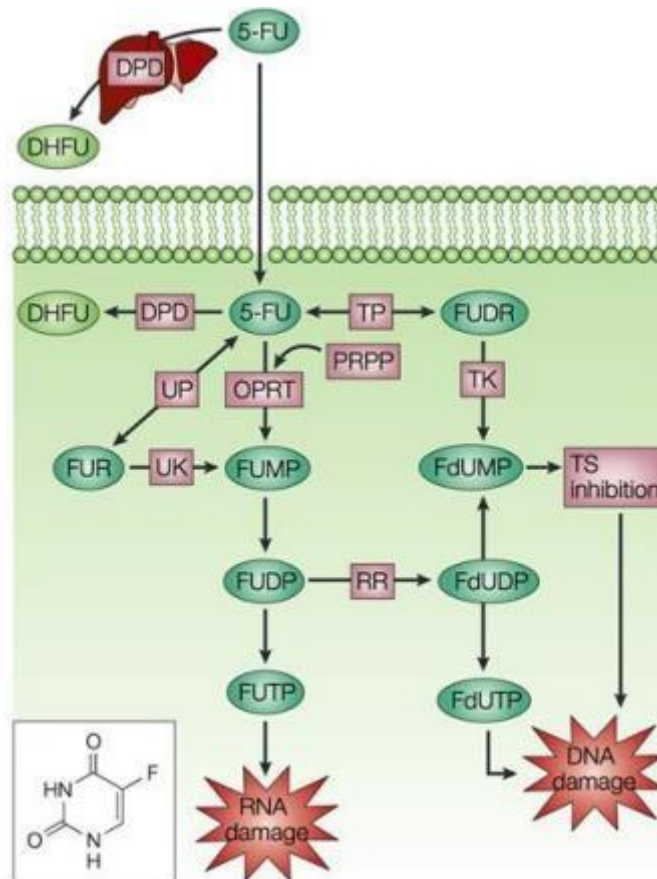
## 1.2 ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO DO ANTINEOPLÁSICO 5-FLUORURACIL (5-FU)

O 5-Fluoruracil (5-FU) é uma fluoro pirimidina, que se diferencia de sua molécula análoga, uracila, na porção 5 do anel aromático, onde há um átomo de flúor em vez de um de hidrogênio (Figura 3) (Longley, Harkin, and Johnston 2003; Miura et al. 2010). Esse fármaco foi desenvolvido em 1957 e introduzido na terapia oncológica para o tratamento de várias neoplasias, como câncer colorretal, câncer gástrico e câncer de mama (Heidelberger et al. 1957; Rudy and Senkowski 1973; Song et al. 2016) tendo como objetivo inibir, por meio de seus metabólitos, a divisão celular e a proliferação de células cancerosas (Heidelberger et al. 1957). O 5-FU atua principalmente através de sua conversão em metabólitos secundários, que agem através de vários mecanismos que interferem na síntese e reparo do DNA, divisão celular e composição do RNA (Longley, Harkin, and Johnston 2003; Miura et al. 2010).



**Figura 3.** Estrutura química do quimioterápico 5-Fluorouracil. Adaptada de Longley et al. (2003).

Uma vez administrado, o 5-FU utiliza os mesmos mecanismos de transporte de seu análogo, a molécula uracila (Miura et al. 2010) entrando na célula por transporte facilitado e é então convertido em metabólitos ativos como: trifosfato de fluordesoxiuridina (FdUTP), trifosfato de fluoruridina (FUTP) e monofosfato de fluordesoxiuridina (FdUMP) (Figura 4). O FdUMP liga-se à enzima timidilato sintase (TS) e forma um complexo que inibe a formação de desoxitimidina monofosfato, um componente vital para a síntese e reparo do DNA, resultando em danos ao material genético. Além disso, assim como as pirimidinas, a FdUTP pode ser incorporada ao DNA e a FUTP ao RNA, respectivamente, prejudicando sua composição, gerando morte celular (Rudy and Senkowski 1973; Longley, Harkin, and Johnston 2003; Miura et al. 2010).



**Figura 4. Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil.** O 5-FU penetra nas células e é metabolizado, dando origem a três metabólitos ativos principais: fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) e 5-fluorouridina trifosfato (FUTP). O FdUMP se liga à enzima timidilato sintase, resultando em um desequilíbrio de nucleotídeos e inibindo a síntese de DNA. Por outro lado, o FUTP é incorporado ao RNA, causando perda funcional e morte celular. **Fonte:** Longley et al (2003).

Além de afetar as células cancerosas, o 5-FU também é tóxico para as células normais, especialmente aquelas com alta proliferação, como as células epiteliais intestinais. Como resultado, muitos pacientes desenvolvem um quadro inflamatório conhecido como mucosite intestinal, (Soares et al. 2013; Song et al. 2016; Sonis 2004) uma vez que o 5-FU leva a alterações no trato gastrointestinal, como perda da arquitetura da mucosa devido à apoptose das células intestinais, alterações celulares, aumento da permeabilidade intestinal e dos níveis de mediadores inflamatórios como citocinas pró-inflamatórias (Chang et al. 2012; Zhang et al. 2019).

### 1.3 MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU

A mucosite é uma condição inflamatória que afeta o trato oral e/ou gastrointestinal (boca, esôfago, estômago, intestino delgado e cólon) (Peterson and Artis 2014; Andrade et al. 2023) do paciente oncológico em tratamento radioterápico ou quimioterápico. Os principais agentes quimioterápicos que induzem toxicidade gastrointestinal são: irinotecano, paclitaxel, oxaliplatina, lapatinibe, metotrexato, taxanos, cisplatina, carboplatina, antraciclina, citarabina, gemcitabina e fluoropirimidinas, incluindo 5-Fluorouracil (5-FU) (Thomsen and Vitetta 2018), entre outros.

A patologia da mucosite pode ser dividida em cinco estágios distintos: início, resposta inicial ao dano, amplificação do sinal, ulceração e cicatrização (Figura 5).

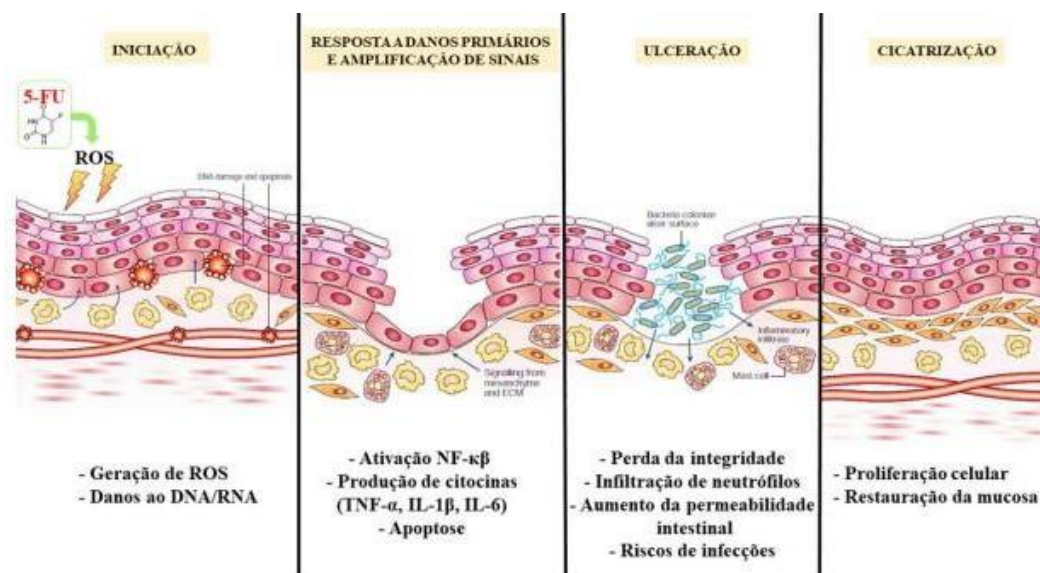
*Fase de iniciação:* Durante esta fase, a mucosa intestinal é exposta ao 5-FU, que causa danos às moléculas de DNA/RNA por meio da ligação direta ao material genético ou induzindo estresse oxidativo. Isso ocorre devido à metabolização do 5-FU pela enzima diidropirimidina desidrogenase (DPD), levando à formação de metabólitos intermediários altamente reativos, como fluoroacetato e ácido fluoro- $\beta$ -alanílico. Esses metabólitos podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) durante sua degradação, contribuindo para o estresse oxidativo e danos adicionais às células intestinais (Cereda, Caraccia, and Caccialanza 2018; Sonis 2004).

*Fase de resposta inicial ao dano:* Esses danos ao material genético são responsáveis pela indução de dano tecidual, que ativa várias vias de transdução de sinal, como a via do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Isso leva à ativação de vários mediadores inflamatórios, como a quimiocina COX-2, as citocinas IL-8, TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$ , entre outras. Esses elementos são responsáveis pelo estado pró-inflamatório no tecido (Cinausero et al. 2017; Sonis 2004; A. T. Sougiannis et al. 2019).

*Fase de amplificação do sinal:* As citocinas pró-inflamatórias desencadeiam a fase de amplificação do sinal. Esse efeito é alcançado por meio de um mecanismo de feedback positivo que ativa as vias responsáveis por aumentar a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6, além do estresse oxidativo. O aumento da produção desses fatores desencadeia uma série de reações, resultando em dano tecidual ou aumento da produção de TNF, exacerbando a lesão inicial (Sonis 2004; A. T. Sougiannis et al. 2019).

*Fase ulcerativa:* A deterioração progressiva da mucosa intestinal culmina na fase ulcerativa, caracterizada pela perda da integridade de mucosa e função epitelial. Nessa fase, as lesões sintomáticas que ocorrem tornam a mucosa suscetível ao aumento da permeabilidade intestinal, presença de infiltrado inflamatório e ativação de células de defesa, incluindo macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, na lesão da mucosa local. Essas células aumentam a produção de compostos oxidativos, o que agrava as úlceras intestinais e leva a um aumento da translocação bacteriana podendo ocasionar riscos de infecções por microrganismos oportunistas (Cereda, Caraccia, and Caccialanza 2018; Cinausero et al. 2017; Sonis 2004).

*Fase de cicatrização:* Finalmente, a fase de cicatrização é caracterizada por um aumento na proliferação e diferenciação celular. Geralmente, essa fase ocorre cerca de 3 a 4 dias após a última sessão de quimioterapia, permitindo a restauração da mucosa intestinal (Sonis 2004).



**Figura 5.** Desenho esquemático das quatro diferentes fases de desenvolvimento da mucosite intestinal e suas principais características. Adaptado de Sonis (2004).

#### 1.4 SINAIS, SINTOMAS E FORMAS DE TRATAMENTO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU

A mucosite gastrointestinal é um efeito colateral que apresenta diversas complicações graves para pacientes que são submetidos a quimioterapia. Seu desenvolvimento não ocorre apenas como resultado de dano celular, mas também se dá por uma série de processos biológicos que ocorrem na submucosa (Chukwunyere et al. 2022; Sonis 2004).

A quimioterapia com o medicamento 5-FU pode ocasionar o desenvolvimento de mucosite oral e intestinal em pacientes (Ribeiro et al. 2016). A gravidade e a incidência da mucosite intestinal estão diretamente relacionadas ao tipo de regime quimioterápico empregado. Tanto o 5-FU quanto outros fármacos quimioterápicos apresentam potencial para causar danos à mucosa intestinal, resultando em vacuolização do tecido epitelial, morte celular nas criptas intestinais, aumento da produção de mucina e acúmulo de líquido no intestino delgado (Duncan and Grant 2003; Sonis 2004). A incapacidade de resistir ao dano e de se recuperar prontamente, a fim de restaurar a função de barreira epitelial após o uso de quimioterapia, é extremamente prejudicial aos pacientes com câncer, podendo resultar em diversas complicações, tais como ulceração, inflamação, dor, náusea, diarreia, perda de peso e sepse e disfunção de múltiplos órgãos (Keefe, Gibson, and Hauer-Jensen 2004; Dahlgren et al. 2021). Diversas pesquisas indicam que a mucosite gastrointestinal ocorre em aproximadamente 20% a 50% dos indivíduos que recebem o tratamento com 5-FU. Essa condição acarreta em complicações significativas, resultando no abandono do tratamento por parte de muitos pacientes. (Peterson, Bensadoun, and Roila 2011).

O 5-FU, além de causar danos celulares, tem sido associado a efeitos colaterais de longo prazo que afetam a função cognitiva, como confusão e deficiências de memória, resultando em um impacto significativo nos pacientes (Bader 1976; Lynch et al. 1981; Atkins et al. 1991). Esses efeitos podem perdurar por meses a anos. Diversos estudos foram conduzidos para investigar esses fenômenos, utilizando testes psicométricos em pacientes, e meta-análises revelaram um número significativo de pacientes que apresentaram um efeito leve a moderado de comprometimento da memória espacial e verbal. Alguns estudos indicaram que esses déficits podem persistir por anos, embora alguns pacientes possam retornar ao estado normal após 12 meses (Wigmore et al. 2010).

Existe uma demanda não atendida e em aberto para a identificação e desenvolvimento de tratamentos farmacológicos para as toxicidades gastrointestinais causadas pelo uso de quimioterápicos (Sougiannis et al. 2021; Dahlgren et al. 2021). Os objetivos gerais dessas

intervenções são reduzir os sintomas e aliviar o sofrimento dos pacientes. Essas abordagens podem incluir medidas profiláticas, uso de antioxidantes, drogas anti-inflamatórias e inibidores de apoptose durante o tratamento citostático, visando aliviar tanto as toxicidades imediatas quanto os efeitos associados (Dahlgren et al. 2021).

Um exemplo de tratamento atualmente utilizado para a mucosite intestinal é a amifostina, um pró-fármaco de aminotiol fosforilado que se converte rapidamente em citoprotetor ativo. Esse metabólito intracelular desintoxica metabólitos reativos de quimioterápicos e elimina radicais livres, potencialmente acelerando o reparo celular. No entanto, esse medicamento apresenta efeitos colaterais como náuseas e hipotensão, o que limita sua utilização clínica (Ranganathan et al. 2018; Bensadoun et al. 2006).

Apesar de décadas de investigações experimentais e clínicas sobre a mucosite intestinal induzida por quimioterapia, ainda não há nenhuma intervenção terapêutica eficaz disponível (Ribeiro et al. 2016; Wardill et al. 2019). Os tratamentos existentes têm como objetivo reduzir as complicações secundárias ao tratamento, como dor e diarreia. No entanto, até o momento, nenhum tratamento isolado proporciona uma transformação substancial no manejo clínico da mucosite intestinal. Infelizmente, a ocorrência da mucosite intestinal em pacientes é difícil de quantificar devido ao acesso limitado à mucosa intestinal e à falta de testes confiáveis (Sougiannis et al. 2021). Além disso, os tratamentos atuais são predominantemente paliativos, e assim a busca por novos agentes profiláticos, como o uso de probióticos, continua incessante.

## 1.5 PROBIÓTICOS

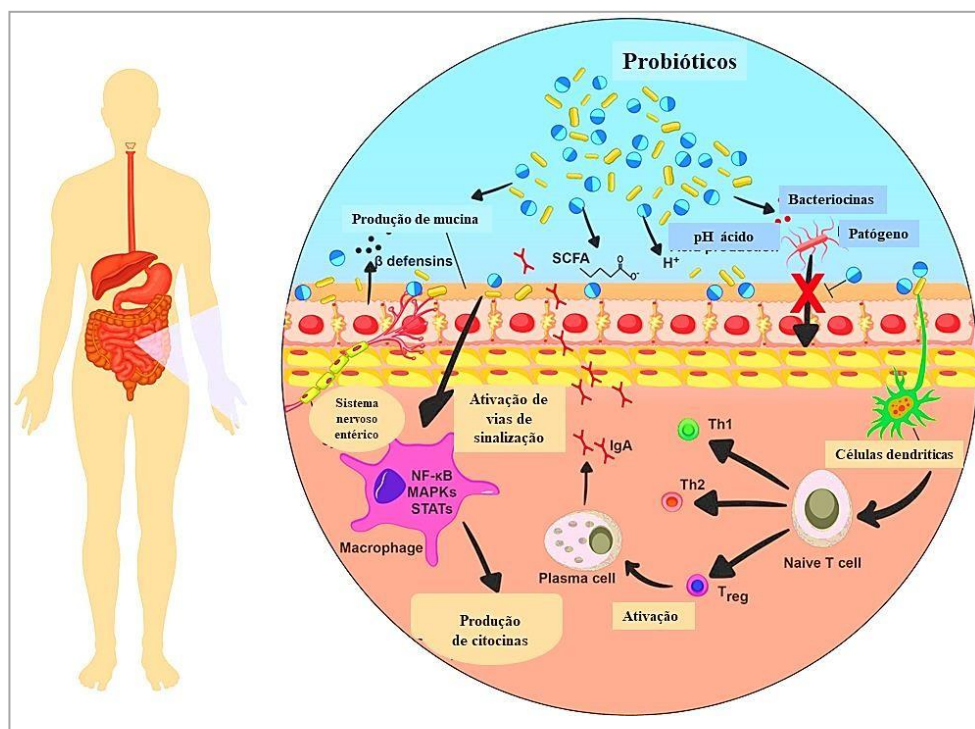
Os probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, exercem efeitos benéficos sobre o hospedeiro”(Hill et al. 2014).

A maior parte dos probióticos estudados pertence ao grupo das Bactérias lácticas (BLs), caracterizado como um grupo de microrganismos Gram-positivos, anaeróbicos ou aerotolerantes, não formadores de esporos, não móveis e altamente tolerante ao baixo pH do TGI, que podem ser isolados de diferentes ambientes, sendo assim capazes de produzir ácido láctico como produto final da fermentação de carboidratos (Mokoena 2017). Neste grupo se incluem principalmente espécies do gênero *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* e *Lactobacillus* (Cano-Garrido et al. 2015; Zheng et al. 2020b; Stiles and Holzapfel 1997). Probióticos de nova geração começaram recentemente a serem utilizados e estes são derivados da microbiota comensal de indivíduos saudáveis como por exemplo

*Bifidobacterium*, *Akkermansia* e *Faecalibacterium* (Nishida et al. 2018).

Essas bactérias são utilizadas em diversos processos industriais, tanto na produção e preservação de alimentos como iogurtes, queijos, leites fermentados, entre outros (Soccol et al. 2010). Além disso, possuem uma grande relevância biotecnológica na preservação da saúde e na prevenção de infecções. São amplamente exploradas em várias áreas, incluindo a produção de proteínas heteróloga e como veículo para entrega de biomoléculas terapêuticas. Essa utilização possui potencial para o tratamento e prevenção de diversas comorbidades (Carvalho et al. 2017; Gomes-Santos et al. 2017; Górska et al. 2019).

As linhagens probióticas de BLs são consideradas seguras para consumo humano (GRAS-*Generally Recognized as safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Essas propriedades probióticas vem sendo demonstradas por meio de estudos utilizando modelos animais e evidências clínicas, como adjuvante no tratamento da doença de Crohn e colite ulcerativa (Fedorak et al. 2015; Bjarnason, Sission, and Hayee 2019a), mucosite intestinal (De Jesus et al. 2019), câncer colorretal (Górska et al. 2019), diabetes (Hsieh et al. 2018), artrite (Lei et al. 2017). Estes mecanismos utilizados por probióticos que conferem benefícios ao hospedeiro são diversos e específicos de cada linhagem, dependendo também da quantidade de bactéria a ser administrada (Plaza-Diaz et al. 2019a; Batista et al. 2020). (Figura 6).



**Figura 6. Principais mecanismos de ação propostos para bactérias probióticas no Trato Gastrointestinal humano.** Os principais mecanismos de ação dos probióticos são: aumento da barreira epitelial e produção de mucinas pelas células caliciformes, interação com a mucosa intestinal e inibição da adesão de patógenos, exclusão competitiva de microrganismos patogênicos. **Fonte:** Adaptado de Batista et al. (2020).

A utilização de linhagens probióticas é uma abordagem promissora para o tratamento de doenças inflamatórias, porém seu uso como terapia depende dos efeitos intrínsecos da cepa bacteriana e também do modelo de doença avaliado (Aggarwal et al. 2020). Assim, é essencial avaliar cuidadosamente as características específicas de cada linhagem antes de empregá-la em aplicações probióticas, uma vez que as propriedades biológicas individuais desses microrganismos podem apresentar uma variação significativa devido à diversidade genômica (Sanders et al. 2010; de Jesus et al. 2022).

### 1.6 LACTOBACILLUS E SEUS EFEITOS CONTRA DANOS INTESTINAIS

As linhagens bacterianas com potencial probiótico mais estudadas atualmente pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Recentemente o gênero *Lactobacillus* sofreu uma modificação taxonômica, onde parte das linhagens foram reclassificadas em 25 gêneros, incluindo o gênero alterado *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* e 23 novos gêneros: *Holzzapfelia*, *Amilolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*,

*Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* e *Lentilactobacillus*. Essa reclassificação reflete a posição filogenética dos microrganismos e agrupa os lactobacilos em clados robustos com propriedades ecológicas e metabólicas compartilhadas (Zheng et al. 2020a). Para fins de melhor leitura, usarei neste trabalho o termo “lactobacilos” para esses microrganismos.

Muitas linhagens de lactobacilos foram isoladas e têm tido seu potencial probiótico caracterizado, mostrando vários efeitos benéficos principalmente no que se diz respeito aos seus efeitos imunomodulatórios e anti-inflamatórios no TGI, incluindo contra danos epiteliais ocasionados pelo quimioterápico 5-FU. Como por exemplo a linhagem *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 que teve seu potencial terapêutico demonstrado em ensaios *in vivo* utilizando o leite fermentado na mucosite intestinal induzida por 5-FU (De Jesus et al. 2019). As linhagens *L. casei* BL23 e *L. casei* ATCC393 apresentaram efeitos anticarcinogênicos e de prevenção de distúrbios inflamatórios intestinais ao reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-17 e IL-22, respectivamente (Rochat et al. 2007; Lee et al. 2015). Experimentos realizados *in vitro* revelaram o potencial de metabólitos derivados de *L. rhamnosus* GG e *L. reuteri* DSM17938 em modular a ativação excessiva de células T CD4+ e células T CD8+, bem como células Natural Killer (NK), durante a infecção de células mononucleares do sangue periférico por *Staphylococcus aureus* (Johansson et al. 2016).

Algumas espécies de lactobacilus, como *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. rhamnosus*, têm sido alvos de estudos para a modulação de danos intestinais induzidos pelo antineoplásico 5-FU. Esses estudos demonstraram resultados promissores tanto *in vitro* (Fang et al. 2014) quanto *in vivo* (Smith et al. 2008; Yeung et al. 2015; Justino et al. 2015a; Oh et al. 2017). Foi observado que *L. acidophilus* tem a capacidade de reduzir a lesão intestinal causada pelo 5-FU (450 mg/kg), inibindo a sinalização da via NF- $\kappa$ B. Isso resultou em níveis mais baixos de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e a quimiocina CXCL-1 (Justino et al. 2015a). Além disso, Oh et al. (2017) constataram que *L. acidophilus* A4 reduz a severidade da mucosite intestinal induzida pelo 5-FU (150 mg/kg) por meio da estimulação da superexpressão de genes de mucida (MUC2 e MUC5AC), redução da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e inibição dos níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$ .

### 1.7 LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS GG

O gênero *Lacticaseibacillus* abriga linhagens da espécie *L. rhamnosus* que têm sido alvo de estudos no que diz respeito à sua capacidade em regular danos inflamatórios intestinais, tanto *in vitro* (Buccigrossi et al. 2022) como *in vivo* (Tong et al. 2021) em modelos experimentais de infecção por patógenos e inflamação intestinal. A linhagem mais estudada e utilizada atualmente como probiótico é a *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103). Esta linhagem foi a primeira a ser patenteada em 1989 e apresenta diversos estudos comprovando sua eficácia contra infecções gastrointestinais e diarreia (Folwarski et al. 2021; Österlund et al. 2007). Atualmente é comercializada e já foi utilizada em diversos estudos clínicos, incluindo em pacientes que apresentavam pneumonia associada à ventilação mecânica (Johnstone et al. 2021), gastroenterite em crianças (Schnadower et al. 2018), manifestações alérgicas (Berni Canani et al. 2017), dentre outras.

Um estudo *in vitro* conduzido por Prisciandaro et al. (2012) demonstrou que o pré-tratamento com *L. rhamnosus* GG foi capaz de prevenir ou inibir a apoptose das células epiteliais de ratos IEC-6 e reduzir a perda da função de barreira intestinal induzida por 5-FU (5 µM) (Prisciandaro et al. 2012). Em um modelo *in vitro* de mucosite induzida por 5-FU, foi observado que após 2 horas de tratamento, *L. rhamnosus* GG aumentou a expressão de MCP-1. Após 4 horas de tratamento, tanto a forma inativada quanto a forma viável da bactéria aumentaram a expressão de TNF. Além disso, foi observado que apenas na presença da bactéria viável houve diferenças significativas na expressão de IL-12 (Fang et al. 2014).

Em um modelo de mucosite intestinal, *L. rhamnosus* GG foi testada e demonstrou a capacidade de atenuar a perda de peso. Além disso, observou-se um aumento nos níveis de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) nas fezes dos camundongos tratados com *L. rhamnosus* GG. Adicionalmente, esse probiótico também promoveu um aumento nos níveis de ZO-1 e OCLU, proteínas essenciais para a integridade da barreira intestinal (Yue et al. 2022).

Está claro que os probióticos proporcionam efeitos benéficos, como a preservação da integridade dos enterócitos (Prisciandaro et al. 2012), modulação da inflamação (Justino et al. 2015) e manutenção da função de barreira (Yeung et al. 2013), sugerindo que o uso desses microrganismos pode ser uma estratégia terapêutica eficaz contra os efeitos adversos do quimioterápico 5-FU. É fundamental destacar que os efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios observados até o momento são específicos para as espécies e linhagens de lactobacilos estudadas. Portanto, é necessário continuar a busca por novas espécies e

linhagens com potencial probiótico, além de investigar seus efeitos em diferentes alvos e doenças, a fim de expandir nosso conhecimento sobre suas propriedades terapêuticas, de modo especial para mucosite causada por quimioterápicos

#### 1.8 *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* L156.4

Uma outra linhagem do gênero *Lacticaseibacillus* que vem tendo sua caracterização probiótica realizada no nosso laboratório é a cepa *L. rhamnosus* L156.4. Esta linhagem foi isolada de fezes de camundongos NIH, teve seu genoma sequenciado e montado, o que permitiu identificar *in silico* a presença uma bacteriocina putativa que pertence a superfamília Enterocin A (Oliveira et al. 2017). A bacteriocina desta linhagem foi caracterizada *in vitro* e positivamente associada à capacidade de inibir o crescimento de bactérias patogênicas e não patogênicas como *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria. monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella sonnei* e *Klebsiella pneumoniae*. Esta bacteriocina não teve atividade inibitória contra *L. acidophilus*, *L. brevis* e *L. rhamnosus* (Oliveira et al. 2017).

Estes efeitos foram atribuídos tanto à presença da bacteriocina identificada, como também pode ser atribuído a uma produção de ácidos orgânicos pela linhagem (Oliveira et al. 2017). Também foi identificada a ação antifúngica *in vitro* da linhagem *L. rhamnosus* L156.4 contra *Penicillium chrysogenum* e *Fusarium oxysporum*. No entanto, essa linhagem não foi capaz de inibir o crescimento de *Candida tropicalis* (AF09 e AF14), *Candida glabrata* (AF31 e AF25), *Candida parapsilosis* (VRGF), *Candida guilliermondii* (AF24) e *Candida albicans* (AF32 e MERM). Além disso, testou-se a atividade de inibição do crescimento de *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) pelo método de *overlay*, e todas as cepas foram totalmente inibidas. (de Oliveira et al, 2019).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito enteroprotetor da linhagem *L. rhamnosus* L156.4 em um modelo murino de mucosite intestinal induzida pelo antineoplásico 5-Fluorouracil (5-FU).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da linhagem *L. rhamnosus* L156.4 sobre a perda de peso dos animais;
- Avaliar o efeito da linhagem *L. rhamnosus* L156.4 sobre a arquitetura da barreira epitelial intestinal;
- Avaliar o efeito da linhagem *L. rhamnosus* L156.4 sobre o infiltrado celular.

### 3 JUSTIFICATIVA

Os probióticos vêm sendo recomendados como adjuvantes para o tratamento de diversas doenças inflamatórias intestinais, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e/ou adjuvante. Muitas linhagens de *L. rhamnosus* tem sido testadas em diferentes modelos inflamatórios como osteoartrite (Jhun et al. 2021), colite induzida por DSS agravada com *Candida albicans* (Panpetch et al. 2020), infecção por *Salmonella* (Peng et al. 2022), entre outras. No entanto, deve-se ressaltar que os efeitos são linhagens dependentes, havendo dessa forma a necessidade de que novos candidatos probióticos sejam identificados e testados em diferentes condições patológicas.

Diante das propriedades da linhagem *L. rhamnosus* L156.4 em inibir o crescimento de microrganismos patogênicos *in vitro*, associados ao fato de que não existem relatos na literatura que mostrem o potencial anti-inflamatório desta linhagem em testes *in vivo*, a investigação acerca do potencial enteroprotetor e imunomodulador desta linhagem usando um modelo murino de mucosite intestinal por quimioterapia (5-FU) é de alta relevância.

Devido à facilidade de reprodução em animais experimentais, o modelo de mucosite intestinal induzida por agentes quimioterápicos, como 5-FU, cisplatina, oxaliplatina, irinotecano, entre outros, tem sido amplamente utilizado em estudos para caracterizar e investigar o potencial efeito anti-inflamatório de candidatos probióticos. Tendo em vista o conhecimento prévio do efeito antibacteriano da linhagem *L. rhamnosus* L156.4, este trabalho propôs investigar se esta linhagem possui também propriedades anti-inflamatórias em um modelo de mucosite intestinal induzida pelo antineoplásico 5-Fluorouracil (5-FU).

### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

*Lactobacillus rhamnosus* L156.4 foi cultivada em meio MRS-Man-Rogosa and Sharpe (Sigma, Estados Unidos da América), suplementado com Tween 80% em estufa bacteriológica a 37 °C por 16 horas sem agitação e em condição de microanaerobiose. Para fins de estocagem, após o cultivo nas condições citadas, as culturas foram diluídas em solução estéril de glicerol 15% e acondicionadas em ultra-freezer a -80 °C.

Para o preparo das doses bacterianas, 20 µL da cultura bacteriana foram adicionados a 15mL de meio MRS e mantidos a 37°C em estufa bacteriológica, sem agitação, durante 16 horas, em microaerobiose. Em seguida, foi feita uma diluição em 15 mL de meio MRS partindo de uma absorbância de 0,1 (DO<sub>600nm</sub>) que foi cultivada nas mesmas condições.

Quando a absorbância atingiu a  $DO_{600nm}$  igual a 1,3 (correspondente a  $1,2 \times 10^9$  UFC/mL) as culturas foram aliqüotadas em 1 mL, centrifugadas (13.000 rpm por 5 min), e o sobrenadante descartado. Em seguida foi realizada uma lavagem com PBS 0,1M (pH 7,4). O precipitado final foi ressuspendido em PBS 0,1 M (pH 7,4) estéril (200  $\mu$ L) para administrar aos animais via gavagem. Como controle dos experimentos no modelo animal de mucosite intestinal induzida por 5-FU, nós utilizamos a linhagem probiótica *L. rhamnosus* GG, que foi crescida nas mesmas condições citadas anteriormente.

#### 4.2 ANIMAIS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

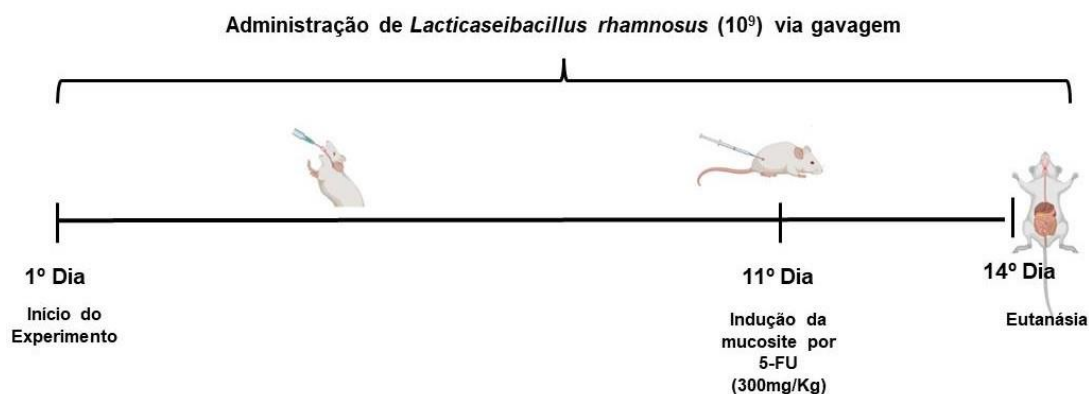
Camundongos BALB/c machos com 7-8 semanas de idade foram obtidos do Centro de bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos em mini-isoladores em condições controladas: temperatura  $25 \pm 2$  °C, ciclo alternado 12h/12h claro/escuro, com água e alimento *ad libitum* até o início do protocolo experimental. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (protocolo 6/2023, Anexo I). O modelo de mucosite intestinal foi induzido de acordo com Carvalho et al (2017). Os camundongos receberam uma única dose de 300mg/kg de 5-fluorouracil (Flaudfluor®, lote 22D0381, Libbs, São Paulo, Brasil), no 11° dia de experimentação por via intraperitoneal (*i.p*), sendo eutanasiados no 14° dia (Figura 7). O grupo controle recebeu PBS (pH 7,4) por via intraperitoneal. Para o tratamento, os grupos receberam via gavagem *L. rhamnosus* LR156.4 e *L. rhamnosus* GG (109 UFC/mL) em 200 $\mu$ L de PBS. Os grupos controles receberam 200  $\mu$ L de PBS via gavagem. Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais (n=7), descritos na tabela 1.

**Tabela 1: Grupos experimentais, tratamentos e vias de administração utilizados no protocolo experimental**

Grupos	Tratamento/Indução	Administração
Controle	PBS/PBS	Gavagem/Intraperitoneal
L156.4	$10^9$ UFC/ mL Bactéria / PBS	Gavagem /Intraperitoneal
LGG	$10^9$ UFC/ mL Bactéria / PBS	Gavagem /Intraperitoneal

MUC	PBS/ 5-FU	Gavagem/Intraperitoneal
L156.4 MUC	10 <sup>9</sup> UFC/ mL Bactéria / 5-FU	Gavagem/Intraperitoneal
LGG MUC	10 <sup>9</sup> UFC/ mL Bactéria / 5-FU	Gavagem/Intraperitoneal

Após o 14<sup>o</sup> dia, os animais foram anestesiados (10 mg/kg de Xilazina e 100 mg/kg de Cetamina) (*i.p*) para a coleta de sangue e posteriormente eutanasiados por deslocamento cervical. O intestino delgado foi mensurado e dividido em porções anatômicas, conforme proposto por Ferraris e Vinnakota (1995), sendo o duodeno correspondente a aproximadamente 20%, o jejuno a 60% e o íleo a 20% do comprimento total. O íleo foi coletado para as análises histológicas, ensaio enzimático para avaliação do infiltrado de neutrófilos e para dosagem de citocinas. Após a retirada dos órgãos, as carcaças foram acondicionadas em freezer até o momento da coleta.



**Figura 7: Delineamento experimental.** Os animais receberam diariamente, por 14 dias, 10<sup>9</sup> UFC/mL de *L. rhamnosus* LR156.4. ou *L.rhamnosus* GG via gavagem (grupos L156.4; LGG; L156.4 MUC; LGG MUC). Os grupos controle (CN) e mucosite (MUC) receberam PBS (pH 7,4) também por gavagem pela mesma via. No 11<sup>o</sup> dia induziu-se a mucosite com uma única dose intraperitoneal do quimioterápico 5-FU (300mg/Kg). Os grupos controle (CN; L156.4; LGG) receberam uma única dose de PBS via intraperitoneal.

#### 4.3 ANÁLISE DO PESO CORPORAL

Os animais foram pesados diariamente utilizando balança analítica (Bel. Paraná-PR) durante todo o período experimental. Os valores encontrados foram expressos em porcentagem (%) da perda de peso no final do experimento em relação ao peso inicial do dia da administração de 5-FU e variação do peso ao longo de todo o protocolo experimental.

#### 4.4 PERMEABILIDADE INTESTINAL

As análises de permeabilidade intestinal (PI), foram realizadas de acordo com Barros et al (2018) na Escola de Farmácia da UFMG, especificamente no laboratório de Radiofarmácia sob a supervisão do professor Valbert Nascimento Cardoso e da professora Simone Odilia Antunes Fernandes. Os animais receberam por gavagem 100 µL de solução contendo 18,5 Megabecquerel (MBq) de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) marcado com o radioisótopo tecnécio ( $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA) quatro horas antes da eutanásia. Após este período, o sangue foi coletado da veia axilar em tubos de poliestireno para contagem da radioatividade em aparelho contador de radiação gama (Perkinelmer Wallac, 1480 Wizard 3) e determinação da PI. Os resultados obtidos foram comparados com o padrão da dose. O padrão da dose, corresponde a uma alíquota de igual volume de  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA oferecido aos animais, foi utilizado para correção do decaimento radioativo do  $^{99m}\text{Tc}$  e teve a radioatividade determinada no mesmo tempo dos demais tubos. O percentual da dose foi calculado de acordo com o peso do sangue (% dose por g de sangue) a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ dose de } ^{99m}\text{Tc} - \text{DTPA no sangue} \\ = [(cpm \text{ do sangue} \times 100) / cpm \text{ da dose (Padrão) administrada}]$$

Onde: cpm= contagem por minuto.

#### 4.5 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS E ESCORES HISTOPATOLÓGICOS

A secção intestinal correspondente ao íleo foi coletada, lavada em PBS (0,1M) e enrolada no sentido distal-proximal, sendo cuidadosamente amarrada em uma linha, e transferida para solução de formol tamponado 10% (Neon São Paulo-SP). O formol foi trocado após 24h para o melhor processamento das amostras por meio de técnicas histológicas de rotina. As lâminas foram preparadas pela empresa Histotecnologia (Belo Horizonte, MG) e a avaliação do escore histopatológico das lâminas, foi realizado por meio do método previamente descrito por Howarth et al (1996), que atribui escore de 0 (normal) a 3 (máximo) para os parâmetros listados na Tabela 2 e avaliados no Instituto de Ciências Biológicas-UFMG professor Ênio Ferreira.

**Tabela 2: Parâmetros avaliados pelo método do escore histopatológico de lâminas descrito por Howarth *et al.* (1996).**

<b>Escore Howarth</b>	
<b>a</b>	Atrofia das vilosidades
<b>b</b>	Destruição das bordas em escova na superfície dos enterócitos
<b>c</b>	Redução das criptas e perda da arquitetura intestinal
<b>d</b>	Infiltrado inflamatório de leucócitos
<b>e</b>	Infiltração inflamatória
<b>f</b>	Edema de submucosa e muscular externa
<b>g</b>	Dilatação de vasos
<b>h</b>	Destruição das células das criptas

Para realização das análises morfométricas, 20 campos histológicos de cada lâmina foram capturados com auxílio de um microscópio óptico (Olympus BX41) acoplado ao sistema de aquisição de imagens (Software Spot Basic versão 3.4.5). As imagens obtidas com aumento de 100x foram analisadas por intermédio do software ImageJ (versão 1.51J8) para medição da altura das vilosidades e profundidade das criptas conforme (Howarth *et al.* 1996).

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A extensão do infiltrado celular por neutrófilos no intestino delgado foi estimada por meio da atividade da enzima mieloperoxidase, conforme descrito por Souza *et al.* (2000). Assim, cerca de 4 cm da porção correspondente ao íleo dos animais foram coletados, pesados e homogeneizados em Buffer 1 gelado (cloreto de sódio-NaCl 0,1 M; Na<sub>2</sub>EDTA 0,015 M, pH 4,7) (na proporção de 1,9 mL/100 mg de tecido) e centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e em seguida foram adicionadas as soluções de NaCl 0,2% gelado e NaCl 1,6% suplementado com glicose 5% (proporção: 1,5 mL/100 mg de tecido). As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi removido e ao conteúdo remanescente foi adicionado o Buffer 2 (fosfato monossódico-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Brometo de Hexadeciltrimetilamônio-HTAB 0,5%, pH 5,4) (proporção: 1,9 mL/100 mg de tecido) em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas à temperatura

ambiente, alternadamente, por três vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante foi coletado para o ensaio enzimático. Foram adicionados, à cada poço de uma placa de 96 poços (Nunc-Immuno, MaxiSorp), 25 µL de cada amostra e 25 µL do substrato TMB 1,6 mM (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (Sigma-Aldrich®), previamente diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). As amostras foram incubadas a 37°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de peróxido de hidrogênio 0,002% a cada poço e foi realizada nova incubação a 37°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de ácido sulfúrico-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M para interromper a reação, e a absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 450 nm, utilizando um leitor de microplacas (Bio-Rad modelo 450, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), sendo os resultados plotados em unidade arbitrária de enzima por miligrama de tecido (AU/mg) baseado na absorbância.

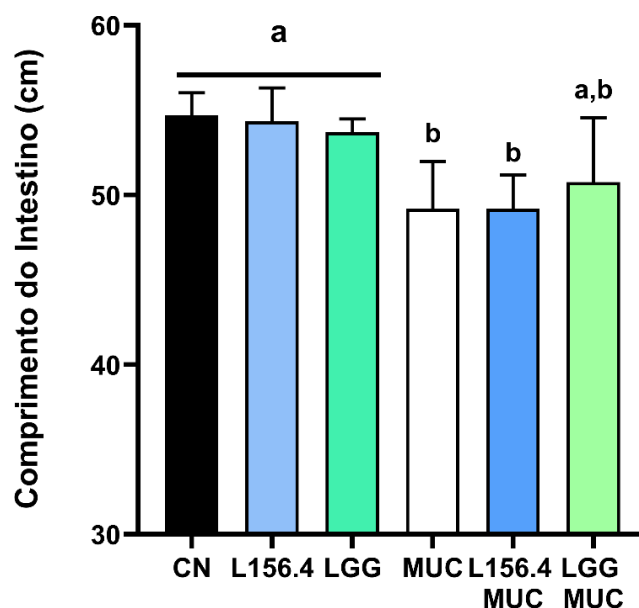
#### 4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 8.0. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para dados não paramétricos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Os dados paramétricos foram avaliados pelo teste One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* L156.4 NÃO PREVINE O ENCURTAMENTO DO INTESTINO DELGADO DE ANIMAIS COM MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU

Uma das manifestações da mucosite intestinal é a redução do comprimento do intestino delgado devido a perda de células. Assim, observou-se que os animais que receberam 5-FU (MUC) apresentaram reduções significativas no comprimento intestinal (49 cm em média) quando comparados aos grupos controle negativo (CN; 54 cm em média;  $p < 0,05$ ), como pode ser observado na Figura 8. O tratamento com *L. rhamnosus* GG (LGG MUC) foi capaz de prevenir o encurtamento do intestino delgado (50 cm em média) apresentando diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Já o tratamento *L. rhamnosus* L156.4 (L156.4 MUC) não foi capaz de prevenir o encurtamento intestinal induzido pelo 5-FU (49 cm em média;  $p > 0,05$ ). Não houve diferença estatística significativa nos grupos controles bacterianos (L156.4; LGG) quando comparados ao controle negativo (CN;  $p > 0,05$ ).

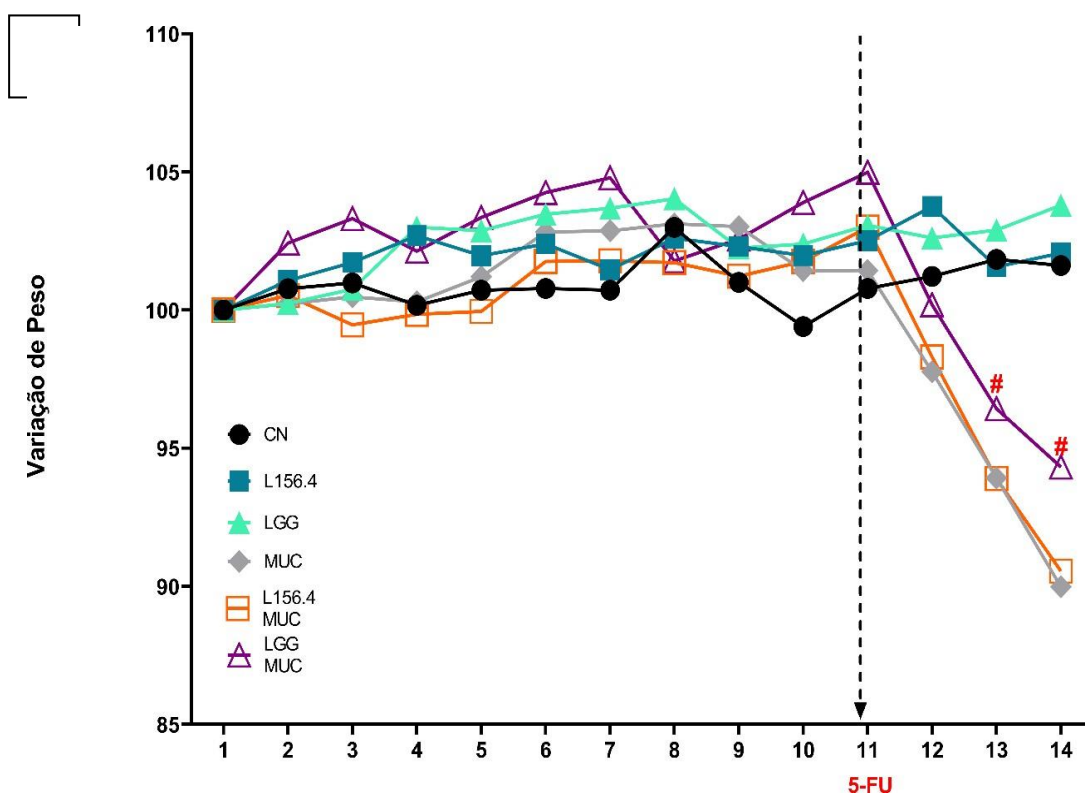


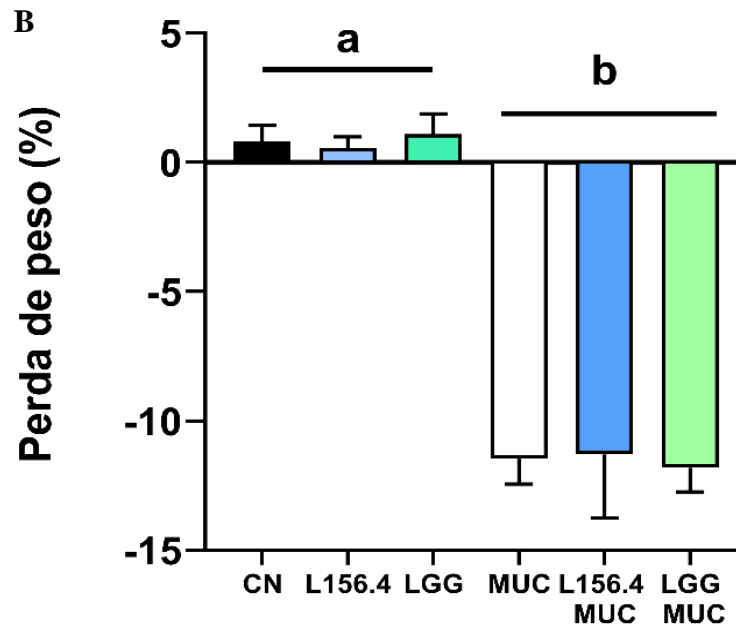
**Figura 8:** *L. rhamnosus* L156.4 não previne o encurtamento do intestino delgado alterado por 5-FU. Camundongos que receberam 5-FU (300mg/Kg) (MUC; L156.4 MUC; LGG MUC) ou salina 0,9% (CN; L156.4; LGG) por via intraperitoneal e que foram tratados via gavagem com PBS ou respectivas bactérias ( $10^9$  UFC) ( $n=7$  animais por grupo). Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) por One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. CN = controle negativo; L156.4 = controle bactéria; LGG = controle bactéria; MUC = mucosite; L156.4 MUC = L156.4 mucosite; LGG MUC = GG mucosite.

## 5.2 LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS L156.4 NÃO ATENUA A PERDA DE PESO DOS ANIMAIS COM MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU

Para avaliar o estado clínico dos animais ao longo do experimento, o peso de cada um deles foi medido diariamente. Não houve diferença significativa na variação de peso corporal entre os animais dos grupos controles experimentais até a indução da mucosite com 5-FU no 11º dia (Figura 9A). Como esperado, nos animais do grupo controle com mucosite (MUC) foi possível observar uma redução significativa da perda de peso ( $p < 0,05$ ) em comparação com os do grupo controle negativo (CN) a partir do primeiro dia de indução, assim como nos dias subsequentes (Figura 9A). A partir do segundo dia de indução, verificou-se que o grupo tratado com LGG (LGG MUC) apresentou diferença significativa na diminuição da perda de peso com relação ao controle mucosite (MUC;  $p < 0,05$ ). O grupo tratado com L156.4 (L156.4 MUC) não apresentou diferença estatística em relação ao controle com mucosite (MUC) (Figura 9 A).

A variação percentual do peso dos animais a partir da indução da mucosite (11º dia de experimentação) até o 14º dia também foi avaliada. A Figura 9B mostra que o grupo controle com mucosite (MUC) apresentou uma redução de mais de 10% do peso corporal em relação ao grupo controle negativo (CN;  $p < 0,05$ ) (Figura 9B). Fica igualmente claro que os tratamentos com *L. rhamnosus* L156.4 e LGG (L156.4 MUC; LGG MUC) não conseguiram atenuar a perda de peso corporal dos animais quando comparados ao grupo controle com mucosite (MUC;  $p > 0,05$ ). (Figura 9A e B).

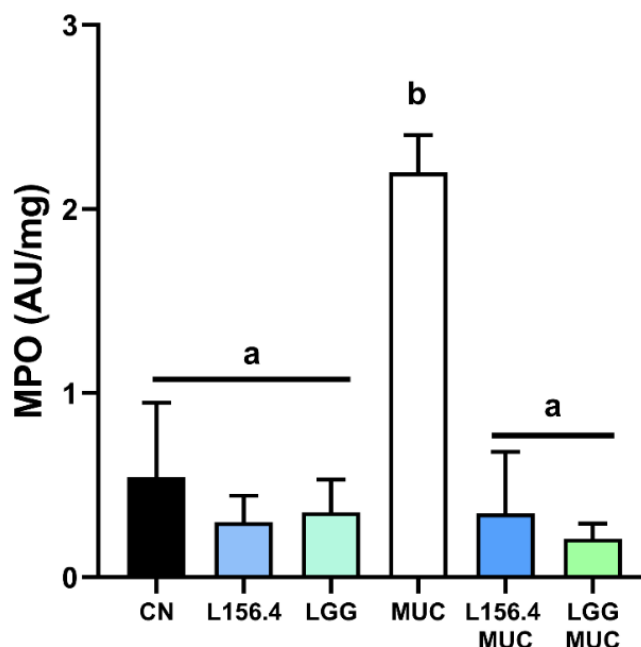




**Figura 9: Efeito de *L. rhamnosus* L156.4 no peso corporal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU.** (A) variação do peso corporal dos animais ao longo do experimento e (B) variação percentual do peso corporal dos animais após a indução da mucosite. Os animais receberam 5-FU (300mg/Kg) (MUC; L156.4 MUC; LGG MUC) ou salina 0,9% (CN; L156.4; LGG) por via intraperitoneal e foram tratados via gavagem com PBS ou respectivas bactérias ( $10^9$  UFC) (n=7 animais por grupo). Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística por One-way ANOVA seguido pós-teste de Tukey ( $p < 0,005$ ). CN = controle negativo; L156.4 = controle bactéria; LGG = controle bactéria; MUC = mucosite; L156.4 MUC = L156.4 mucosite; LGG MUC = GG mucosite.

### 5.3 *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* L156.4 REDUZIU O INFILTRADO INFLAMATÓRIO EM ANIMAIS COM MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU

Para verificar se o tratamento com *L. rhamnosus* L156.4 poderia reduzir o infiltrado inflamatório por neutrófilos na mucosa intestinal, a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi mensurada em lisado celular do íleo de animais dos diferentes grupos experimentais. O tratamento com 5-FU (MUC) aumentou significativamente a atividade da MPO no íleo de camundongos quando comparado ao controle negativo (CN;  $p < 0,05$ ), como mostrado na figura 10. No entanto, ambos os tratamentos com L156.4 e LGG (L156.4 MUC; LGG MUC) foram capazes de reduzir significativamente a atividade desta enzima ( $p < 0,05$ ) indicando, portanto, uma redução expressiva do infiltrado inflamatório da mucosa intestinal.

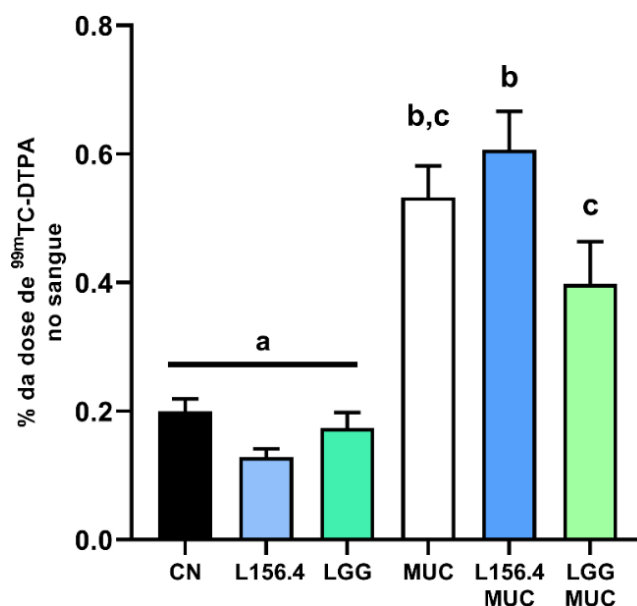


**Figura 10: Infiltrado inflamatório no íleo de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com *L. rhamnosus* L156.4.** A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi mensurada no íleo de animais inflamados com 5-FU (300mg/Kg) (MUC; L156.4 MUC; LGG MUC) ou salina 0,9% (CN; L156.4; LGG) por via intraperitoneal e que foram tratados via gavagem com PBS ou respectivas bactérias ( $10^9$  UFC) ( $n=7$  animais por grupo). Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística por One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p<0,05$ ). CN = controle negativo; L156.4 = controle bactéria; LGG = controle bactéria; MUC = mucosite; L156.4 MUC = L156.4 mucosite; LGG MUC = GG mucosite.

#### 5.4 TRATAMENTO COM *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* L156.4 NÃO ATENUA O AUMENTO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL NO MODELO MURINO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5- FU

A integridade da barreira epitelial foi mensurada por meio da permeabilidade intestinal, medindo-se a difusão de radioatividade do lúmen intestinal através do epitélio para a corrente sanguínea após a administração oral de  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA. A Figura 11 mostra que o tratamento com 5-FU (MUC) aumentou a permeabilidade intestinal dos animais, quando comparado ao controle negativo (CN;  $p<0,0001$ ).

Os grupos tratados com as cepas bacterianas (L156.4; LGG) sem indução da mucosite, não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle negativo (CN;  $p>0,05$ ). O tratamento com *L. rhamnosus* L156.4 após a indução da mucosite (L156.4 MUC) não foi capaz de reduzir significativamente a permeabilidade intestinal dos animais que receberam o quimioterápico (MUC;  $p>0,05$ ). Já o grupo *L. rhamnosus* GG (LGG MUC) foi capaz de diminuir a permeabilidade intestinal quando comparado ao controle (MUC;  $p<0,5$ ).



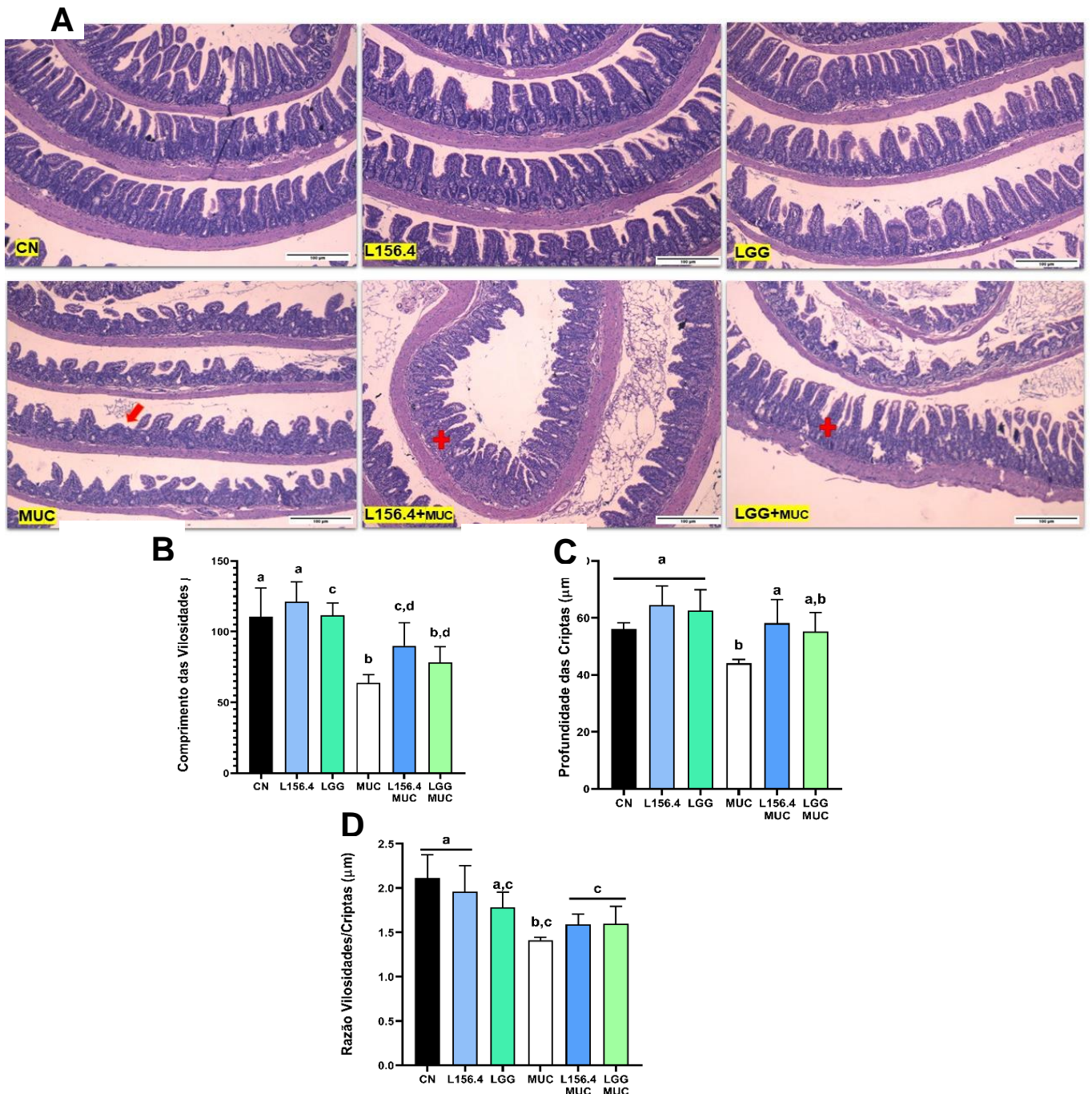
**Figura 11: Permeabilidade intestinal de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU tratados com *L. rhamnosus* L156.4.** A permeabilidade foi medida por meio do ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) marcado com o radioisótopo tecnécio (<sup>99m</sup>Tc). Os animais receberam 5-FU (300mg/Kg) (MUC; L156.4 MUC; LGG MUC) ou salina 0,9% (CN; L156.4; LGG) por via intraperitoneal foram tratados via gavagem com PBS ou respectivas bactérias (10<sup>9</sup> UFC) ( $n=7$  animais por grupo). As letras (a, b,c) indicam diferença estatística por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Turkey ( $p<0,05$ ). CN = controle negativo; L156.4 = controle bactéria; LGG = controle bactéria; MUC = mucosite; L156.4 MUC = L156.4 mucosite; LGG MUC = GG mucosite.

### 5.5 *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* L156.4 MELHORA OS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS NO ÍLEO DE CAMUNDONGOS COM MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FU

O tratamento com 5-FU (MUC) promoveu alterações na arquitetura da mucosa intestinal, quando comparado ao controle negativo (CN). Essas alterações são caracterizadas pelo encurtamento das vilosidades, intenso infiltrado de células polimorfonucleares nas vilosidades, na lâmina própria e na submucosa, ulceração, edema, vacuolização e necrose das criptas (Figura 12A). Os tratamentos com as cepas de *L. rhamnosus* (L156.4 MUC; LGG MUC) restauraram a arquitetura da mucosa intestinal de forma semelhante ao controle negativo (CN) (Figura 12A).

Com relação aos achados da análise morfométricas, os dados demonstraram que o 5-FU (MUC) foi capaz de induzir drásticas lesões no íleo dos animais, alterando a arquitetura intestinal, quando comparado ao controle negativo (CN) ( $p<0,0001$ ), incluindo diminuição na razão vilosidades/criptas ( $p<0,001$ ) (Figura 12 B, C e D). Entretanto, o tratamento com *L. rhamnosus* L156.4 (L156.4 MUC) foi capaz de reduzir essas alterações causadas pelo quimioterápico ( $p<0,05$ ), conforme observado em relação do eixo vilosidades/criptas. O tratamento com LGG (LGG MUC) também reduziu alterações causadas pelo uso do 5-FU

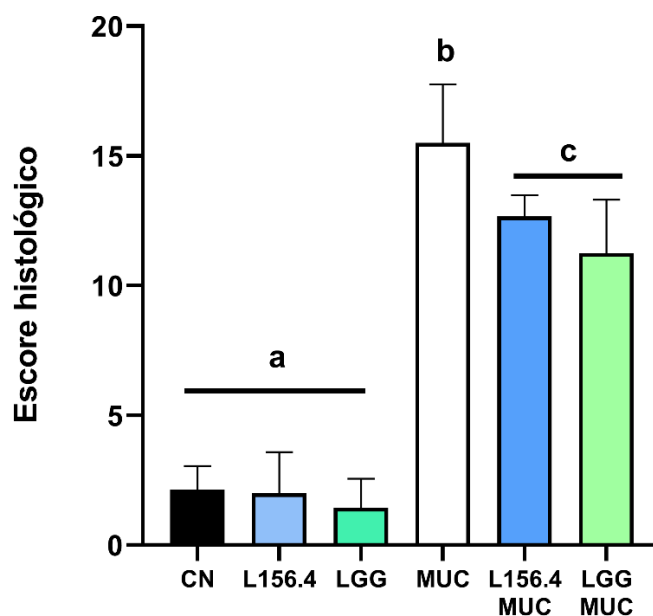
(MUC;  $p < 0,05$ ). Ao comparar o grupo de controle negativo com o grupo tratado com *L. rhamnosus* L156.4 (L156.4 MUC), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no comprimento das vilosidades e na profundidade das criptas. Isso indica que o tratamento com *L. rhamnosus* L156.4 não afetou esses parâmetros estruturais da mucosa intestinal ( $p > 0,05$ ) (Figura 12).



**Figura 12: Análises histológicas e morfométricas dos íleos dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU tratados com *L. rhamnosus* L156.4. (A) Achados histológicos, (B) Comprimento das vilosidades, (C) Profundidade das criptas e (D) Razão do comprimento das**

vilosidades e profundidade das criptas das secções dos íleos dos animais dos grupos controles e experimentais. As letras (a, b, c) indicam diferença estatística por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Turkey ( $p < 0,05$ ). CN = controle negativo; L156.4 = controle bactéria; LGG = controle bactéria; MUC = mucosite; L156.4 MUC = L156.4 mucosite; LGG MUC = GG mucosite.

Os resultados de histopatologia podem ser visualizados através dos escores histopatológicos mostrado conforme mostra na Figura 13. É possível visualizar que os grupos que receberam 5-FU (MUC; L156.4 MUC; LGG MUC) diferiram significativamente do grupo controle (CN;  $p < 0,05$ ). Os grupos tratados somente com *L. rhamnosus* (L156.4 MUC; LGG MUC) apresentaram diferença significativa em relação ao controle mucosite (MUC;  $p < 0,05$ ), demonstrando que a administração dessas linhagens foram capazes de atenuar parcialmente os danos histopatológicos (Figura 13).



**Figura 13: Escores histopatológicos dos íleos dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU tratados com *L. rhamnosus* L156.4.** Animais que receberam 5-FU (300mg/Kg) (MUC; L156.4 MUC; LGG MUC) ou salina 0,9% (CN; L156.4; LGG) por via intraperitoneal e que foram tratados via gavagem com PBS ou respectivas bactérias ( $10^9$  UFC) ( $n=7$  animais por grupo). As letras (a, b, c) indicam diferença estatística por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Turkey ( $p < 0,05$ ). CN = controle negativo; L156.4 = controle bactéria; LGG = controle bactéria; MUC = mucosite; L156.4 MUC = L156.4 mucosite; LGG MUC = GG mucosite.

## 6 DISCUSSÃO

Existem diversas linhagens de lactobacillus com características funcionais benéficas ao hospedeiro, sendo consideradas probióticos (Sun et al. 2015; Plaza-Diaz et al. 2019b). Os probióticos desempenham um papel significativo na prática clínica, sendo frequentemente utilizados como adjuvantes em tratamentos terapêuticos. Além disso, sua capacidade de modular a microbiota intestinal e fortalecer o sistema imunológico tem sido explorada em diversos modelos experimentais como em desordens inflamatórias relacionadas ao TGI, doença de Crohn e mucosite intestinal (Fedorak et al. 2015; De Jesus et al. 2019; Bjarnason, Sission, and Hayee 2019b).

A mucosite intestinal é um efeito citotóxico comumente observado no TGI de pacientes submetidos a tratamentos com antineoplásicos, como o 5-FU (Lee, Ryan, and Doherty 2014; Phillips et al. 2018). Estudos têm explorado diferentes abordagens para tratar esse efeito indesejado, dentre elas destacam-se o uso de probióticos. Em um estudo pré-clínico, por exemplo, conduzido por Smith et al. (2008), a cepa *Lactobacillus fermentum* BR11 demonstrou ser eficaz na redução da inflamação intestinal em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Xia et al. (2021) utilizou uma mistura probiótica contendo *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* para investigar os efeitos protetores e o mecanismo do tratamento para mucosite oral. Os pacientes que receberam a mistura probiótica tiveram uma diminuição no grau e também na incidência da mucosite oral. Em um modelo animal, esta mistura diminuiu a resposta inflamatória e a permeabilidade intestinal (Smith et al. 2008; Xia et al. 2021).

Em um trabalho realizado por Oliveira et al. (2017), foi identificada uma bacteriocina em uma cepa de *L. rhamnosus* L156.4 isolada de fezes de camundongos NIH e realizou-se o sequenciamento, montagem e anotação do genoma. Este é o primeiro relato de uma bacteriocina putativa produzida por uma cepa de *L. rhamnosus* obtida de fezes de camundongos. Análises revelaram que essa bacteriocina apresenta 100% de semelhança com ORFs de *L. rhamnosus* HN001, uma cepa probiótica. Além disso, em outro estudo utilizando essa mesma cepa, foi observado o potencial de inibição do crescimento de fungos filamentosos e cepas de *E. coli* êntero patogênicas. Esses resultados mostram que essa linhagem tem um ótimo potencial como agente microbicida (de Oliveira et al., 2019). Mediante a esses achados se buscou então investigar o papel anti-inflamatório desta linhagem para avaliação como uma cepa potencialmente probiótica.

No presente estudo, observou-se que a administração de 300 mg/kg de 5-FU em camundongos BALB/c resultou em sintomas sistêmicos no organismo dos animais, conforme pode ser observado nas figuras 8 a 13. Esses sintomas incluíram perda de peso corporal, diminuição do comprimento intestinal, presença de infiltrado inflamatório, aumento da permeabilidade intestinal e drásticas alterações na estrutura da mucosa intestinal, como redução das vilosidades, aumento da profundidade e destruição das células das criptas. Tais achados são consistentes com estudos prévios que utilizaram o mesmo fármaco (Duncan and Grant 2003; Ferreira et al. 2012; Yeung et al. 2015; Li et al. 2017; Hamouda et al. 2017), demonstrando a severidade da mucosite intestinal induzida pelo uso do antineoplásico 5-FU.

A mucosite induzida por quimioterapia pode levar a dificuldades na ingestão oral e absorção de alimentos, o que resulta em comprometimento alimentar em pacientes durante o tratamento (Eduardo et al. 2018). Esse quadro frequentemente causa perda de massa corporal (Arends et al. 2018). Nesse contexto, realizou-se uma avaliação do efeito da administração de *Lactobacillus rhamnosus* L156.4 no comprimento intestinal e na perda de peso de animais com mucosite (Figura 8 e Figura 9). Com base nesses achados sugere-se que essa cepa bacteriana não foi capaz de atenuar a intensa redução no comprimento intestinal, que resulta em uma diminuição na superfície de absorção, e, conseqüentemente, na perda de massa corporal.

Por outro lado, o estudo conduzido por Hu et al. (2020) utilizando leite fermentado pela linhagem *L. rhamnosus* FLRH93 demonstrou que o percentual de perda de peso foi menor no grupo tratado em comparação com o grupo MUC, indicando que o tratamento com o leite fermentado pela FLRH93 pode prevenir a perda de peso corporal induzida pela quimioterapia (Hu et al. 2020). Esses resultados reforçam a ideia de que as propriedades probióticas são dependentes da cepa específica utilizada, assim como da forma e quantidade em que são administradas.

É importante destacar que foi utilizado *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) neste estudo como controle, uma cepa que já teve seus efeitos probióticos confirmados e que atualmente é comercializada. Em relação à perda de peso corporal, essa cepa demonstrou não ser capaz de reduzi-la (Figura 8), porém foi eficaz de atenuar a perda do comprimento intestinal (Figura 9).

Os achados do estudo conduzido por Yue et al. (2022) sobre os efeitos da cepa *L. rhamnosus* GG na produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) não estão alinhados com os resultados obtidos neste experimento. Neste estudo, o uso dessa cepa resultou em uma

diminuição significativa na perda de peso corporal em camundongos com mucosite induzida por 5-FU, quando comparado ao grupo controle MUC. Esses resultados sugerem um possível papel benéfico da *L. rhamnosus* GG na redução da perda de peso. É importante ressaltar que a divergência nos resultados pode ser atribuída a diferentes doses administradas e à variação no período de administração da bactéria. Esses fatores podem influenciar os efeitos terapêuticos da cepa, destacando a importância da dose correta e da duração adequada do tratamento. Portanto, é crucial considerar esses aspectos ao avaliar a eficácia da *L. rhamnosus* GG em diferentes contextos clínicos.

Neste estudo, observou-se que o tratamento utilizado também teve a capacidade de reduzir o infiltrado inflamatório (Figura 10), como evidenciado pela diminuição da atividade da enzima mieloperoxidase, uma medida indireta do infiltrado inflamatório pela atividade dos neutrófilos no tecido. Esses achados estão em concordância com estudos anteriores que utilizaram diferentes cepas probióticas. Por exemplo, em um estudo conduzido por Kato et al. (2017) a utilização do probiótico *Bifidobacterium bifidum* G9-1 demonstrou redução do infiltrado inflamatório. Além disso, no estudo realizado por Tang et al. (2017), uma mistura probiótica contendo *B. breve* DM8310, *L. acidophilus* DM8302, *L. casei* DM8121 e *S. thermophilus* DM8309 também foi capaz de diminuir a infiltração de neutrófilos no íleo de animais afetados pela mucosite intestinal induzida pelo 5-FU. Essas evidências destacam o potencial dos probióticos na modulação da resposta inflamatória e na redução do infiltrado inflamatório associado à mucosite intestinal.

A análise da permeabilidade intestinal foi conduzida, e o grupo MUC, que recebeu o tratamento com 5-FU, apresentou um aumento significativo na permeabilidade intestinal em comparação com os outros grupos (Figura 11). Esses resultados estão em concordância com estudos anteriores que também demonstraram um aumento na permeabilidade intestinal 72 horas após a administração de 5-FU (de Barros et al. 2018; Trindade et al. 2018). Os resultados mostram *L. rhamnosus* L156.4 não foi capaz de prevenir o aumento da permeabilidade intestinal induzida por 5-FU. Em contraste, *L. rhamnosus* GG atenuou a permeabilidade intestinal. Esses resultados estão em consonância com estudos anteriores realizados por (Khailova et al. 2017), indicando que *L. rhamnosus* GG pode melhorar a função da barreira intestinal e reduzir a translocação bacteriana. É possível que *L. rhamnosus* L156.4 possa não ser capaz de estimular a expressão de proteínas de junções firmes (*tight junctions*) no epitélio intestinal, no entanto, são necessárias análises adicionais para confirmar esses resultados.

A perda da arquitetura intestinal, o estabelecimento de um intenso processo inflamatório e a destruição da mucosa são alguns dos principais efeitos associados à mucosite intestinal (Sonis 2004; Soares et al. 2013; Duncan and Grant 2003; Lee, Ryan, and Doherty 2014). Esses resultados confirmam a vulnerabilidade do trato gastrointestinal à terapia oncológica. No presente estudo, os animais inflamados com 300mg/kg de 5-FU apresentaram diversos danos à mucosa do íleo, incluindo redução das vilosidades, aumento da profundidade das criptas (Figuras 12 e 13), mostrando concordância com a patobiologia da mucosite proposta por Sonis (2004). Os resultados deste estudo revelaram que o tratamento com *L. rhamnosus* L156.4 foi capaz de diminuir o escore histopatológico e atenuar os danos à mucosa intestinal ocasionados pelo uso do quimioterápico 5-FU, prevenindo a perda do comprimento das vilosidades e a razão vilosidade/criptas, além de aumentar a profundidade das criptas (Figuras 12 e 13).

Neste contexto os resultados obtidos com o tratamento utilizando *L. rhamnosus* GG neste estudo mostraram que essa cepa foi capaz de atenuar o comprimento das vilosidades, a relação vilosidades/criptas e o escore histológico. Além disso, também foi capaz de reverter o infiltrado inflamatório. No entanto, não foi observado um aumento na profundidade das criptas. Em um estudo conduzido por Hu et al. (2020) utilizando leite fermentado pela linhagem de *L. rhamnosus* FLRH93 em um modelo murino de mucosite intestinal, essa cepa demonstrou a capacidade de diminuir os danos intestinais, resultando em um comprimento das vilosidades e profundidade das criptas semelhantes ao grupo de controle não inflamado. Em um ensaio clínico realizado por Osterlund et al. (2007), a utilização de *L. rhamnosus* GG para o controle da diarreia em pacientes submetidos a injeções mensais de 5-FU foi bem tolerada e demonstrou ser capaz de reduzir a frequência de diarreia e o desconforto abdominal. Essas evidências reforçam o potencial terapêutico das cepas de *L. rhamnosus* na melhoria dos sintomas e na proteção intestinal durante a mucosite induzida pelo 5-FU.

De acordo com a patobiologia da mucosite proposta por Sonis (2004), a alteração da integridade da mucosa intestinal compromete não só a capacidade absorptiva do intestino, mas também altera os padrões de permeabilidade. Isso resulta em um intestino permissível à passagem de agentes exógenos, como bactérias patogênicas e antígenos nocivos, que podem comprometer a homeostase do organismo (Cinausero et al. 2017). Na investigação, utilizou-se a macromolécula DTPA marcada com tecnécio-99m, que atravessa em quantidades mínimas a barreira intestinal em condições fisiológicas (Generoso et al. 2011). A ocorrência de quebras no epitélio viabiliza a passagem do fármaco radiomarcado, que exibe propriedades

hidrofílicas. Isso permite que o radiotraçador atravesse o espaço paracelular e transponha o epitélio. Como resultado, torna-se possível identificá-lo na corrente sanguínea. (Andrade et al. 2015).

Diferentes probióticos têm demonstrado efeitos variados na mucosite intestinal e outras condições patológicas do intestino. É essencial conduzir investigações sistemáticas para compreender melhor a eficácia de probióticos no alívio dos sintomas da mucosite. A caracterização de novas cepas também é fundamental para explorar suas propriedades terapêuticas em diferentes modelos de inflamação.

Uma estratégia promissora é combinar diferentes probióticos para obter um efeito sinérgico positivo (Jhun et al. 2021) , potencializando seus benefícios individuais e melhorando o tratamento da mucosite intestinal. Neste sentido, misturas probióticas têm sido utilizadas para avaliar o efeito sinérgico de duas cepas com propriedades probióticas. No trabalho de Quaresma et al. (2020), foram avaliadas duas misturas probióticas: uma contendo *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp (PM-1) e outra contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis* (PM-2). Ambas as misturas foram capazes de reduzir os escores histopatológicos em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU, promovendo a recuperação da lesão epitelial na mucosa intestinal, evidenciando o potencial terapêutico desses probióticos contra a mucosite intestinal. Essas descobertas destacam a importância do uso de probióticos, tanto isoladamente como em combinações, como agentes terapêuticos promissores para auxiliar no tratamento da mucosite intestinal bem como, melhorar a saúde intestinal durante o tratamento com antineoplásicos. É crucial para avançar na compreensão e no tratamento dessa condição, proporcionando abordagens terapêuticas mais eficazes.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que a administração oral da cepa *L. rhamnosus* L156.4 demonstrou efeitos benéficos parciais na atenuação de parâmetros relacionados à mucosite intestinal experimental induzida pelo antineoplásico 5-FU. A cepa recuperou a arquitetura da barreira intestinal e reduziu o infiltrado inflamatório no tecido após a indução da mucosite com o 5-FU. Essas descobertas sugerem que a cepa em questão pode ter um potencial terapêutico no tratamento da mucosite intestinal. No entanto, para compreender completamente os mecanismos subjacentes a esses efeitos e para caracterizar adequadamente a linhagem, são necessárias mais investigações. Portanto, estudos adicionais são necessários para explorar em detalhes os possíveis mecanismos envolvidos e avaliar o potencial clínico dessa cepa probiótica como uma estratégia terapêutica para a mucosite intestinal induzida por 5-FU usada individualmente ou em combinação com outras cepas

## 8 PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito de *L. rhamnosus* L156.4 sobre o perfil de citocinas pro inflamatórias (TNF; IL-1  $\beta$ , IL-4 e IL-6), anti-inflamatórias (IL-10, TGF- $\beta$ ) através da técnica de RT-qPCR.
- Avaliar o efeito de *L. rhamnosus* L156.4 sobre a expressão das proteínas *Tight junctions*, através de RT-qPCR.
- Avaliar o efeito de *L. rhamnosus* L156.4 sobre a alteração da composição da microbiota promovida por 5-FU, através do sequenciamento do gene rRNA16S nas amostras fecais.
- Avaliar o efeito da combinação de *L. rhamnosus* L156.4 com outras cepas bacterianas

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal, Nikhil, Amy M.Ehrenworth Breedon, Christina M. Davis, In Young Hwang, and Matthew Wook Chang. 2020. “Engineering Probiotics for Therapeutic Applications: Recent Examples and Translational Outlook.” *Current Opinion in Biotechnology* 65 (October): 171–79. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2020.02.016>.
- Andrade, Maria Emília Rabelo, Raquel Silva Araújo, Patrícia Aparecida Vieira de Barros, Anne Danieli Nascimento Soares, Fernanda Alves Abrantes, Simone de Vasconcelos Generoso, Simone Odília Antunes Fernandes, and Valbert Nascimento Cardoso. 2015. “The Role of Immunomodulators on Intestinal Barrier Homeostasis in Experimental Models.” *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)* 34 (6): 1080–87. <https://doi.org/10.1016/J.CLNU.2015.01.012>.
- Andrade, Maria Emília Rabelo, Luisa Martins Trindade, Paola Caroline Lacerda Leocádio, Jacqueline Isaura Alvarez Leite, Diego Carlos dos Reis, Geovanni Dantas Cassali, Tales Fernando da Silva, et al. 2023. “Association of Fructo-Oligosaccharides and Arginine Improves Severity of Mucositis and Modulate the Intestinal Microbiota.” *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 15 (2). <https://doi.org/10.1007/S12602-022-10032-8>.
- Arends, Jann. 2018. “How to Feed Patients with Gastrointestinal Mucositis.” *Current Opinion in Supportive and Palliative Care* 12 (2): 168–73. <https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000345>.
- Atkins, J. N., H. B. Muss, D. Case, J. Brockschmidt, F. M. Schnell, M. O’Rourke, T. H. Grote, J. H. West, S. Anthony, and V. Stanley. 1991. “High-Dose 24-Hour Infusion of 5-Fluorouracil in Metastatic Prostate Cancer. A Phase II Trial of the Piedmont Oncology Association.” *American Journal of Clinical Oncology* 14 (6): 526–29. <https://doi.org/10.1097/00000421-199112000-00012>.
- Bader, Max. 1976. “Rubella Immunization.” *JAMA* 235 (3): 248–248. <https://doi.org/10.1001/JAMA.1976.03260290010002>.
- Barros, Patrícia Aparecida Vieira de, Maria Emília Rabelo Andrade, Simone de Vasconcelos Generoso, Sued Eustáquio Mendes Miranda, Diego Carlos dos Reis, Paola Caroline Lacerda Leocádio, Éricka Lorena de Sales e Souza, et al. 2018. “Conjugated Linoleic Acid Prevents Damage Caused by Intestinal Mucositis Induced by 5-Fluorouracil in an Experimental Model.” *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 103 (July): 1567–76. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.04.133>.
- Batista, Viviane Lima, Tales Fernando da Silva, Luís Cláudio Lima de Jesus, Nina Dias Coelho-

- Rocha, Fernanda Alvarenga Lima Barroso, Laisa Macedo Tavares, Vasco Azevedo, Pamela Mancha-Agresti, and Mariana Martins Drumond. 2020. "Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis." *Frontiers in Microbiology* 11 (September): 2246. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.544490/BIBTEX>.
- Bensadoun, Rene Jean, Mark M. Schubert, Rajesh V. Lalla, and Dorothy Keefe. 2006. "Amifostine in the Management of Radiation-Induced and Chemo-Induced Mucositis." *Supportive Care in Cancer : Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 14 (6): 566–72. <https://doi.org/10.1007/S00520-006-0047-4>.
- Berni Canani, Roberto, Margherita Di Costanzo, Giorgio Bedogni, Antonio Amoroso, Linda Cosenza, Carmen Di Scala, Viviana Granata, and Rita Nocerino. 2017. "Extensively Hydrolyzed Casein Formula Containing Lactobacillus Rhamnosus GG Reduces the Occurrence of Other Allergic Manifestations in Children with Cow's Milk Allergy: 3-Year Randomized Controlled Trial." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139 (6): 1906-1913.e4. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2016.10.050>.
- Bjarnason, Ingvar, Guy Sission, and Bu Hussaine Hayee. 2019a. "A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of a Multi-Strain Probiotic in Patients with Asymptomatic Ulcerative Colitis and Crohn's Disease." *Inflammopharmacology* 27 (3): 465–73. <https://doi.org/10.1007/S10787-019-00595-4/FIGURES/1>.
- Buccigrossi, Vittoria, Marco Poeta, Valentina Cioffi, Sara Terranova, Francesco Nunziata, Andrea Lo Vecchio, and Alfredo Guarino. 2022. "Lacticaseibacillus Rhamnosus GG Counteracts Rotavirus-Induced Ion Secretion and Enterocyte Damage by Inhibiting Oxidative Stress and Apoptosis Through Specific Effects of Living and Postbiotic Preparations." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (March): 854989. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.854989>.
- Camilleri, M., K. Madsen, R. Spiller, B. G. Van Meerveld, and G. N. Verne. 2012. "Intestinal Barrier Function in Health and Gastrointestinal Disease." *Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 24 (6): 503–12. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2982.2012.01921.X>.
- Cano-Garrido, Olivia, Joaquin Seras-Franzoso, and Elena Garcia-Fruitós. 2015. "Lactic Acid Bacteria: Reviewing the Potential of a Promising Delivery Live Vector for Biomedical Purposes." *Microbial Cell Factories* 2015 14:1 14 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12934-015-0313-6>.
- Carvalho, Rodrigo D., Natalia Breyner, Zelia Menezes-Garcia, Nubia M. Rodrigues, Luisa Lemos,

- Tatiane U. Maioli, Danielle da Gloria Souza, et al. 2017. "Secretion of Biologically Active Pancreatitis-Associated Protein I (PAP) by Genetically Modified Dairy Lactococcus Lactis NZ9000 in the Prevention of Intestinal Mucositis." *Microbial Cell Factories* 16 (1): 27. <https://doi.org/10.1186/S12934-017-0624-X>.
- Cereda, Emanuele, Marilisa Caraccia, and Riccardo Caccialanza. 2018. "Probiotics and Mucositis." *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 21 (5): 399–404. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000487>.
- Chang, Chung Ta, Tin Yun Ho, Ho Lin, Ji An Liang, Hui Chi Huang, Chia Cheng Li, Hsin Yi Lo, Shih Lu Wu, Yi Fang Huang, and Chien Yun Hsiang. 2012. "5-Fluorouracil Induced Intestinal Mucositis via Nuclear Factor-KB Activation by Transcriptomic Analysis and In Vivo Bioluminescence Imaging." *PLOS ONE* 7 (3): e31808. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0031808>.
- Chukwunyere, Ugochukwu, Merve Mercan, Ahmet Ozer Sehirli, and Nurettin Abacioglu. 2022. "Possible Cytoprotective Mechanisms of Oxytocin against 5-Fluorouracil-Induced Gastrointestinal Mucositis." *Molecular Biology Reports* 49 (5): 4055–59. <https://doi.org/10.1007/S11033-022-07384-3/FIGURES/1>.
- Cinausero, Marika, Giuseppe Aprile, Paola Ermacora, Debora Basile, Maria G. Vitale, Valentina Fanotto, Giuseppe Parisi, Lorenzo Calvetti, and Stephen T. Sonis. 2017. "New Frontiers in the Pathobiology and Treatment of Cancer Regimen-Related Mucosal Injury." *Frontiers in Pharmacology* 8 (JUN). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2017.00354>.
- Dahlgren, David, Markus Sjöblom, Per M. Hellström, and Hans Lennernäs. 2021. "Chemotherapeutics-Induced Intestinal Mucositis: Pathophysiology and Potential Treatment Strategies." *Frontiers in Pharmacology* 12 (May): 681417. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.681417/BIBTEX>.
- Dieterich, Walburga, Monic Schink, and Yurdagül Zopf. 2018. "Microbiota in the Gastrointestinal Tract." *Medical Sciences* 6 (4). <https://doi.org/10.3390/MEDSCI6040116>.
- Duncan, M., and G. Grant. 2003. "Oral and Intestinal Mucositis - Causes and Possible Treatments." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 18 (9): 853–74. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2036.2003.01784.X>.
- Eduardo, Fernanda de Paula, Leticia Mello Bezinelli, Marcella Ferreira Gobbi, Andrea Z. Pereira, Cristina Vogel, Nelson Hamerschlak, and Luciana Corrêa. 2018. "Impact of Oral and Gastrointestinal Mucositis on Body Weight Alterations during Hematopoietic Stem Cell Transplantation." *Nutrition and Cancer* 70 (2): 241–48.

<https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1412476>.

- Fang, Shiuh Bin, Hsin Yu Shih, Chih Hung Huang, Li Ting Li, Chia Chun Chen, and Hsu Wei Fang. 2014. "Live and Heat-Killed *Lactobacillus Rhamnosus* GG Upregulate Gene Expression of pro-Inflammatory Cytokines in 5-Fluorouracil-Pretreated Caco-2 Cells." *Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 22 (6): 1647–54. <https://doi.org/10.1007/S00520-014-2137-Z>.
- Fedorak, Richard N., Brian G. Feagan, Naomi Hotte, Des Leddin, Levinus A. Dieleman, Denis M. Petrunia, Robert Enns, et al. 2015. "The Probiotic VSL#3 Has Anti-Inflammatory Effects and Could Reduce Endoscopic Recurrence After Surgery for Crohn's Disease." *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 13 (5): 928-935.e2. <https://doi.org/10.1016/J.CGH.2014.10.031>.
- Ferraris, R. P., and R. R. Vinnakota. 1995. "The Time Course of Adaptation of Intestinal Nutrient Uptake in Mice Is Independent of Age." *The Journal of Nutrition* 125 (8): 2172–82. <https://doi.org/10.1093/JN/125.8.2172>.
- Ferreira, Talita Mayra, Alda Jusceline Leonel, Marco Antônio Melo, Rosana R.G. Santos, Denise Carmona Cara, Valbert N. Cardoso, Maria I.T.D. Correia, and Jacqueline I. Alvarez-Leite. 2012. "Oral Supplementation of Butyrate Reduces Mucositis and Intestinal Permeability Associated with 5-Fluorouracil Administration." *Lipids* 47 (7): 669–78. <https://doi.org/10.1007/S11745-012-3680-3>.
- Folwarski, M., M. Dobosz, S. Małgorzewicz, K. Skonieczna-Zydecka, and K. Kazmierczak-Siedlecka. 2021. "Effects of *Lactobacillus Rhamnosus* Gg on Early Postoperative Outcome after Pylorus-Preserving Pancreatoduodenectomy: A Randomized Trial." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 25 (1): 397–405. [https://doi.org/10.26355/EURREV\\_202101\\_24407](https://doi.org/10.26355/EURREV_202101_24407).
- Gendler, Sandra J., and Andrew P. Spicer. 1995. "Epithelial Mucin Genes." *Annual Review of Physiology* 57: 607–34. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PH.57.030195.003135>.
- Generoso, Simone V., Mirelle L. Viana, Rosana G. Santos, Rosa M.E. Arantes, Flaviano S. Martins, Jacques R. Nicoli, José A.N. MacHado, Maria Isabel T.D. Correia, and Valbert N. Cardoso. 2011. "Protection against Increased Intestinal Permeability and Bacterial Translocation Induced by Intestinal Obstruction in Mice Treated with Viable and Heat-Killed *Saccharomyces Boulardii*." *European Journal of Nutrition* 50 (4): 261–69. <https://doi.org/10.1007/S00394-010-0134-7>.
- Gomes-Santos, Ana Cristina, Rafael Pires de Oliveira, Thaís Garcias Moreira, Archimedes

- Barbosa Castro-Junior, Bernardo Coelho Horta, Luísa Lemos, Leonardo Augusto de Almeida, et al. 2017. “Hsp65-Producing *Lactococcus Lactis* Prevents Inflammatory Intestinal Disease in Mice by IL-10- and TLR2-Dependent Pathways.” *Frontiers in Immunology* 8 (JAN). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.00030>.
- Górska, Agata, Dawid Przystupski, Magdalena J. Niemczura, and Julita Kulbacka. 2019. “Probiotic Bacteria: A Promising Tool in Cancer Prevention and Therapy.” *Current Microbiology* 76 (8): 939–49. <https://doi.org/10.1007/S00284-019-01679-8>.
- Hamouda, Nahla, Tatsushi Sano, Yosuke Oikawa, Toru Ozaki, Masaki Shimakawa, Kenjiro Matsumoto, Kikuko Amagase, Kazuhide Higuchi, and Shinichi Kato. 2017. “Apoptosis, Dysbiosis and Expression of Inflammatory Cytokines Are Sequential Events in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Mice.” *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 121 (3): 159–68. <https://doi.org/10.1111/BCPT.12793>.
- Hardy, Holly, Jennifer Harris, Eleanor Lyon, Jane Beal, and Andrew D. Foey. 2013. “Probiotics, Prebiotics and Immunomodulation of Gut Mucosal Defences: Homeostasis and Immunopathology.” *Nutrients* 5 (6): 1869. <https://doi.org/10.3390/NU5061869>.
- Heidelberger, Charles, N. K. Chaudhuri, Peter Danneberg, Dorothy Mooren, Lois Griesbach, Robert Duschinsky, R. J. Schnitzer, E. Plevin, and J. Scheiner. 1957. “Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds.” *Nature* 1957 179:4561 179 (4561): 663–66. <https://doi.org/10.1038/179663a0>.
- Hill, Colin, Francisco Guarner, Gregor Reid, Glenn R. Gibson, Daniel J. Merenstein, Bruno Pot, Lorenzo Morelli, et al. 2014. “The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic.” *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2014 11:8 11 (8): 506–14. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.
- Holmgren, Jan, and Cecil Czerkinsky. 2005. “Mucosal Immunity and Vaccines.” *Nature Medicine* 11 (4 Suppl): S45. <https://doi.org/10.1038/NM1213>.
- Howarth, Gordon S., Geoffrey L. Francis, Johanna C. Cool, Xiaoning Xu, Roger W. Byard, and Leanna C. Read. 1996. “Milk Growth Factors Enriched from Cheese Whey Ameliorate Intestinal Damage by Methotrexate When Administered Orally to Rats.” *The Journal of Nutrition* 126 (10): 2519–30. <https://doi.org/10.1093/JN/126.10.2519>.
- Hsieh, Ming Chia, Wan Hua Tsai, Yu Pang Jheng, Shih Li Su, Shu Yi Wang, Chi Chen Lin, Yi Hsing Chen, and Wen Wei Chang. 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.” *Scientific Reports* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-35014-1>.
- Hu, Miaomiao, Xiaoli Wu, Meng Luo, Hua Wei, Di Xu, and Feng Xu. 2020. “Lactobacillus Rhamnosus FLRH93 Protects against Intestinal Damage in Mice Induced by 5-Fluorouracil.” *Journal of Dairy Science* 103 (6): 5003–18. <https://doi.org/10.3168/JDS.2019-17836>.
- Jesus, Luís Cláudio Lima De, Mariana Martins Drumond, André de Carvalho, Spencer S. Santos, Flaviano S. Martins, Ênio Ferreira, Renata Salgado Fernandes, et al. 2019. “Protective Effect of Lactobacillus Delbrueckii Subsp. Lactis CIDCA 133 in a Model of 5 Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis.” *Journal of Functional Foods* 53 (February): 197–207. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.12.027>.
- Jesus, Luís Cláudio Lima de, Thiago de Jesus Sousa, Nina Dias Coelho-Rocha, Rodrigo Profeta, Fernanda Alvarenga Lima Barroso, Mariana Martins Drumond, Pamela Mancha-Agresti, et al. 2022. “Safety Evaluation of Lactobacillus Delbrueckii Subsp. Lactis CIDCA 133: A Health-Promoting Bacteria.” *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 14 (5): 816–29. <https://doi.org/10.1007/S12602-021-09826-Z/FIGURES/1>.
- Jhun, Jooyeon, Keun Hyung Cho, Dong Hwan Lee, Ji Ye Kwon, Jin Seok Woo, Jiyoun Kim, Hyun Sik Na, Sung Hwan Park, Seok Jung Kim, and Mi La Cho. 2021. “Oral Administration of Lactobacillus Rhamnosus Ameliorates the Progression of Osteoarthritis by Inhibiting Joint Pain and Inflammation.” *Cells* 10 (5). <https://doi.org/10.3390/CELLS10051057>.
- Johansson, Malin E.V., Daniel Ambort, Thaher Pelaseyed, André Schütte, Jenny K. Gustafsson, Anna Ermund, Durai B. Subramani, et al. 2011. “Composition and Functional Role of the Mucus Layers in the Intestine.” *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 68 (22): 3635–41. <https://doi.org/10.1007/S00018-011-0822-3>.
- Johansson, Maria A., Sophia Björkander, Manuel Mata Forsberg, Khaleda Rahman Qazi, Maria Salvany Celades, Julia Bittmann, Matthias Eberl, and Eva Sverremark-Ekström. 2016. “Probiotic Lactobacilli Modulate Staphylococcus Aureus-Induced Activation of Conventional and Unconventional T Cells and NK Cells.” *Frontiers in Immunology* 7 (JUL): 273. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2016.00273/BIBTEX>.
- Johnstone, Jennie, Maureen Meade, François Lauzier, John Marshall, Erick Duan, Joanna Dionne, Yaseen M. Arabi, et al. 2021. “Effect of Probiotics on Incident Ventilator-Associated Pneumonia in Critically Ill Patients: A Randomized Clinical Trial.” *JAMA* 326 (11): 1024–33. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2021.13355>.
- Justino, Priscilla F.C., Luis F.M. Melo, Andre F. Nogueira, Cecila M. Morais, Walber O. Mendes,

- Alvaro X. Franco, Emmanuel P. Souza, Ronaldo A. Ribeiro, Marcellus H.L.P. Souza, and Pedro Marcos Gomes Soares. 2015a. "Regulatory Role of Lactobacillus Acidophilus on Inflammation and Gastric Dysmotility in Intestinal Mucositis Induced by 5-Fluorouracil in Mice." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 75 (3): 559–67. <https://doi.org/10.1007/S00280-014-2663-X>.
- Kato, Shinichi, Nahla Hamouda, Yoshitaro Kano, Yousuke Oikawa, Yoshiki Tanaka, Kenjiro Matsumoto, Kikuko Amagase, and Masaki Shimakawa. 2017. "Probiotic Bifidobacterium Bifidum G9-1 Attenuates 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Mice via Suppression of Dysbiosis-Related Secondary Inflammatory Responses." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 44 (10): 1017–25. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12792>.
- Keefe, Dorothy M.K., Rachel J. Gibson, and Martin Hauer-Jensen. 2004. "Gastrointestinal Mucositis." *Seminars in Oncology Nursing* 20 (1): 38–47. <https://doi.org/10.1053/J.SONCN.2003.10.007>.
- Khailova, Ludmila, Christine H. Baird, Aubri A. Rush, Christopher Barnes, and Paul E. Wischmeyer. 2017. "Lactobacillus Rhamnosus GG Treatment Improves Intestinal Permeability and Modulates Inflammatory Response and Homeostasis of Spleen and Colon in Experimental Model of Pseudomonas Aeruginosa Pneumonia." *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)* 36 (6): 1549–57. <https://doi.org/10.1016/J.CLNU.2016.09.025>.
- König, Julia, Jerry Wells, Patrice D. Cani, Clara L. García-Ródenas, Tom MacDonald, Annick Mercenier, Jacqueline Whyte, Freddy Troost, and Robert Jan Brummer. 2016. "Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease." *Clinical and Translational Gastroenterology* 7 (10): e196. <https://doi.org/10.1038/CTG.2016.54>.
- Lane, Erin R., Timothy L. Zisman, and David L. Suskind. 2017. "The Microbiota in Inflammatory Bowel Disease: Current and Therapeutic Insights." *Journal of Inflammation Research* 10 (June): 63–73. <https://doi.org/10.2147/JIR.S116088>.
- Lee, Chun Seng, Elizabeth J. Ryan, and Glen A. Doherty. 2014. "Gastro-Intestinal Toxicity of Chemotherapeutics in Colorectal Cancer: The Role of Inflammation." *World Journal of Gastroenterology* 20 (14): 3751–61. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I14.3751>.
- Lee, Jacob S., Cristina M. Tato, Barbara Joyce-Shaikh, Fatih Gulan, Corinne Cayatte, Yi Chen, Wendy M. Blumenschein, et al. 2015. "Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability." *Immunity* 43 (4): 727–38. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2015.09.003/ATTACHMENT/94582FC5-DFD7-4490->

BFDE-BFE24A4A44E8/MMC1.PDF.

- Lei, M., C. Guo, D. Wang, C. Zhang, and L. Hua. 2017. “The Effect of Probiotic *Lactobacillus Casei* Shirota on Knee Osteoarthritis: A Randomised Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial.” *Beneficial Microbes* 8 (5): 697–703. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0207>.
- Li, Hong Li, Lan Lu, Xiao Shuang Wang, Li Yue Qin, Ping Wang, Shui Ping Qiu, Hui Wu, et al. 2017. “Alteration of Gut Microbiota and Inflammatory Cytokine/Chemokine Profiles in 5-Fluorouracil Induced Intestinal Mucositis.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (OCT). <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00455>.
- Longley, Daniel B., D. Paul Harkin, and Patrick G. Johnston. 2003. “5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies.” *Nature Reviews Cancer* 3 (5): 330–38. <https://doi.org/10.1038/NRC1074>.
- Lynch, Henry T., Catherine P. Droszcz, William A. Albano, and Jane F. Lynch. 1981. “‘Organic Brain Syndrome’ Secondary to 5-Fluorouracil Toxicity.” *Diseases of the Colon and Rectum* 24 (2): 130–31. <https://doi.org/10.1007/BF02604302>.
- Marshman, Emma, Catherine Booth, and Christopher S. Potten. 2002. “The Intestinal Epithelial Stem Cell.” *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 24 (1): 91–98. <https://doi.org/10.1002/BIES.10028>.
- Miura, Koh, Makoto Kinouchi, Kazuyuki Ishida, Wataru Fujibuchi, Takeshi Naitoh, Hitoshi Ogawa, Toshinori Ando, et al. 2010. “5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs.” *Cancers 2010, Vol. 2, Pages 1717-1730* 2 (3): 1717–30. <https://doi.org/10.3390/CANCERS2031717>.
- Mokoena, Mduduzi Paul. 2017. “Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review.” *Molecules (Basel, Switzerland)* 22 (8). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22081255>.
- Mowat, Allan M., and William W. Agace. 2014. “Regional Specialization within the Intestinal Immune System.” *Nature Reviews. Immunology* 14 (10): 667–85. <https://doi.org/10.1038/NRI3738>.
- Nijhuis, Laurens E.J., Brenda J. Olivier, and Wouter J. de Jonge. 2010. “Neurogenic Regulation of Dendritic Cells in the Intestine.” *Biochemical Pharmacology* 80 (12): 2002–8. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2010.06.034>.
- Nishida, Atsushi, Ryo Inoue, Osamu Inatomi, Shigeki Bamba, Yuji Naito, and Akira Andoh. 2018. “Gut Microbiota in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease.” *Clinical Journal of Gastroenterology*. *Clin J Gastroenterol*. <https://doi.org/10.1007/s12328-017-0813-5>.

- Oh, N. S., J. Y. Lee, J. M. Lee, K. W. Lee, and Y. Kim. 2017. "Mulberry Leaf Extract Fermented with *Lactobacillus Acidophilus* A4 Ameliorates 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Rats." *Letters in Applied Microbiology* 64 (6): 459–68. <https://doi.org/10.1111/LAM.12741>.
- Oliveira, Gabriela Chaves de Herika Polyana Silva Martins Rabelo Monteiro, Joveliane de Melo Franca, Thayná Millena Nunes Ferreira, Romulo Maia Muniz, Geovane Santos Neto, Wallace Ribeiro Nunes de, and Andrea de Souza Ferreira, Gabriella Freitas Drummond, Regina Maria Nardi Monteiro. 2019. "AÇÃO ANTIFUNGICA E ANTIBACTERIANA DE *Lactobacillus Rhamnosus* L156.4." [https://www.academia.edu/38432305/AÇÃO\\_ANTIFUNGICA\\_E\\_ANTIBACTERIANA\\_DE\\_Lactobacillus\\_rhamnosus\\_L156\\_4](https://www.academia.edu/38432305/AÇÃO_ANTIFUNGICA_E_ANTIBACTERIANA_DE_Lactobacillus_rhamnosus_L156_4).
- Oliveira, Letícia de C., Aline M.M. Silveira, Andréa de S. Monteiro, Vera L.dos Santos, Jacques R. Nicoli, Vasco A.de C. Azevedo, Siomar de C. Soares, Marcus V. Dias-Souza, and Regina M.D. Nardi. 2017. "In Silico Prediction, in Vitro Antibacterial Properties of a Putative Bacteriocin Produced by *Lactobacillus Rhamnosus* Strain L156.4." *Frontiers in Microbiology* 8 (MAY): 876. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00876/BIBTEX>.
- Österlund, P., T. Ruotsalainen, R. Korpela, M. Saxelin, A. Ollus, P. Valta, M. Kouri, I. Elomaa, and H. Joensuu. 2007. "Lactobacillus Supplementation for Diarrhoea Related to Chemotherapy of Colorectal Cancer: A Randomised Study." *British Journal of Cancer* 97 (8): 1028–34. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6603990>.
- Panpetch, Wimonrat, Pratsanee Hiengrach, Sumanee Nilgate, Somying Tumwasorn, Naraporn Somboonna, Alisa Wilantho, Piraya Chatthanathon, Piyapan Prueksapanich, and Asada Leelahavanichkul. 2020. "Additional *Candida Albicans* Administration Enhances the Severity of Dextran Sulfate Solution Induced Colitis Mouse Model through Leaky Gut-Enhanced Systemic Inflammation and Gut-Dysbiosis but Attenuated by *Lactobacillus Rhamnosus* L34." *Gut Microbes* 11 (3): 465–80. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1662712>.
- Pastorelli, Luca, Carlo De Salvo, Joseph R. Mercado, Maurizio Vecchi, and Theresa T. Pizarro. 2013. "Central Role of the Gut Epithelial Barrier in the Pathogenesis of Chronic Intestinal Inflammation: Lessons Learned from Animal Models and Human Genetics." *Frontiers in Immunology* 4 (SEP). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2013.00280>.
- Peng, Xianqi, Abdelaziz Ed-Dra, Yan Song, Mohammed Elbediwi, Reshma B. Nambiar, Xiao Zhou, and Min Yue. 2022. "Lacticaseibacillus *Rhamnosus* Alleviates Intestinal Inflammation and Promotes Microbiota-Mediated Protection against Salmonella Fatal Infections." *Frontiers*

- in Immunology* 13 (August). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.973224>.
- Peterson, D. E., R. J. Bensadoun, and F. Roila. 2011. "Management of Oral and Gastrointestinal Mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines." *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 22 Suppl 6 (Suppl 6). <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDR391>.
- Peterson, Lance W., and David Artis. 2014. "Intestinal Epithelial Cells: Regulators of Barrier Function and Immune Homeostasis." *Nature Reviews. Immunology* 14 (3): 141–53. <https://doi.org/10.1038/NRI3608>.
- Phillips, Eric, Alexandra France, George Thatvihan, Ukwuoma Nnaemeka, and Samana Zaidi. 2018. "Mucositis and Cardiotoxicity Due to 5-Fluorouracil." *American Journal of Therapeutics* 25 (6): E712–14. <https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000000725>.
- Plaza-Diaz, Julio, Francisco Javier Ruiz-Ojeda, Mercedes Gil-Campos, and Angel Gil. 2019. "Mechanisms of Action of Probiotics." *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)* 10 (suppl\_1): S49–66. <https://doi.org/10.1093/ADVANCES/NMY063>.
- Prisciandaro, Luca D., Mark S. Geier, Ann E. Chua, Ross N. Butler, Adrian G. Cummins, Guy R. Sander, and Gordon S. Howarth. 2012. "Probiotic Factors Partially Prevent Changes to Caspases 3 and 7 Activation and Transepithelial Electrical Resistance in a Model of 5-Fluorouracil-Induced Epithelial Cell Damage." *Supportive Care in Cancer : Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 20 (12): 3205–10. <https://doi.org/10.1007/S00520-012-1446-3>.
- Quaresma, Marielle, Samara Damasceno, Carlos Monteiro, Francisco Lima, Tiago Mendes, Marcos Lima, Priscilla Justino, et al. 2020. "Probiotic Mixture Containing Lactobacillus Spp. and Bifidobacterium Spp. Attenuates 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Mice." *Nutrition and Cancer* 72 (8): 1355–65. <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1675719>.
- Ranganathan, Kavitha, Eric Simon, Jeremy Lynn, Alicia Snider, Yu Zhang, Noah Nelson, Alexis Donneys, et al. 2018. "Novel Formulation Strategy to Improve the Feasibility of Amifostine Administration." *Pharmaceutical Research* 35 (5). <https://doi.org/10.1007/S11095-018-2386-5>.
- Ribeiro, Ronaldo A., Carlos W.S. Wanderley, Deysi V.T. Wong, José Maurício S.C. Mota, Caio A.V.G. Leite, Marcellus H.L.P. Souza, Fernando Q. Cunha, and Roberto C.P. Lima-Júnior. 2016. "Irinotecan- and 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis: Insights into Pathogenesis and Therapeutic Perspectives." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 78 (5): 881–93. <https://doi.org/10.1007/S00280-016-3139-Y>.

- Rochat, Tatiana, Luis Bermúdez-Humarán, Jean Jacques Gratadoux, Christel Fourage, Christine Hoebler, Gérard Corthier, and Philippe Langella. 2007. “Anti-Inflammatory Effects of Lactobacillus Casei BL23 Producing or Not a Manganese-Dependant Catalase on DSS-Induced Colitis in Mice.” *Microbial Cell Factories* 6 (July): 22. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-22>.
- Rudy, Bruce C., and Bernard Z. Senkowski. 1973. “Fluorouracil.” *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients* 2 (C): 221–44. [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(08\)60041-6](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60041-6).
- Sailaja, Badi Sri, Xi C. He, and Linheng Li. 2016. “The Regulatory Niche of Intestinal Stem Cells.” *The Journal of Physiology* 594 (17): 4827. <https://doi.org/10.1113/JP271931>.
- Salvo-Romero, Eloísa, Carmen Alonso-Cotoner, Cristina Pardo-Camacho, Maite Casado-Bedmar, and María Vicario. 2015. “The Intestinal Barrier Function and Its Involvement in Digestive Disease.” *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas* 107 (11): 686–96. <https://doi.org/10.17235/REED.2015.3846/2015>.
- Sanders, Mary Ellen, Louis M.A. Akkermans, Dirk Haller, Cathy Hammerman, James Heimbach, Gabriele Hörmannspenger, Geert Huys, et al. 2010. “Safety Assessment of Probiotics for Human Use.” *Gut Microbes* 1 (3): 164–85. <https://doi.org/10.4161/GMIC.1.3.12127>.
- Schnadower, David, Phillip I. Tarr, T. Charles Casper, Marc H. Gorelick, J. Michael Dean, Karen J. O’Connell, Prashant Mahajan, et al. 2018. “Lactobacillus Rhamnosus GG versus Placebo for Acute Gastroenteritis in Children.” *The New England Journal of Medicine* 379 (21): 2002–14. <https://doi.org/10.1056/NEJMOMA1802598>.
- Smith, Cassie L., Mark S. Geier, Roger Yazbeck, Diana M. Torres, Ross N. Butler, and Gordon S. Howarth. 2008. “Lactobacillus Fermentum BR11 and Fructo-Oligosaccharide Partially Reduce Jejunal Inflammation in a Model of Intestinal Mucositis in Rats.” *Nutrition and Cancer* 60 (6): 757–67. <https://doi.org/10.1080/01635580802192841>.
- Soares, Pedro M.G., José Maurício S.C. Mota, Emmanuel P. Souza, Priscilla F.C. Justino, Alvaro X. Franco, Fernando Q. Cunha, Ronaldo A. Ribeiro, and Marcellus H.L.P. Souza. 2013. “Inflammatory Intestinal Damage Induced by 5-Fluorouracil Requires IL-4.” *Cytokine* 61 (1): 46–49. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2012.10.003>.
- Socol, C., L. Vandenberghe, M. R. Spier, A. Medeiros, C. T. Yamaguishi, J. Lindner, A. Pandey, and V. Thomaz-Socol. 2010. “The Potential of Probiotics: A Review.” *Food Technology and Biotechnology*.
- Song, Minkyung, Hyun Wook Baik, Seong Gil Hong, and Mi Kyung Sung. 2016. “Wheat Bran Arabinoxylan Supplementation Alleviates 5-Fluorouracil Induced Mucositis and

- Myelosuppression in BALB/c Mice.” *Journal of Functional Foods* 21 (March): 312–20. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.12.001>.
- Sonis, Stephen T. 2004. “The Pathobiology of Mucositis.” *Nature Reviews. Cancer* 4 (4): 277–84. <https://doi.org/10.1038/NRC1318>.
- Sougiannis, A. T., B. N. VanderVeen, R. T. Enos, K. T. Velazquez, J. E. Bader, M. Carson, I. Chatzistamou, et al. 2019. “Impact of 5 Fluorouracil Chemotherapy on Gut Inflammation, Functional Parameters, and Gut Microbiota.” *Brain, Behavior, and Immunity* 80 (August): 44–55. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2019.02.020>.
- Sougiannis, Alexander T., Brandon N. VanderVeen, J. Mark Davis, Daping Fan, and E. Angela Murphy. 2021. “Understanding Chemotherapy-Induced Intestinal Mucositis and Strategies to Improve Gut Resilience.” *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 320 (5): G712–19. [https://doi.org/10.1152/AJPGI.00380.2020/ASSET/IMAGES/LARGE/AJPGI.00380.2020\\_F001.JPEG](https://doi.org/10.1152/AJPGI.00380.2020/ASSET/IMAGES/LARGE/AJPGI.00380.2020_F001.JPEG).
- Souza, D. G., D. C. Cara, G. D. Cassali, S. F. Coutinho, M. R. Silveira, S. P. Andrade, S. P. Poole, and M. M. Teixeira. 2000. “Effects of the PAF Receptor Antagonist UK74505 on Local and Remote Reperfusion Injuries Following Ischaemia of the Superior Mesenteric Artery in the Rat.” *British Journal of Pharmacology* 131 (8): 1800–1808. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0703756>.
- Stiles, Michael E., and Wilhelm H. Holzapfel. 1997. “Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy.” *International Journal of Food Microbiology* 36 (1): 1–29. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0).
- Sun, Zhihong, Hugh M.B. Harris, Angela McCann, Chenyi Guo, Silvia Argimón, Wenyi Zhang, Xianwei Yang, et al. 2015. “Expanding the Biotechnology Potential of Lactobacilli through Comparative Genomics of 213 Strains and Associated Genera.” *Nature Communications* 2015 6:1 6 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms9322>.
- Suzuki, Takuya. 2020. “Regulation of the Intestinal Barrier by Nutrients: The Role of Tight Junctions.” *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho* 91 (1). <https://doi.org/10.1111/ASJ.13357>.
- Tang, Yan, Yingtao Wu, Ziyi Huang, Weiwei Dong, Ying Deng, Fengjiao Wang, Ming Li, and Jieli Yuan. 2017. “Administration of Probiotic Mixture DM#1 Ameliorated 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis and Dysbiosis in Rats.” *Nutrition* 33 (January): 96–104. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2016.05.003>.

- Tassell, Maxwell L. van, and Michael J. Miller. 2011. "Lactobacillus Adhesion to Mucus." *Nutrients* 3 (5): 613–36. <https://doi.org/10.3390/NU3050613>.
- Thomsen, Michael, and Luis Vitetta. 2018. "Adjunctive Treatments for the Prevention of Chemotherapy- and Radiotherapy-Induced Mucositis." *Integrative Cancer Therapies* 17 (4): 1027–47. <https://doi.org/10.1177/1534735418794885>.
- Tong, Lingjun, Xinyi Zhang, Haining Hao, Qiqi Liu, Zihan Zhou, Xi Liang, Tongjie Liu, et al. 2021. "Lactobacillus Rhamnosus GG Derived Extracellular Vesicles Modulate Gut Microbiota and Attenuate Inflammatory in DSS-Induced Colitis Mice." *Nutrients* 13 (10). <https://doi.org/10.3390/NU13103319>.
- Trindade, L. M., V. D. Martins, N. M. Rodrigues, E. L.S. Souza, F. S. Martins, G. M.F. Costa, C. M. Almeida-Leite, et al. 2018. "Oral Administration of Simbioflora® (Synbiotic) Attenuates Intestinal Damage in a Mouse Model of 5-Fluorouracil-Induced Mucositis." *Beneficial Microbes* 9 (3): 477–86. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0082>.
- Vancamelbeke, Maaike, and Séverine Vermeire. 2017. "The Intestinal Barrier: A Fundamental Role in Health and Disease." *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 11 (9): 821–34. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>.
- Wardill, Hannah R., Wim J.E. Tissing, Hannelouise Kissow, and Andrea M. Stringer. 2019. "Animal Models of Mucositis: Critical Tools for Advancing Pathobiological Understanding and Identifying Therapeutic Targets." *Current Opinion in Supportive and Palliative Care* 13 (2): 119–33. <https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000421>.
- Wigmore, Peter M., Sarah Mustafa, Maha El-Beltagy, Laura Lyons, Jariya Umka, and Geoff Bennett. 2010. "Effects of 5-FU." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 678: 157–64. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6306-2\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6306-2_20).
- Xia, Chaofei, Chunling Jiang, Wenyu Li, Jing Wei, Hu Hong, Jingao Li, Liu Feng, Hong Wei, Hongbo Xin, and Tingtao Chen. 2021. "A Phase II Randomized Clinical Trial and Mechanistic Studies Using Improved Probiotics to Prevent Oral Mucositis Induced by Concurrent Radiotherapy and Chemotherapy in Nasopharyngeal Carcinoma." *Frontiers in Immunology* 12 (March). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.618150>.
- Yeung, Chun Yan, Wai Tao Chan, Chun Bin Jiang, Mei Lien Cheng, Chia Yuan Liu, Szu Wen Chang, Jen Shiu Chiang Chiau, and Hung Chang Lee. 2015. "Amelioration of Chemotherapy-Induced Intestinal Mucositis by Orally Administered Probiotics in a Mouse Model." *PLOS ONE* 10 (9): e0138746. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0138746>.
- Yeung, Chun Yan, Jen Shiu Chiang Chiau, Wai Tao Chan, Chun Bin Jiang, Mei Lien Cheng,

- Hsuan Liang Liu, and Hung Chang Lee. 2013. "In Vitro Prevention of Salmonella Lipopolysaccharide-Induced Damages in Epithelial Barrier Function by Various Lactobacillus Strains." *Gastroenterology Research and Practice* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/973209>.
- Yue, Xi, Sun Wen, Ding Long-kun, Yan Man, Sun Chang, Zhang Min, Li Shuang-yu, Qian Xin, Ma Jie, and Wu Liang. 2022. "Three Important Short-Chain Fatty Acids (SCFAs) Attenuate the Inflammatory Response Induced by 5-FU and Maintain the Integrity of Intestinal Mucosal Tight Junction." *BMC Immunology* 23 (1). <https://doi.org/10.1186/S12865-022-00495-3>.
- Zhang, Ling, Yiyi Jin, Jun Peng, Wujin Chen, Lu Lisha, and Jiumao Lin. 2019. "Qingjie Fuzheng Granule Attenuates 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucosal Damage." *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 118 (October). <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.109223>.
- Zheng, Jinshui, Stijn Wittouck, Elisa Salvetti, Charles M.A.P. Franz, Hugh M.B. Harris, Paola Mattarelli, Paul W. O'toole, et al. 2020a. "A Taxonomic Note on the Genus Lactobacillus: Description of 23 Novel Genera, Emended Description of the Genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and Union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70 (4): 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004107>.
- Zihni, Ceniz, Clare Mills, Karl Matter, and Maria S. Balda. 2016. "Tight Junctions: From Simple Barriers to Multifunctional Molecular Gates." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17 (9): 564–80. <https://doi.org/10.1038/NRM.2016.80>.

## 10 ANEXO 1- PROTOCOLO 6/2023 CEUA/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

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

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do efeito enteroprotetor da linhagem *Lactocaseibacillus rhamnosus* LR156.4 em modelo murino de mucosite induzido por 5-FU", protocolo do CEUA: 6/2023 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 07/02/2023.

Vigência da Autorização	07/02/2023 a 06/02/2028
Finalidade	Pesquisa
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central
<b>Dados dos animais agrupados (uso do biotério)</b>	
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	32
Idade	6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central

## 11 APÊNDICE A – PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

### 11.1 ARTIGO DE REVISÃO: *LACTOCOCCUS LACTIS* AS AN INTERLEUKIN DELIVERY SYSTEM FOR PROPHYLAXIS AND TREATMENT OF INFLAMMATORY AND AUTOIMMUNE DISEASES

Dentre as diversas aplicações dos microrganismos lácticos, destaca-se o seu potencial como veículos de entrega de citocinas e expressão de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, desempenhando um papel importante como adjuvantes no tratamento de várias enfermidades. Esta seção apresenta um artigo de revisão que aborda as diferentes citocinas utilizadas e suas respectivas aplicações, destacando o uso do *Lactococcus lactis* como veículo de entrega ou expressão dessas citocinas. Através dessa abordagem, busca-se explorar o potencial terapêutico desses microrganismos na modulação do sistema imunológico e no desenvolvimento de estratégias promissoras para o tratamento de doenças.

Probiotics and Antimicrobial Proteins  
<https://doi.org/10.1007/s12602-023-10041-1>

RESEARCH



### *Lactococcus lactis* as an Interleukin Delivery System for Prophylaxis and Treatment of Inflammatory and Autoimmune Diseases

Gabriela Munis Campos<sup>1</sup> · Monique Ferrary Américo<sup>1</sup> · Andria dos Santos Freitas<sup>1</sup> ·  
 Fernanda Alvarenga Lima Barroso<sup>1</sup> · Joyce da Cruz Ferraz Dutra<sup>1,2</sup> · Ludmila Silva Quaresma<sup>1</sup> ·  
 Bárbara Fernandes Cordeiro<sup>1</sup> · Juliana Guimarães Laguna<sup>1</sup> · Luís Cláudio Lima de Jesus<sup>1</sup> · Aparecida Maria Fontes<sup>3</sup> ·  
 Alexander Birbrair<sup>4,5</sup> · Tulio Marcos Santos<sup>1,6</sup> · Vasco Azevedo<sup>1</sup>

Accepted: 9 January 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

#### Abstract

Target delivery of therapeutic agents with anti-inflammatory properties using probiotics as delivery and recombinant protein expression vehicles is a promising approach for the prevention and treatment of many diseases, such as cancer and intestinal immune disorders. *Lactococcus lactis*, a Lactic Acid Bacteria (LAB) widely used in the dairy industry, is one of the most important microorganisms with GRAS status for human consumption, for which biotechnological tools have already been developed to express and deliver recombinant biomolecules with anti-inflammatory properties. Cytokines, for example, are immune system communication molecules present at virtually all levels of the immune response. They are essential in cellular and humoral processes, such as hampering inflammation or adjuvating in the adaptive immune response, making them good candidates for therapeutic approaches. This review discusses the advances in the development of new therapies and prophylactic approaches using LAB to deliver/express cytokines for the treatment of inflammatory and autoimmune diseases in the future.

**Keywords** Lactic Acid Bacteria · Cytokines · Inflammation, Heterologous protein expression · Immune signalization

Tulio Marcos Santos, and Vasco Azevedo contributed equally to this work.

✉ Vasco Azevedo  
vascoariston@gmail.com

- <sup>1</sup> Department of Genetics, Ecology, and Evolution, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil
- <sup>2</sup> Department of Microbiology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil
- <sup>3</sup> Genetics Department, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil
- <sup>4</sup> Department of Dermatology, School of Medicine and Public Health, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA
- <sup>5</sup> Department of Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil
- <sup>6</sup> Uniclón Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brazil

## Introduction

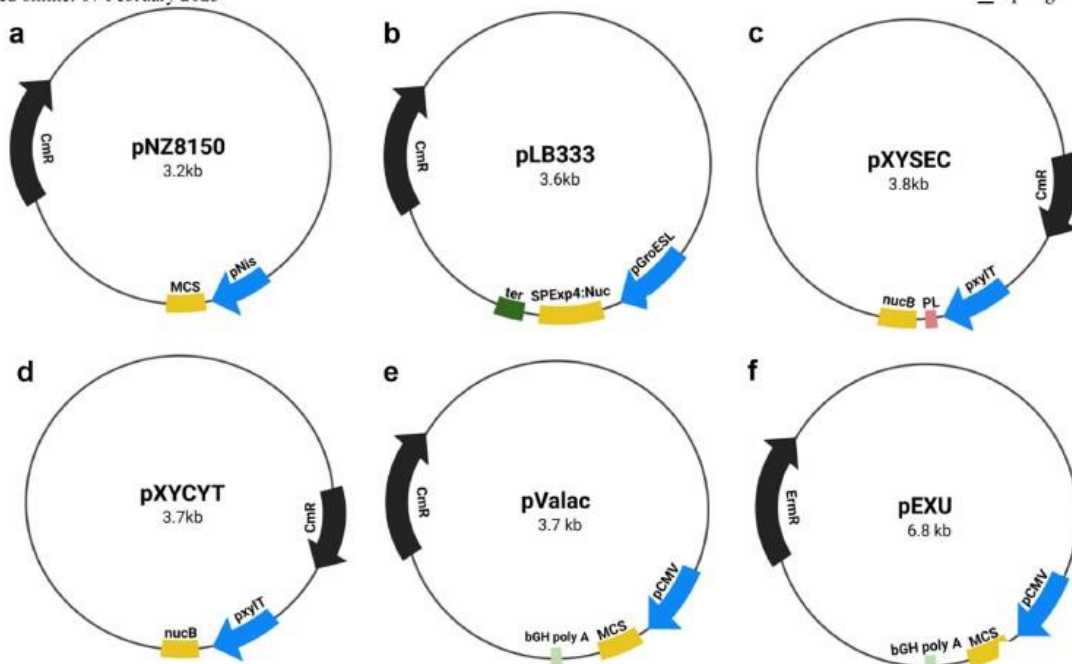
Lactic Acid Bacteria (LAB) are a heterogeneous group of Gram-positive, mesophilic, non-LPS-producing bacteria, and with the ability to produce lactic acid from sugar fermentation [1]. This group consists of bacteria of the genus *Lactobacillus* (which has been reclassified into 25 new genera), *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, and *Weissella* [1–4].

The absence of endotoxins makes LAB an important group for industrial applications [5]. In this context, the long track record in fermentative processes of cheese, yogurt, and other dairy products, as well as their ability to produce some food-preserving acids, led to LABs receiving GRAS (generally recognized as safe) status from the Food and Drug Administration (FDA) [2, 6–8].

In addition to their widespread use in the food industry, some LAB strains are used as probiotics, defined as “live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host” [9–11]. The

Published online: 07 February 2023

 Springer



**Fig. 1** Representation of the main plasmid vectors of prokaryotic expression (a–d) and eukaryotic expression (e, f) used in *Lactococcus lactis*. Blue: promoters; yellow: multiple cloning sites/nuclease gene;

black: antibiotic resistance (CmR, chloramphenicol resistance; EmrR, erythromycin resistance). Green: other transcriptional elements (poly A tail; transcription termination factor); pink: signal peptide

the PnisA/PnisF promoters, thus, inducing the expression of genes regulated by them (Fig. 1a) [16, 21].

### SICE System

The stress-induced controlled expression system (SICE) is a vector that carries an expression cassette under the transcriptional control of a stress-inducible promoter. This system is based on the groESL operon, which after induction with different stressors agents, including those related to gastrointestinal tract (GIT) (pH, heat-shock, or bile salts), can induce protein synthesis of cloned open reading frames (ORFs) (Fig. 1b) [22, 23].

### XIES System

Another important heterologous expression system is the xylose-inducible expression system, developed by Miyoshi et al. [24]. This system uses the promoter *pxyLT* from *Lactococcus lactis* NCDO2118 to control the expression of genes of interest. With the addition of xylose in the bacterial growth medium, the promoter *pxyLT* is activated, producing the protein of interest. It is essential to highlight that glucose in the medium shuts down the system.

The XIES system has two versions: the secretion version (pXIES:SEC), where the bacteria produce and secrete the protein (Fig. 1c), and the cytoplasmic version (pXIES:CYT), where the protein produced remains inside the bacteria (Fig. 1d) [24].

### pVALAC Vector

Other expression systems have also been explored for protein expression directly by host cells using *L. lactis* as a delivery vector. One of these new approaches is the pVALAC (vaccination using lactic acid bacteria) vector, which was constructed to deliver antigens via *Lactococcus* spp. as a vaccinal and gene therapy approach. The construction of this plasmid was idealized using the fusion of a eukaryotic region containing the promoter pCMV originated from cytomegalovirus, allowing the cloning of antigens of interest for expression in eukaryotic host cells, and a prokaryotic region, where replication rolling-circle type, and also selection in bacteria (chloramphenicol gene marker) can be performed (Fig. 1e) [25].

### pExu Vector

The pExu (extra chromosomal unit) vector, containing the pCMV promoter and erythromycin as a selection marker, was constructed as a vaccinal/gene therapy vector to be expressed only by eukaryotic cells. Unlike pVALAC, delivered only by *Lactococcus* sp., pExu can replicate in

Gram-positive and Gram-negative bacteria, including *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus* sp., and *E. coli* strains. In addition, this vector has a theta-type replication. This makes it more stable (Fig. 1f) [26, 27].

## Immune System and Cytokines

Immune system cells require a communication network in order to act specifically, locally, or systemically. To achieve this, the immune system has a chain of molecules necessary for its functioning, in which cytokines are among the best characterized [28–30].

Cytokines are a large group of non-enzymatic proteins involved in all immunity levels, including innate and adaptive responses, antigen presentation, cell recruitment, and expression of adhesion molecules. These cytokine networks are complex, and their production is usually transient due to the rapid elimination of the inducing stimulus, feedback mechanisms, and negative receptor regulation. In this context, it is essential to highlight that the prolonged action of cytokines in the immune system can cause damage to the healthy organism, such as the development of chronic inflammation [31].

Restoration of cytokine balance benefits the body in immune and inflammatory responses, making them a source for developing new therapeutic targets [32, 33]. In general, cytokines are used in therapeutic/vaccination strategies only to act as adjuvants-substances capable of enhancing the immune response [34] when co-administered with the molecule of interest [35, 36], allowing both delivery to antigen-presenting cells (APCs) and to modulate the specificity, duration, and type of response (cellular or humoral) [37]. Based on these properties, some cytokines have been evaluated for their biotherapeutic properties.

### IL-10

The IL-10 family of cytokines can be divided into three subgroups based on their functions. The first group, represented only by IL-10, is present in innate and adaptive immune responses and performs immunosuppressive functions by reducing tissue damage caused by excessive inflammation [38, 39]. The second group includes cytokines of the IL-20 subfamily, which act mainly on epithelial cells and induce innate defense mechanisms. Finally, the third group consists of the IL-28 subfamily, generally classified as type III interferons (IFNs) with a preference for tissue epithelial cells [38].

Interleukin-10 (IL-10) has anti-inflammatory properties and plays a critical role in the prevention of inflammatory processes [40]. Mature human IL-10 has 160 amino acids and can be produced by various leukocytes and tissue

epithelial cells, such as innate immune system cells, including dendritic cells (DC), macrophages, mast cells, natural killer (NK) cells, eosinophils, neutrophils, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and B cells [29, 30, 40]. IL-10 is not a cell-specific cytokine, but is widely expressed by several immune cells and exerts its anti-inflammatory effects through multiple induction pathways, making it an important molecule to test for delivery or local expression using *L. lactis* as a delivery vehicle.

For this purpose, Schotte et al. [41] investigated the ability of *Lactococcus lactis* MG1363 to synthesize and secrete murine IL-10 fused to a secretion signal peptide of the Usp45 protein of lactococcal origin. The authors constructed a plasmid (pTRESX1) based on the pVAX plasmid and the mIL-10 sequence. Bacteria carrying the mIL-10 sequence were able to produce and secrete the protein even at low concentrations [41].

Martin et al. [42] and Benbouzine et al. [23] used the vector pSICE containing the IL-10 sequence carried by *L. lactis* to treat IBD induced by dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS). The recombinant *Lactococcus lactis* producing IL-10 decreased intestinal permeability by partially improving and modulating the expression of the tight junctions *F11r* and *Zo-1*. Administration of the recombinant bacteria also resulted in protective effects on immune activation and intestinal function parameters [23, 42].

Del Carmo [33] tested the effects of IL-10 cytokine delivered/expressed by two plasmids (pValac and pGroesESL) in a 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced chronic colitis model. Administration of both plasmids decreased the severity of inflammation, improved the intestinal damage score and modulated the IL-10/IL-6 expression ratio [33].

Strategies have also been developed using pValac carrying IL-10 in models of intestinal inflammation. For example, Del Carmen et al. [43] constructed a *Lactococcus lactis*-producing fibronectin binding protein A (FnBPA<sup>+</sup>) of *Staphylococcus aureus* (*L. lactis* MG1363 FnBPA<sup>+</sup>) capable of harboring the plasmid pValac carrying the mIL-10 gene. This strain could efficiently internalize and induce the expression of FnBPA<sup>+</sup> from human epithelial cells [43] and was also able to reduce the severity of TNBS-induced colitis. Zurita-Turk et al. [44] also tested this invasive strain in an IL-10 knockout (IL-10<sup>-/-</sup>) model that spontaneously develops intestinal inflammation. Oral administration of *L. lactis* MG1363 FnBPA<sup>+</sup> (pValac:il-10) modulated the organism to produce IL-10 and reduced the intestinal inflammation severity, presenting lower scores and histological damage and tended to reduce the levels of the pro-inflammatory cytokine IL-6. Based on previous results, the authors carried out a new strategy to evaluate the therapeutic effect of an invasive strain of *L. lactis* MG1363 FnBPA<sup>+</sup> (pValac:IL-10) compared to a wild-type of strain of *L. lactis* MG1363 (pValac:IL-10) in preventing inflammation in

a sodium dextran sulfate (DSS)-induced colitis model. The results showed that both strains were able to deliver the vector to the inflammation sites, reducing the severity of inflammation and avoiding side effects [32, 43, 44].

Based on the previous effects of treatment with IL-10-expressing *Lactococcus lactis*, Bermúdez-Humaran et al. [45] showed that oral administration of these strains exhibited moderate anti-inflammatory effects in mice compared to the administration of serine and protease inhibitors, which showed more promising results at the mucosal level for the treatment of IBD [45]. There is limited efficacy for the use of IL-10 secreted *Lactococcus lactis* as a primary source of treatment for IBD, and this can be explained by the choice of the molecule, which may not be the best option, as well as due to the amount of IL-10 produced and released by the bacteria is not being sufficient to generate an efficient response of the intestinal environment [45, 46].

The cytokine hIL-10 has also been tested in models, such as autoimmune diabetes, where it was used as an immunomodulatory cytokine in a biological system that secretes human insulin autoantigen. Administration of IL-10 in combination with a low dose of systemic anti-CD3 was well tolerated and induced a long-term autoantigenicity, allowing stable reversal of newly diagnosed autoimmune diabetes in mice. Furthermore, Takiishi et al. [47] and Robert et al. [48] used hIL-10 combined with a T1D GAD65 autoantigen in *Lactococcus lactis*, and administered in the intestine in a mouse model of diabetes. The combination with anti-CD3 and the treatment stabilized insulinitis, preserved  $\beta$  cells, and restored normoglycemia in mice [47, 48].

Oral administration of *L. lactis* carrying IL-10 was tested to treat food tolerance by preventing sensitization in a mouse model of food allergy. Sensitization was performed with  $\beta$ -lactoglobulin in the presence of cholera toxin. Pre-treatment contributed to the reduction of anaphylaxis and inhibited the production of antigen-specific IgE and IgG and increased the production of antigen-specific IgA in the intestine [49]. Marinho et al. [50] used *L. lactis* NCDO2118 to support the XIES expression system producing LL-CYT and LL-SEC IL-10 expression cassettes from *Ratus norvegicus*. They were administered orally and both treatments with the recombinant strains resulted in decreased cytokines observed during an inflammatory response in allergic disorders (IL-4, IL-5, CCL3), EPO activity, IgE, IgG1 anti-OVA levels, pulmonary inflammation, and mucus hypersecretion [50].

## IL-22

IL-22 is a member of the IL-10 cytokine family and a critical regulator of epithelial homeostasis. The primary function of IL-22 is to provide a protective response against pathogens at barrier surfaces. It has been implicated in multiple aspects

of epithelial barrier function, including regulation of epithelial cell growth and permeability, mucus and antimicrobial protein (AMP) production, and complement activation [38, 51, 52]. IL-22 acts exclusively on epithelial cells to promote cell regeneration and tissue repair. The IL-22 receptor is widely expressed on epithelial cells in boundary tissues, such as the gut, lung, liver, and skin [53].

This cytokine is constitutively expressed in the small intestine of humans and mice to maintain the integrity of the epithelial barrier against enteric microorganisms, which plays an essential role in the pathogenesis of IBD, and the level of expression depends on the type of inflammation. In healthy humans and mice, the expression level of IL-22 is rarely detectable [54, 55]. Many studies have shown that IL-22 is essential in various cardiovascular diseases, inhibiting inflammation in myocarditis, atherosclerosis, and myocardial infection [56].

In the Loera-Arias et al. [57] work, a safe vector was constructed to produce hIL-22 *in vivo* in *L. lactis* NZ9000 using a nisin-inducible system. Western blotting was performed to confirm the expression, and an ELISA assay was performed to quantify the secreted protein. Recombinant *L. lactis* was added to a culture of Colo-205 cells, a cell line that secretes IL-10 upon IL-22 stimulation, to evaluate the bioactivity of the recombinant IL-22. The recombinant strain induced IL-10 production by Colo-205 cells, and the amount of IL-10 secreted was proportional to the number of recombinant bacteria used, demonstrating that the secreted hIL-22 was biologically active [57].

To evaluate *L. lactis* carrying the plasmid ProbiH1-IL-22 on symptoms of post-infectious irritable bowel syndrome (PI-IBS) symptoms, Maëva et al. [58] used a model of *Citrobacter rodentium* infection in C57BL6/J mice since symptoms resemble enterobacterial gastroenteritis. The infected mice exhibited persistent colonic hypersensitivity, cognitive impairment, and anxiety-like behaviors associated with low-grade inflammation, and increased intestinal permeability. This study presented an alternative treatment using recombinant *L. lactis* as a therapeutic approach, enabling the production of IL-22 in epithelial cells, after which the treatment with this recombinant strain improved intestinal permeability, normalized colonic sensitivity, restored cognitive performance, and also reduced anxiety-like behaviors [58].

## IL-4

IL-4 is a member of the T helper 2 (Th2) cytokine family. These cytokines are key mediators of allergic inflammation, are potent B-cell growth and survival factors, promote immunoglobulin isotope conversion to IgE and IgG, and play a critical role in macrophage regulation [59, 60]. Several innate immune cell types are known to be IL-4 producers: epithelial cells, lymphocytes, eosinophils, basophils, and

mast cells. They have a wide range of overlapping, but also distinct biological functions, particularly in inflammatory and allergic diseases [61].

Cytokines are part of a chain of events that contribute to immunomodulation, and stimulate risk factors that may be present in the development of type 1 diabetes (DM1). They can induce the destruction of T cells present in pancreatic islets. In this context, studies have been developed to evaluate immunomodulation by administration of IL-4 and IL-10 [62–64].

Preisser et al. [62] used a synergistic strategy with the invasive strain *Lactococcus lactis* MG1363 FnBPA<sup>+</sup> by using plasmids encoding IL-4 and IL-10 in a multidose streptozotocin (STZ) diabetes model and non-obese diabetic (NOD) mice. In the STZ model, the treatments used (IL-4; IL-10; IL-4/IL-10) did not alter glycemic levels after the induction of type 1 diabetes (T1D) and showed similar levels of IL-4 and IL-10 measured in serum and pancreas. The groups presented blood glucose levels close to the saline group, with a progressive increase in the incidence of diabetes in all groups tested, even those receiving oral treatment. Although all groups presented diabetic animals, the groups in which IL-4 and IL-10 were administered presented a higher number of prevention of hyperglycemia and reduction of pancreatic islets destruction [62].

NOD mice were also treated orally with *Lactococcus lactis* MG1363 FnBPA<sup>+</sup> carrying pValac:IL-4 and pValac:IL-10. The groups receiving *L. lactis* carrying IL-4 and IL-10 exhibited a normoglycemic pattern, consisting of

glycemic levels below 200 mg/dL. The synergistic treatment also protected the mice from developing T1D throughout the experimental period and induced significantly higher levels of IL-4 and IL-10 compared to the saline group. At the end of the experimental period, only mice in the saline group developed diabetes [62].

IL-4 and IL-13-producing Th2 cells mediate exacerbated inflammation in colitis, resulting in a deregulated immune response in the intestinal mucosa [65]. IL-4 also plays a critical role in the pathogenesis of ulcerative colitis. Souza et al. [66] used *L. lactis* and pValac::dts::IL-4 as a therapeutic molecule against TNBS-induced colitis. Intra-gastric administration of the recombinant strain effectively reduced the severity of colitis by decreasing IL-12, IL-6, and myeloperoxidase (MPO) activity and increasing IL-4 and IL-10 levels, thereby contributing to the restoration of intestinal homeostasis [66].

## IL-2

Interleukin IL-2 is an autocrine T-cell growth factor that plays a role in the stimulation and proliferation of these cells, the generation of effector memory T cells, and also has the potential to induce self-tolerance. In addition to its originally

recognized role in T cell proliferation, IL-2 increased the cytolytic activity of NK cells and lymphokine-activated killer cells [67–69]. It also produced primarily CD4<sup>+</sup>T cells, but high-affinity IL-2 receptors are expressed by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and other cell populations [68].

IL-2 was the first cytokine to be administered to humans with cancer and HIV/AIDS, demonstrating success as an immunotherapy. Its limitations were demonstrated by the administration of high doses administration resulting in toxic effects and vascular leakage syndrome [67]. One of the most studied cytokine receptors is the common gamma chain family ( $\gamma$ c). It is present in IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, and IL-21, and is named after the use of the  $\gamma$ c subunit for its receptors [70].

The use of *L. lactis* carrying IL-2 for various therapeutic protocols may become a key to immunomodulation without causing toxic effects to the body. For example, Steidler et al. [71] constructed a vector capable of expressing mIL-2 in *Lactococcus lactis* under the controllable phage promoter T7, where the cytokine expression cassette was fused to the *usp45* gene [71]. Fernández et al. [72] showed that *Lactococcus lactis* has the potential to secrete mIL-2 under the control of the nisin promoter *pnisA* without the need for a signal peptide, and the expression was confirmed by Western blot technique [72].

Steidler et al. [73] constructed two strains of *L. lactis* carrying tetanus toxin fragment C (TTFC) in the cytoplasmic compartment, which could also secrete IL-2 or IL-6. By intranasal immunization of mice with the constructed strains, anti-TTFC antibodies could be visualized. Anti-TTFC antibody titers were also measured in groups treated with recombinant bacteria that also secreted IL-2 or IL-6. When the recombinant bacteria were killed with mitomycin C, the adjuvant effect was lost, and it was shown that live bacteria are necessary for the secretion of these interleukins by *L. lactis* [73].

To evaluate *Lactococcus lactis* as a delivery vector for an oral brucellosis vaccine, Rezaei et al. [74] engineered an *Omp16-IL-2* fusion gene and evaluated the delivery and expression of this gene in *L. lactis* MG1363 [74]. The researchers successfully described the secretion of a sequence of porcine IL-2 in *Lactococcus lactis* NZ9000. Expression was confirmed in a cell proliferation assay in an IL-2-dependent CTLL-2 cell line [75].

## IL-6

IL-6 is a prototypical homeostatic cytokine with a pleiotropic effect on the immune response, particularly inflammation, hematopoiesis, bone metabolism, embryonic development, and other fundamental processes, such as neural and cardiovascular development [76–79]. When infection or tissue injury disrupts homeostasis, IL-6 is immediately produced

and contributes to host defense against emerging stress by activating the acute phase of inflammation [76].

The IL-6 family includes many cytokine members: IL-6, IL-11, IL-27, IL-39, oncostatin M (OSM), leukemia inhibitory factor (LIF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), cardiotrophin 1 (CT-1), and cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1) [78]. Members of this family play prominent roles in chronic inflammation, autoimmunity, infectious diseases, and cancer. As a result, the IL-6 family of cytokines is now considered a primary therapeutic target for clinical intervention [79]. During inflammation, IL-6 cytokines regulate innate immunity through direct effects on innate immune cells and indirectly through activation of stromal tissue cells resident at the site of inflammation [79]. IL-6 promotes antibody production by acting directly on plasma cells and indirectly by promoting Bcl6-dependent follicular differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells in the presence of IL-21 and T cell receptor (TCR) stimulation [78]. In disease, IL-6 is an important growth factor in myeloma cells. Its concentration is elevated in patients with Crohn's disease and is overproduced in the germinal centers of hyperplastic lymph nodes in patients with Castleman's disease [80]. Thus, IL-6 is being investigated as a potential immunomodulatory cytokine.

Li et al. [81] developed a new mucosal adjuvant consisting of a cytokine generated by conjugating the C-terminal portion of mIL-6 with an M-cell targeting peptide (CKS9) to enhance a mucosal immune response. The researchers used the *L. lactis* IL1403 strain as a host to express and secrete the recombinant IL-6-CKS9 protein, and this potential adjuvant was tested with the *Brachyspira* sp. membrane B protein (M-BmpB) antigen, administered orally. Analyses performed by the authors showed an increase in anti-M-BmpB antibody levels at mucosal and systemic levels. There was a successful production and secretion of mIL-6, demonstrating that the use of recombinant *L. lactis* has the potential to be used as a vaccine adjuvant [81].

## IL-12

IL-12 is a member of the IL-12 cytokine family, which is part of the IL-6 superfamily. The IL-12 family consists of four heterodimeric cytokines that share sequence homology, including IL-12, IL-23, IL-35, an anti-inflammatory cytokine produced by regulatory T cells (T<sub>reg</sub> cells), and IL-27 [82]. IL-12 has biological functions such as the differentiation of naïve CD4<sup>+</sup> T cells into IFN $\gamma$ -producing T<sub>H</sub>1 cells. The ability of these cytokines to modulate immune responses in cancer has been of great interest. IL-12 cytokines family are typically secreted by innate immune cells, but can also be secreted by adaptive immune cells depending on the disease and immune context [82, 83]. Their importance in the context of cancer and the major clinical trials conducted are reviewed in the work of Nguyen et al. [84].

To test the production of IL-12 by *L. lactis*, Bermúdez-Humarán et al. [35] constructed an NZ9000 strain with a single strand of the ssIL-12 gene coupled to a nisin promoter. The biological activity of IL-12 was confirmed *in vitro* by its ability to induce IFN- $\gamma$  production in mouse splenocytes and *in vivo* in C57BL/6 mice administered intranasally, where IL-12 induced production of IFN- $\gamma$  on the mucosal surface [35]. Cortez-Perez et al. [85] administered a strain of *L. lactis* carrying bovine  $\beta$ -Lactoglobulin (BLG) and IL-12 as an adjuvant to evaluate the modulating effect on allergen sensitization and allergic response. The prophylactic effect of administration in an allergy model was evaluated by challenging BALB/c mice with intranasal administration of BLG. The authors observed an increase in IFN- $\gamma$  levels in the treated mice, suggesting that IL-12 promotes the induction of Th1 response thought the induction of BLG-specific IgG2a [85].

Another study investigated the administration of recombinant *L. lactis* for the prevention of allergic diseases. It evaluated the immunomodulatory effects of IL-12 secreting *L. lactis* for intranasal administration in a mouse model of ovalbumin (OVA)-induced asthma. Mice that received the treatment showed less epithelial damage and mononuclear cell infiltration, reduced airway hyperresponsiveness, and lung inflammation [37].

Fernandez et al. [86] tested a novel signal peptide for *L. lactis*, the SLPmod, which was used to secrete mIL-12 in C3H/HeJ mice. This signal peptide was more effective in producing IL-12 than the Usp45-derived signal secretion [86]; this may be of great utility as the use of *L. lactis*

secreting mIL-12 may be beneficial in reducing the toxic side effects associated with systemic delivery of heterologous proteins.

## IL-27

Interleukin (IL)-27 is a cytokine that plays a pleiotropic role in the immune system and can directly modify the effector functions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. These changes lead to the induction of the cytokine IL-10 and the promotion of specialized regulatory T-cell responses (Treg) [87]. IL-27 is mainly produced by antigen-presenting cells, such as dendritic cells, monocytes, neutrophils, and macrophages. IL-27 production is mainly induced by Toll-like receptors (TLRs) and IFN- $\gamma$  [88, 89].

IL-27 can be used in therapies against diseases associated with Th1-type inflammation [88]. The use of anti-IL-27 to treat mice exposed to cigarette smoke resulted in a decrease in IFN- $\gamma$  and attenuated inflammation [90]. In ovalbumin-induced asthma models, prophylactic administration of IL-27 attenuated airway inflammation and hyperresponsiveness [91].

In this context, Hanson et al. [92] used *L. lactis*-IL27 by gavage in a model of colitis in Rag<sup>-/-</sup> mice. This administration protected the mice from enterocolitis by reducing disease scores, intestinal pathology, and inflammatory cytokine levels and increased IL-10 production [92]. These results demonstrate that the use of *L. lactis* has the potential to be an effective and safe treatment for IBD.

All experimental studies with *Lactococcus lactis* expressing or delivering cytokines are listed in Table 1.

## IL-35

IL-35 is an anti-inflammatory cytokine, a member of the IL-12 family with a unique expression pattern within the family, and is predominantly secreted by Treg cells and regulatory B cells (Breg) [99]. One of the most prominent functions of IL-35 is the ability to propagate infectious tolerance and to generate a potent population of IL-35-expressing regulatory cells, which have been shown to exhibit immunosuppressive activity [99, 100]. Functional analysis studies suggested that IL-35 plays a critical role in many autoimmune diseases such as multiple sclerosis (MS), systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), and inflammatory bowel disease (IBD) [101–104].

Using oral therapeutic administration of *Lactococcus lactis* carrying mIL-35, this cytokine has been shown to have immunosuppressive functions in several models of autoimmune disease. For example, Maddaloni et al. [98] tested the ability of this cytokine to improve collagen-induced arthritis (CIA). Oral administration of *L. lactis*-IL35 effectively

reduced the incidence and severity of CIA disease, reducing IFN- $\gamma$  and IL-17, and increasing the production of IL-10. This study showed the visibility and benefits of probiotics in immune diseases [98].

IL-35 is an anti-inflammatory cytokine that has been shown to be produced preferentially by Treg cells. It can also facilitate Treg cell generation and limit inflammatory Th17 cells [105]. Hence, Wang et al. [97] investigated its preventive potential. A dairy *L. lactis* NZ9000 strain was engineered to express murine IL-35 and used to prevent the development of DSS-induced mouse colitis. The results showed that oral administration of NZ9000/IL-35 induced the accumulation of IL-35 in the intestinal lumen of normal mice. When administered prophylactically, the recombinant strain suppressed the DSS-induced colitis progression and decreased the IL-17, IL-6, IFN- $\gamma$ , and TNF expression [97].

## IFN

Interferons (IFNs) are a class of cytokines that are elicited upon challenge to the host defense and are essential for

**Table 1** Cytokines secreted or delivered by *L. lactis* tested in disease models

Cytokine	BAL	Model studied	Organism tested	Main results	References
IL-10	<i>Lactococcus lactis</i> MGI 364 (LL-IL10); LL-OVA + IL10)	Diabetes	NOD mice	Increased levels of CD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatory T cells	[48]
IL-10	<i>Lactococcus lactis</i>	Diabetes	NOD mice	Combination of oral proinsulin and IL-10 via oral with low-dose aCD3 therapy restored beta-cell tolerance	[93]
IL-10/IL-4	<i>Lactococcus lactis</i> MGI 363	Diabetes	Mouse model C57BL/6/NOD	Lower incidence of diabetes and more preserved pancreatic islets	[62]
IL-10	<i>Lactococcus lactis</i> MGI 363 (LL-Thy12)	Crohn's disease	Crohn's disease patients	A decrease in disease activity	[94]
IL-10	<i>Lactococcus lactis</i> MGI 363 (LL-mIL10)	Food allergy	Mouse model of food allergy	Induction of IL-10 secretion by Peyer's patches cells	[49]
IL-10	<i>Lactococcus lactis</i> NCD02118	OVA-induced acute airway inflammation	Mouse model BALB/c	Decrease in eosinophil count, EPO activity, anti-OVA IgE and IgG1 levels, IL-4 and CCL3 production, lung inflammation, and mucus hypersecretion	[50]
IL-10	<i>Lactococcus lactis</i> MGI 363	TNBS-induced chronic colitis	Mouse model BALB/c	Reduced weight loss, lower disease scores, and immune activation	[95]
IL-10/TGF- $\beta$ 1	<i>Lactococcus lactis</i> MGI 363 / <i>L. lactis</i> NZ9000	DSS-induced colitis	Mouse model C57BL/6	Moderate anti-inflammatory effects	[45]
IL-10	<i>Lactococcus lactis</i> MGI 363	DSS-induced colitis	Mouse model C57BL/6	Reduce inflammation	[32]
IL-4	<i>Lactococcus lactis</i> MGI 363; <i>L. lactis</i> MGI 363 FuBPA +	Crohn's disease	Mouse model BALB/c	Decreased the severity of colitis; decreased levels of IL-12, IL-6, and MPO activity; and increased levels of IL-4 and IL-10	[66]
IL-22	<i>Lactococcus lactis</i>	Enterobacteria gastroenteritis	Mouse model C57BL/6	Alleviates colon hypersensitivity, cognitive impairment, and anxiety-like behaviors by acting on intestinal mucosal integrity	[58]
IL-27	<i>Lactococcus lactis</i>	Enterocolitis	Mouse model Reg-/-	Reduce the severity of colitis by increasing the production of IL-10	[92]
IL-17	<i>Lactococcus lactis</i> MGI 363	Human Papillomavirus (HPV)-induced cancer	Mouse model pathogen-free C57BL/6	Partial protection against TC-1-induced tumors	[96]
IL-12	<i>Lactococcus lactis</i>	ovalbumin (OVA)-induced asthma	Mouse model BALB/c	A shift from Th2 to Th1 with elevated IFN- $\gamma$ and decreased IL-4 levels	[37]
IL-35	<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000	DSS-induced colitis	Mouse model C57BL/6	Suppression of DSS-induced colitis progression	[97]
IL-35	<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	Collagen-Induced arthritis (CIA)	Mouse model C57BL/7	Reduced IFN- $\gamma$ , IL-17, and increased IL-10 production	[98]

mobilizing immune responses against pathogens. All three classes of IFNs are named for their common property to interfere with viral replication in the host [106].

The type I IFN classes are represented by the two best characterized and most widely expressed genes of this subtype: IFN- $\alpha$ , encoded by more than a dozen genes, and IFN- $\beta$ , a single gene family. Within this family, there are other types known as IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN  $\delta$ , IFN- $\zeta$ , IFN- $\omega$ , and IFN- $\tau$  [106, 107].

IFN- $\alpha$  has emerged as an important factor in several autoimmune and rheumatic diseases. It is produced by several cell types, and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are the major contributors to IFN- $\alpha$  production following pathogen infection [108]. It is also considered a potential therapeutic strategy to treat COVID-19 disease because the innate immune system rapidly produces IFN- $\alpha$  as a first line of defense to combat viral infections [109].

Due to its important role in host defense, many researchers are trying to make use of new strategies to manipulate IFN- $\alpha$  as a therapy for various diseases. In a study performed by Bayar et al. [110], *Lactococcus lactis* MG1363 and NZ9000 strains carrying the sequence encoding IFN- $\alpha$  were able to express it [110]. Zhang et al. [111] fused a synthetic LEIS-STCDA (LEISS) to the N-terminus of hIFN- $\alpha$ , increasing its secretion by *L. lactis* and its yield, representing a new therapeutic delivery strategy [111]. These studies open doors for the use of *L. lactis* in several new therapeutic approaches for the treatment of diseases, where INF- $\alpha$  production is deficient or where higher expression of this cytokine is required.

IFN- $\beta$ , an important cytokine, plays a critical role in stimulating innate and adaptive immune responses and has been reported to have pro-bacterial activity and antiviral immunity [112]. The interferon family has been strongly associated with T1D pathogenesis [113]. IFN- $\beta$  reduces the inflammatory response that is mediated by immune cell infiltration into the brain and is used to treat patients with multiple sclerosis [114]. In their study, Zhuang et al. [115] cloned the huIFN- $\beta$  sequence in an expression system (NICE) for expression in *L. lactis*. The recombinant strains were able to secrete huIFN- $\beta$  [115]. The ability of *L. lactis* to express IFN- $\beta$  opens new doors for its use in the treatment of diabetes and multiple sclerosis.

Type II IFN or IFN- $\gamma$  is best known as a critical cytokine secreted during activated NK- and T-cell responses. IFN- $\gamma$  is a protein encoded by the IFNG gene [106]. It is a pleiotropic cytokine with antiviral, antitumor, and immunomodulatory functions, such as enhancing antigen presentation for improved recognition via T-cell interaction, increasing the production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen intermediates (RNIs) [116, 117]. The presence of IFN- $\gamma$  is essential in combating mycobacterial infections through its ability to regulate various protective functions and maintain CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell activity [118].

Using a coding sequence of IFN- $\gamma$ , Rupa et al. [119] provided a tool to analyze the predisposition of pigs to food allergy. They used *L. lactis* as a delivery system for a cloned sequence of porcine IFN- $\gamma$  conjugated to the *usp45* secretion signal. The authors evaluated the biological activity of rpIFN- $\gamma$  through bioassays that determine the positive regulatory capacity of MHC II expression increased in 3D4/31 cells. These data suggest that recombinant *L. lactis* may enhance the type 1 immune response, which in turn may reduce susceptibility to allergy [119].

## IL-1Ra

The interleukin-1 (IL-1) cytokine and receptor family is unique because of its shared similarity to the toll-like receptor (TLR) families, including similar functions. More than any other cytokine family, the IL-1 family has emerged as a key cytokine involved in innate and adaptive immunity [120]. There are 11 members of the IL-1 family of cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , and IL-36 $\gamma$ ) and 10 members of the IL-1 family of receptors [121, 122]. IL-1R1 is the major receptor for IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  ligands, being expressed by various cell types, including innate and adaptive immune cell types, epithelial cells, endothelial cells, adipocytes, chondrocytes, and fibroblasts [123].

Namai et al. [124] used a nisin-controlled expression vector (NICE) with the sequence encoding mL-1RA, an IL-1 receptor antagonist (pNZ8148#2:SEC-IL1Ra), to form a recombinant *L. lactis* strain (gmLAB). The authors tested the expression of IL-1RA in a DSS-induced colitis model by oral administration. gmLAB suppressed weight loss and exacerbation of the disease index. In mice with acute colitis, oral administration of the recombinant strain reduced the expression of IL-17. In EL4 cells, NOB-1 rmIL-1Ra produced by gmLAB played an antagonist role by suppressing the expression of IL-1 [124].

## IL-18

IL-18 is a pro-inflammatory cytokine of the IL-1 family produced by immune cells, such as macrophages, Langerhans cells, DCs, and many non-immune cells, such as osteoblasts, chondrocytes, endothelial cells, keratinocytes, and intestinal epithelial cells [125, 126]. IL-18 is involved in the activation and differentiation of several T-cell populations and joins with IL-12 in the Th1 lymphocyte paradigm characterized by a predominant IFN- $\gamma$  production by T and B cells and NK cells [127, 128]. The post-translational regulation of IL-18 is similar to that IL-1 $\beta$ . Both cytokines are produced as inactive pro-forms require processing to become biologically active [129].

Based on the ability of *L. lactis* to secrete biologically active cytokines, Feizollahzadeh et al. [130] cloned

a sequence of mIL-18 to enhance the immune response, coupled to a nisin and *lacF* promoter in the strain NZ3900, which is unable to utilize lactose. For the detection of secreted mIL-18, Western blotting was performed to evaluate the biological activity of IL-18, and the authors used mouse splenic T cells and determined the increased secretion of IFN- $\gamma$ . The results indicated the generation of a novel recombinant strain of *L. lactis* expressing biologically active mIL-18 [130]. This IL-18-producing strain can be tested in models of inflammatory bowel disease and microbial infections to enhance host innate immunity and potentiate treatment strategies.

## IL-17

IL-17 is a versatile pro-inflammatory cytokine that is critical for a variety of processes, including host defense, tissue repair, the pathogenesis of the inflammatory disease, psoriasis, and cancer progression [131, 132]. The IL-17 family consists of six members, IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (also called IL-25), and IL-17F [133].

The IL-17 family shows broad heterogeneity of function in different inflammatory contexts. IL-17B is upregulated during intestinal inflammation and promotes neutrophil migration after intraperitoneal administration, suggesting a pro-inflammatory role. However, the same cytokine has anti-inflammatory functions by blocking IL-25 signaling during mucosal inflammation [134, 135]. IL-17A-producing TH17 cells protect the integrity of the intestinal mucosa and stimulate the

local maturation of IgA-producing plasma cells, but IL-17A has a relevant pathogenic role in several diseases where there is an alteration of the microbiota (dysbiosis), such as obesity, type 2 diabetes, Crohn's disease, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, and systemic lupus erythematosus [136, 137].

IL-17A has been implicated in the immunopathology of several inflammatory diseases. IL-17A signaling in target cells bearing IL-17 receptors, including fibroblasts, epithelial cells, and synovitis, results in the transcription of pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF, and IL-1). In addition, IL-17A increases the production and secretion of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), macrophages, and T cells [136, 138].

In addition to its antiviral responses, IL-17 also has a prominent role in promoting viral infection. Lahiri et al. [139] investigated chicken IL-17A-mediated antiviral immune effects on avian influenza virus (AIV) infection in primary chicken embryo fibroblast cells (CEFs). The authors used a strain of *L. lactis* secreting bioactive recombinant chicken IL-17A. This activity was confirmed by transcriptional upregulation of several genes associated with antiviral host responses, demonstrating that pretreatment of primary

CEFs cells with sChIL-17A prior to influenza virus infection induces a pro-inflammatory state and protects the cells from viral infection [139].

To understand IL-17A in cancer disease, it was constructed a recombinant *L. lactis* producing this cytokine in a stress-inducible vector (pSICE) and determined its biological activity in a bioassay test in a murine fibroblasts 3T3 L1 cell line and a murine model of human papilloma virus (HPV)-induced cancer. This recombinant *L. lactis* was able to express a biologically active IL-17A under stress. On average, 26% of treated mice did not develop the tumors. These results demonstrate that administration of a genetically engineered strain of *L. lactis* secreting IL-17 results in partial protection against tumors in mice [96].

## Production of Cytokines Using Food-Grade Systems

The broad applications of cytokine production and delivery are only possible because of the genetic modifications and molecular tools available. However, only a few recombinant *L. lactis* have been approved for human clinical trials [140]. Genetically modified bacteria are considered under the safety regulations for genetically modified organisms (GMOs) by regulatory agencies to prevent adverse effects on human health and the environment [141].

Many of the expression systems developed have antibiotic resistance genes (ARGs) as selective markers and are among the major concerns because the possibility of

transfer ARGs to microbial communities of the host microbiota or the environment. To overcome these concerns, the use of food-grade systems is an alternative strategy that can be based on auxotrophy, complementary markers, or the development of biocontainment strategies [8, 142]. In a pioneering study, the sequence of murine *Il10* was integrated into the bacterial genome, replacing the *thyA* gene of *Lactococcus lactis* which is essential for bacterial growth. This promoted a biocontainment system in which the recombinant strain *L. lactis* *thyA*<sup>-</sup>hIL10<sup>+</sup> is depends on thymine for its growth, preventing this GMO from spreading into the environment. This recombinant strain was tested in a DSS-induced colitis model, causing a 50% reduction in colitis with less inflammation and also preventing the onset of colitis in IL10<sup>-/-</sup> mice [143]. Following these results, the authors integrated the human *Il10* sequence into the bacterial genome, replacing the *thyA* gene of *Lactococcus lactis* and tested this strain in patients with Crohn's disease. The results of this first phase I clinical trial showed positive effects on the use of modified strains in terms of containment, tolerance, and also safety [94, 144]. In addition, the company ActoGenix, which is specialized in the development of LAB strains genetically engineered to secrete therapeutic

molecules, conducted tests in people with ulcerative colitis. The results of this study confirmed that the system is adequate for biological containment applied in humans, but there were no significant clinical effects.

## Conclusions and Future Prospects

Lactic Acid Bacteria, including *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* have been widely used in the dairy industry. Currently, the biotechnological tools developed to the harbor and express therapeutic biomolecules by *Lactococcus lactis* represent a major advance in bioengineering, providing efficient expression systems that allow therapeutic applications with promising results in several disease models. The use of *L. lactis* for delivery of cytokines is an interesting approach as it can provide a more straightforward therapeutic target, focusing on pathways of the immune system that could be disease-specific, seeking immunomodulation towards healing or protection of the organism. As we have described in this review, the construction of recombinant LAB strains that secrete or deliver recombinant cytokines has been widely reported in the literature; however, few disease models have been tested and even fewer have reached the clinical trial phase, demonstrating that this field of research is only beginning to be explored. In addition, the use of recombinant LAB in future clinical trials requires a risk assessment that takes safety guidelines for the use of genetically modified organisms provided by regulatory agencies around the world, which are essential for understanding and establishing new therapies. Therefore, future works should focus on ensuring the safety of LAB-producing therapeutic molecules, the long-term effect of these recombinant systems on different diseases, and expanding the applications while deepening the understanding of signaling molecules in each disease.

**Author Contribution** Conceptualization: Vasco Azevedo, Gabriela Munis Campos; writing—original draft preparation: Gabriela Munis Campos; writing—review and editing: Monique Ferrary Americo; Andria dos Santos Freitas, Fernanda Alvarenga Lima Barroso; Joyce da Cruz Ferraz Dutra, Ludmila Silva Quaresma; Bárbara Fernandes Cordeiro; Juliana Guimarães Laguna; Luís Cláudio Lima de Jesus; Aparecida Maria Fontes; Alexander Birbrair; Tulio Marcos Santos and Vasco Azevedo; supervision: Vasco Azevedo; funding acquisition: Vasco Azevedo. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding** Financial support and fellowships were provided by the Pró-Reitoria de Pesquisa — Universidade Federal de Minas Gerais, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## Declarations

**Consent for Publication** All authors consent to the publication of this article.

**Conflicts of Interest** The authors declare no competing interests.

## References

1. Tavares LM, de Jesus LCL, da Silva TF et al (2020) Novel strategies for efficient production and delivery of live biotherapeutics and biotechnological uses of *Lactococcus lactis*: the lactic acid bacterium model. *Front Bioeng Biotechnol* 8:1269. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.517166>
2. Cano-Garrido O, Seras-Franzoso J, Garcia-Fruitós E (2015) Lactic acid bacteria: reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes. *Microb Cell Factories* 14:1–12. <https://doi.org/10.1186/S12934-015-0313-6>
3. Stiles ME, Holzapfel WH (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* 36:1–29. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0)
4. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E et al (2020) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 70:2782–2858. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004107>
5. Khelissa S, Chihib NE, Gharsallaoui A (2020) Conditions of nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and its main uses as a food preservative. *Arch Microbiol* 203:465–480. <https://doi.org/10.1007/S00203-020-02054-Z>
6. Song AAL, In LLA, Lim SHE, Rahim RA (2017) A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microb Cell Fact* 16. <https://doi.org/10.1186/S12934-017-0669-X>
7. Kleerebezem M, Bachmann H, van Pelt-KleinJan E et al (2020) Lifestyle, metabolism and environmental adaptation in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Rev* 44:804–820. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa033>
8. Plavec TV, Berlec A (2020) Safety aspects of genetically modified lactic acid bacteria. *Microorganisms* 8:297. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020297>
9. Leblanc De Moreno De, A, Del Carmen S, Chatel JM et al (2015) Current review of genetically modified lactic acid bacteria for the prevention and treatment of colitis using murine models. *Gastroenterol Res Pract*
10. Cortes-Perez NG, de LeBlanc A, de M, Gomez-Gutierrez JG et al (2021) Probiotics and trained immunity. *Biomolecules* 11. <https://doi.org/10.3390/BIOM11101402>
11. Hill C, Guarner F, Reid G 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. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
12. Bungau SG, Behl T, Singh A et al (2021) Targeting probiotics in rheumatoid arthritis. *Nutrients* 13. <https://doi.org/10.3390/nu13103376>
13. Gomes AC, Bueno AA, De Souza RGMH, Mota JF (2014) Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutr J* 13:1–13. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-60>
14. Suzuki T, Nishiyama K, Kawata K et al (2020) Effect of the *Lactococcus Lactis* 11/19-B1 Strain on atopic dermatitis in a clinical test and mouse model. *Nutrients* 12. <https://doi.org/10.3390/nu12030763>

15. Kim S, Kim Y, Lee S et al (2022) Live biotherapeutic *Lactococcus lactis* GEN3013 enhances antitumor efficacy of cancer treatment via modulation of cancer progression and immune system. *Cancers (Basel)* 14:4083. <https://doi.org/10.3390/cancers14174083>
16. de Castro CP, Drumond MM, Batista VL et al (2018) Vector development timeline for mucosal vaccination and treatment of disease using *Lactococcus lactis* and design approaches of next generation food grade plasmids. *Front Microbiol* 9:1805. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01805>
17. Berlec A, Škrlec K, Kocjan J et al (2018) Single plasmid systems for inducible dual protein expression and for CRISPR-Cas9/CRISPRi gene regulation in lactic acid bacterium *Lactococcus lactis*. *Sci Rep* 8:1009. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19402-1>
18. Cook DP, Gysemans C, Mathieu C (2018) *Lactococcus lactis* as a versatile vehicle for tolerogenic immunotherapy. *Front Immunol* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01961>
19. Shende P, Basarkar V (2019) Recent trends and advances in microbe-based drug delivery systems. *Daru* 27:799–809. <https://doi.org/10.1007/S40199-019-00291-2>
20. Azizpour M, Hosseini SD, Jafari P, Akbary N (2017) *Lactococcus lactis* : a new strategy for vaccination. *Avicenna J Med Biotechnol* 9:163
21. Kuipers OP, Beerthuyzen MM, De Ruyter PGGA et al (1995) Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J Biol Chem* 270:27299–27304. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.27299>
22. Desmond C, Fitzgerald GF, Stanton C, Ross RP (2004) Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Appl Environ Microbiol* 70:5929–5936. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5929-5936.2004>
23. Benbouziane B, Ribelles P, Aubry C et al (2013) Development of a stress-inducible controlled expression (SICE) system in *Lactococcus lactis* for the production and delivery of therapeutic molecules at mucosal surfaces. *J Biotechnol* 168:120–129. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.04.019>
24. Miyoshi A, Jamet E, Commissaire J et al (2004) A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* 239:205–212. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.08.018>
25. Guimaraes V, Innocentin S, Chatel JM et al (2009) A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. *Genet Vaccines Ther* 7:1–7. <https://doi.org/10.1186/1479-0556-7-4>
26. Mancha-Agresti P, Drumond MM, Carmo FLR, do, et al (2017) A new broad range plasmid for DNA delivery in eukaryotic cells using lactic acid bacteria: in vitro and in vivo assays. *Mol Ther - Methods Clin Dev* 4:83–91. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2016.12.005>
27. Barroso FAL, de Jesus LCL, de Castro CP 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* 9:1–27. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010107>
28. Saraiva M, O'Garra A (2010) The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 10:170–181. <https://doi.org/10.1038/nri2711>
29. Rutz S, Ouyang W (2016) Regulation of interleukin-10 expression. *Adv Exp Med Biol* 941:89–116. [https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_5)
30. Wang X, Wong K, Ouyang W, Rutz S (2019) Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028548>
31. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK et al (2011) Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 29:71–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>
32. Zurita-Turk M, del Carmen S, Santos ACG et al (2014) *Lactococcus lactis* carrying the pValac DNA expression vector coding for IL-10 reduces inflammation in a murine model of experimental colitis. *BMC Biotechnol* 14:1–11. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-73>
33. Del Carmen S, Rosique RM, Saraiva T et al (2014) Protective effects of lactococci strains delivering either IL-10 protein or cDNA in a TNBS-induced chronic colitis model. *J Clin Gastroenterol* 48:S12–S17. <https://doi.org/10.1097/mcg.0000000000000235>
34. Nouaille S, Ribeiro LA, Miyoshi A et al (2003) Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res* 2:102–111
35. Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Cortes-Perez NG et al (2003) Intranasal immunization with recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine interleukin-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production. *Infect Immun* 71:1887–1896. <https://doi.org/10.1128/iai.71.4.1887-1896.2003>
36. Alizadeh P, Ahmadpour E, Daryani A et al (2019) IL-17 and IL-22 elicited by a DNA vaccine encoding ROP13 associated with protection against *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice. *J Cell Physiol* 234:10782–10788. <https://doi.org/10.1002/jcp.27747>
37. Wu C, Yang G, Bermúdez-Humarán LG et al (2006) Immunomodulatory effects of IL-12 secreted by *Lactococcus lactis* on Th1/Th2 balance in ovalbumin (OVA)-induced asthma model mice. *Int Immunopharmacol* 6:610–615. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.09.010>
38. Ouyang W, O'Garra A (2019) IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation. *Immunity* 50:871–891. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>
39. Bedke T, Muscate F, Soukou S, et al (2019) Title: IL-10-producing T cells and their dual functions. *Semin Immunol* 44. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101335>
40. Neumann C, Scheffold A, Rutz S (2019) Functions and regulation of T cell-derived interleukin-10. *Semin Immunol* 44. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101344>
41. Schotte L, Steidler L, Vandekerckhove J, Remaut E (2000) Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*. *Enzyme Microb Technol* 27:761–765. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00297-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00297-0)
42. Martín R, Martín R, Chain F et al (2014) Effects in the use of a genetically engineered strain of *Lactococcus lactis* delivering in situ IL-10 as a therapy to treat low-grade colon inflammation. *Hum Vaccin Immunother* 10:1611–1621. <https://doi.org/10.4161/hv.28549>
43. Del Carmen S, Zurita-turk M, Alvarenga Lima F et al (2013) A novel interleukin-10 dna mucosal delivery system attenuates intestinal inflammation in a mouse model. *Eur J Inflamm* 11(3):641–654. <https://doi.org/10.1177/1721727X1301100308>
44. Zurita-Turk M, Mendes Souza B, Prósperi De Castro C et al (2020) Attenuation of intestinal inflammation in IL-10 deficient mice by a plasmid carrying *Lactococcus lactis* strain. *BMC Biotechnol* 20:1–12. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00631-0>
45. Bermúdez-Humarán LG, Motta JP, Aubry C et al (2015) Serine protease inhibitors protect better than IL-10 and TGF- $\beta$  anti-inflammatory cytokines against mouse colitis when delivered by recombinant lactococci. *Microb Cell Fact* 14:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0198-4>
46. Fedorak RN, Gangl A, Elson CO et al (2000) Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. *Gastroenterology* 119:1473–1482. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.20229>
47. Takiishi T, Korf H, Van Belle TL et al (2013) Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified *Lactococcus lactis* in mice. *Diabetes Technol Ther* 15:1717–1725. <https://doi.org/10.1089/dia.2013.1510>

48. Robert S, Gysemans C, Takiishi T et al (2014) Oral delivery of glutamic acid decarboxylase (GAD)-65 and IL10 by *Lactococcus lactis* reverses diabetes in recent-onset NOD mice. *Diabetes* 63:2876–2887. <https://doi.org/10.2337/db13-1236>
49. Frossard CP, Steidler L, Eigenmann PA (2007) Oral administration of an IL-10-secreting *Lactococcus lactis* strain prevents food-induced IgE sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 119:952–959. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.12.615>
50. Marinho FAVV, Pacifico LGGG, Miyoshi A et al (2010) An intranasal administration of *Lactococcus lactis* strains expressing recombinant interleukin-10 modulates acute allergic airway inflammation in a murine model. *Clin Exp Allergy* 40:1541–1551. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03502.x>
51. Keir ME, Yi T, Lu TT, Ghilardi N (2020) The role of IL-22 in intestinal health and disease. *J Exp Med* 217. <https://doi.org/10.1084/jem.20192195>
52. Sabihi M, Böttcher M, Pelczar P, Huber S (2020) Microbiota-dependent effects of IL-22. *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/cells9102205>
53. Wei HX, Wang B, Li B (2020) IL-10 and IL-22 in mucosal immunity: driving protection and pathology. *Front Immunol* 11:1315. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01315>
54. Mizoguchi A, Yano A, Himuro H et al (2018) Clinical importance of IL-22 cascade in IBD. *J Gastroenterol* 53:465–474. <https://doi.org/10.1007/s00535-017-1401-7>
55. Kidess E, Kleerebezem M, Brugman S (2021) Colonizing microbes, IL-10 and IL-22: keeping the peace at the mucosal surface. *Front Microbiol* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.729053>
56. Che Y, Su Z, Xia L (2020) Effects of IL-22 on cardiovascular diseases. *Int Immunopharmacol* 81. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106277>
57. Loera-Arias MJ, Villatoro-Hernández J, Parga-Castillo MA et al (2014) Secretion of biologically active human interleukin 22 (IL-22) by *Lactococcus lactis*. *Biotechnol Lett* 36:2489–2494. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1626-y>
58. Maëva M, Elodie B, Nathalie R, et al (2022) AhR/IL-22 pathway as new target for the treatment of post-infectious irritable bowel syndrome symptoms. *Gut Microbes* 14. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2022997>
59. Iwaszko M, Biały S, Bogunia-Kubik K (2021) Significance of interleukin (IL)-4 and IL-13 in inflammatory arthritis. *Cells* 10. <https://doi.org/10.3390/CELLS10113000>
60. Ho IC, Miaow SC (2016) Regulation of IL-4 expression in immunity and diseases. *Adv Exp Med Biol* 941:31–77. [https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_3)
61. Shi J, Song X, Traub B et al (2021) Involvement of IL-4, IL-13 and their receptors in pancreatic cancer. *Int J Mol Sci* 22:1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms22062998>
62. Preisser TM, Da Cunha VP, Santana MP, et al (2021) Recombinant *Lactococcus lactis* carrying IL-4 and IL-10 coding vectors protects against type 1 diabetes in NOD mice and attenuates insulinitis in the STZ-induced model. *J Diabetes Res*. <https://doi.org/10.1155/2021/6697319>
63. Papaccio G, Pisanti FA, Di MR et al (2002) Th1 and Th2 cytokines exert regulatory effects upon islet microvascular areas in the NOD mouse. *J Cell Biochem* 86:651–664. <https://doi.org/10.1002/jcb.10250>
64. Ukah TK, Cattin-Roy AN, Chen W et al (2017) On the role IL-4/IL-13 heteroreceptor plays in regulation of type 1 diabetes. *J Immunol* 199:894–902. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700410>
65. Hoving JC, Keeton R, Höft MA et al (2020) IL-4 receptor- $\alpha$  signalling of intestinal epithelial cells, smooth muscle cells, and macrophages plays a redundant role in oxazolone colitis. *Mediators Inflamm*. <https://doi.org/10.1155/2020/4361043>
66. Souza BM, Preisser TM, Pereira VB et al (2016) *Lactococcus lactis* carrying the pValac eukaryotic expression vector coding for IL-4 reduces chemically-induced intestinal inflammation by increasing the levels of IL-10-producing regulatory cells. *Microb Cell Fact* 15:1–18. <https://doi.org/10.1186/S12934-016-0548-x>
67. Abbas AK, Trotta E, Simeonov DR et al (2018) Revisiting IL-2: biology and therapeutic prospects. *Sci Immunol* 3. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat1482>
68. Spolski R, Li P, Leonard WJ (2018) Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *Nat Rev Immunol* 18:648–659. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0046-y>
69. Wrangle JM, Patterson A, Johnson CB et al (2018) IL-2 and Beyond in Cancer Immunotherapy 38. <https://doi.org/10.1089/jir.2017.0101>
70. Yang Y, Lundqvist A (2020) Immunomodulatory effects of IL-2 and IL-15; implications for cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)* 12:1–20. <https://doi.org/10.3390/cancers12123586>
71. Steidler L, Wells JM, Raeymaekers A et al (1995) Secretion of biologically active murine interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* 61:1627–1629. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.4.1627-1629.1995>
72. Fernández A, Rodríguez JM, Bongaerts RJ et al (2007) Nisin-controlled extracellular production of interleukin-2 in *Lactococcus lactis* strains, without the requirement for a signal peptide sequence. *Appl Environ Microbiol* 73:7781–7784. <https://doi.org/10.1128/aem.01247-07>
73. Steidler L, Robinson K, Chamberlain L et al (1998) Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect Immun* 66:3183–3189. <https://doi.org/10.1128/iai.66.7.3183-3189.1998>
74. Rezaei M, Khorasgani MR, Esfahani SHZ et al (2019) Production of *Brucella melitensis* Omp16 protein fused to the human interleukin 2 in *Lactococcus lactis* MG1363 toward developing a *Lactococcus*-based vaccine against brucellosis. *Can J Microbiol* 66(1):39–45. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0261>
75. Ävall-Jääskeläinen S, Palva A (2006) Secretion of biologically active porcine interleukin-2 by *Lactococcus lactis*. *Vet Microbiol* 115:278–283. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.02.007>
76. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T (2018) Interleukin (IL)-6 Immunotherapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10:a028456. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028456>
77. Hirano T (2021) IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int Immunol* 33:127–148. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa078>
78. Murakami M, Kamimura D, Hirano T (2019) Pleiotropy and specificity: insights from the interleukin 6 family of cytokines. *Immunity* 50:812–831. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.027>
79. Jones SA, Jenkins BJ (2018) Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol* 18:773–789. <https://doi.org/10.1038/S41577-018-0066-7>
80. Choy EH, De Benedetti F, Takeuchi T et al (2020) Translating IL-6 biology into effective treatments. *Nat Rev Rheumatol* 16:335–345. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0419-z>
81. Li HS, Piao DC, Jiang T et al (2015) Recombinant interleukin 6 with M cell-targeting moiety produced in *Lactococcus lactis* IL1403 as a potent mucosal adjuvant for peroral immunization. *Vaccine* 33:1959–1967. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.02.061>
82. Moschen AR, Tilg H, Raine T (2018) IL-12, IL-23 and IL-17 in IBD: immunobiology and therapeutic targeting. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16:185–196. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0084-8>

117. Burke JD, Young HA (2019) IFN- $\gamma$ : A cytokine at the right time, is in the right place. *Semin Immunol* 43:101280. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.05.002>
118. Kak G, Raza M, Tiwari BK (2018) Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ): exploring its implications in infectious diseases. *Biomol Concepts* 9:64–79. <https://doi.org/10.1515/BMC-2018-0007>
119. Rupa P, Monedero V, Wilkie BN (2008) Expression of bioactive porcine interferon-gamma by recombinant *Lactococcus lactis*. *Vet Microbiol* 129:197–202. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.010>
120. Mantovani A, Barajon I, Garlanda C (2018) IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. *Immunol Rev* 281:57–61. <https://doi.org/10.1111/IMR.12614>
121. Dinarello CA (2018) Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev* 281:8–27. <https://doi.org/10.1111/IMR.12621>
122. Dinarello CA (2019) The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 15:612–632. <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0277-8>
123. Zhang W, Borchering N, Kolb R (2020) IL-1 signaling in tumor microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 1240:1–23. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-38315-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38315-2_1)
124. Namai F, Shigemori S, Ogita T et al (2020) Microbial therapeutics for acute colitis based on genetically modified *Lactococcus lactis* hypersecreting IL-1Ra in mice. *Exp Mol Med* 52:1627–1636. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00507-5>
125. Abbate A, Toldo S, Marchetti C et al (2020) Interleukin-1 and the inflammasome as therapeutic targets in cardiovascular disease. *Circ Res* 1260–1280. <https://doi.org/10.1161/circresaha.120.315937>
126. Nanda JD, Ho TS, Satria RD, et al (2021) IL-18: The forgotten cytokine in dengue immunopathogenesis. *J Immunol Res* 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8214656>
127. Vecchié A, Bonaventura A, Toldo S et al (2021) IL-18 and infections: Is there a role for targeted therapies? *J Cell Physiol* 236:1638–1657. <https://doi.org/10.1002/JCP.30008>
128. Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H (2019) Interleukin-18 in health and disease. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20030649>
129. Mühl H, Bachmann M (2019) IL-18/IL-18BP and IL-22/IL-22BP: Two interrelated couples with therapeutic potential. *Cell Signal* 63. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109388>
- 94 130. Feizollahzadeh S, Khanahmad H, Rahimmanesh I et al (2016) Expression of biologically active murine interleukin-18 in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* 363:1–6. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw234>
- 95 131. Li X, Bechara R, Zhao J et al (2019) IL-17 receptor-based signaling and implications for disease. *Nat Immunol* 20:1594–1602. <https://doi.org/10.1038/S41590-019-0514-Y>
132. Bunte K, Beikler T (2019) Th17 cells and the IL-23/IL-17 axis in the pathogenesis of periodontitis and immune-mediated inflammatory diseases. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/IJMS20143394>
- 96 cytokine. *Front Microbiol* 10:1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03355>
97. Wang J, Tian M, Li W, Hao F (2019) Preventative delivery of IL-35 by *Lactococcus lactis* ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:7931–7941. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10094-9>
98. Maddaloni M, Kochetkova I, Hoffman C, Pascual DW (2018) Delivery of IL-35 by *Lactococcus lactis* ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *Front Immunol* 9:2691. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02691>
99. Sakkas LI, Mavropoulos A, Perricone C, Bogdanos DP (2018) IL-35: a new immunomodulator in autoimmune rheumatic <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.690783>
100. Tresse E, Riera-Ponsati L, Jaber E, et al (2021) IFN- $\beta$  rescues neurodegeneration by regulating mitochondrial fission via STAT5, PGAM5, and Drp1. *EMBO J* 40:e106868. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2020106868>
101. Zhuang Z, Wu ZG, Chen M, Wang PG (2008) Secretion of human interferon- $\beta$  1b by recombinant *Lactococcus lactis*. *Biotechnol Lett* 30:1819–1823. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9761-y>
102. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y (2020) Roles of IFN- $\gamma$  in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res* 8:1–16. <https://doi.org/10.1186/S40364-020-00228-X>
103. Gorczynski RM (2020) IL-17 Signaling in the tumor microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 1240:47–58. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-38315-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38315-2_4)
104. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL (2019) The IL-17 family of cytokines in health and disease. *Immunity* 50:892–906. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.021>
105. Bie Q, Jin C, Zhang B, Dong H (2017) IL-17B: a new area of study in the IL-17 family. *Mol Immunol* 90:50–56. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.07.004>
106. Brevi A, Cogrossi LL, Grazia G, et al (2020) Much more than IL-17A: cytokines of the IL-17 family between microbiota and cancer. *Front Immunol* 11. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.565470>
107. Zwicky P, Unger S, Becher B (2020) Targeting interleukin-17 in chronic inflammatory disease: a clinical perspective. *J Exp Med* 217. <https://doi.org/10.1084/JEM.20191123>
108. Taams LS, Steel KJA, Srenathan U et al (2018) IL-17 in the immunopathogenesis of spondyloarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 14:453–466. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0044-2>
109. Lahiri A, Bhowmick S, Sharif S, Mallick AI (2021) Pre-treatment with chicken IL-17A secreted by bioengineered LAB vector protects chicken embryo fibroblasts against Influenza Type A Virus (IAV) infection. *Mol Immunol* 140:106–119. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.10.003>
110. Berlec A, Ravnikar M, Strukelj B (2012) Lactic acid bacteria as oral delivery systems for biomolecules. *Pharmazie* 67:891–898. <https://doi.org/10.1691/ph.2012.1705>
111. Ferrary AM, Azevedo V, de Carvalho RDO (2022) Genetically modified lactic acid bacteria in food and beverages: Safety concerns for industry and clinical use. In: *Lactic Acid Bacteria in Food Biotechnology*. Elsevier Inc., pp 349–363. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89875-1.00003-1>
112. Mignon C, Sodoier R, Werle B (2015) Antibiotic-free selection in biotherapeutics: now and forever. *Pathog* 4:157–181. <https://doi.org/10.3390/pathogens4020157>
113. Steidler L, Hans W, Schotte L et al (2000) Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting IL-10. *Science* 289:1352–1355
114. Steidler L, Neiryck S, Huyghebaert N et al (2003) Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol* 21:785–789. <https://doi.org/10.1038/nbt840>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

## 11.2 REVISÃO SISTEMÁTICA: ANAEROBIC DIGESTION USING COCOA RESIDUES AS SUBSTRATE: SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS.

Esta revisão sistemática teve como objetivo analisar o potencial dos resíduos de cacau para conversão de energia utilizando digestão anaeróbica como forma de avaliar estratégias de otimização de rendimentos. Utilizou-se informações de artigos publicados sobre digestão anaeróbica de resíduos de cacau em periódicos. Na meta-análise, as estratégias de otimização não tiveram um impacto significativo nos rendimentos de metano. Em conclusão esta revisão possui uma relevância global para o setor de tratamento de resíduos e na busca por alternativas energéticas e sustentáveis.



Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

### Energy for Sustainable Development

journal homepage: [www.journals.elsevier.com/energy-for-sustainable-development](http://www.journals.elsevier.com/energy-for-sustainable-development)



## Anaerobic digestion using cocoa residues as substrate: Systematic review and meta-analysis



Joyce da Cruz Ferraz Dutra<sup>a</sup>, Marcelle Fonseca Passos<sup>b</sup>, Glen Jasper Yupanqui García<sup>c</sup>, Rosimeire Floripes Gomes<sup>a</sup>, Tomas Andrade Magalhães<sup>d</sup>, Andria dos Santos Freitas<sup>d</sup>, Juliana Guimaraes Laguna<sup>d</sup>, Francielly Moraes Rodrigues da Costa<sup>d</sup>, Tales Fernando da Silva<sup>d</sup>, Luciano Santos Rodrigues<sup>e</sup>, Monique Ferrary Américo<sup>d</sup>, Gabriela Munis Campos<sup>d</sup>, Gilberto Pereira<sup>f</sup>, Luciana Vandenbeghe<sup>f</sup>, Carlos Ricardo Soccol<sup>f</sup>, Aristóteles Góes-Neto<sup>a,c,d,g</sup>, Vasco Ariston de Carvalho Azevedo<sup>a,c,d</sup>

<sup>a</sup> Federal University of Minas Gerais, Institute of Biological Sciences, Microbiology Department, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Federal University of Pará—UFPA, Technological Development Group in Biopolymers and Biomaterials from the Amazon, Augusto Corrêa Street, Belém, Pará 66075-110, Brazil

<sup>c</sup> Federal University of Minas Gerais, Institute of Biological Sciences, Bioinformatics Department, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup> Federal University of Minas Gerais, Institute of Biological Sciences, Department of Genetics, Ecology and Evolution, Belo Horizonte (MG), Brazil, 31-270-901

<sup>e</sup> Federal University of Minas Gerais, Faculty of Veterinary, veterinary medicine department Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>f</sup> Bioprocess Engineering and Biotechnology Department, Universidade Federal de Paraná (UFPR), Curitiba, PR 81531-980, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Cocoa waste  
Anaerobic microorganisms  
Methane  
Biogas  
Bioenergy  
Theobroma cacao

### ABSTRACT




















This systematic review analyses the potential of cocoa residues for energy conversion using anaerobic digestion and evaluates strategies for optimizing methane production yields, retrieving information from papers published on anaerobic digestion of cocoa residues in journals indexed in Scopus, Web of Science, and PubMed databases. The articles were selected according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) method. The effects of operational and compositional variables were evaluated by multivariate (PCA) and bivariate (correlation) statistics. A total of twenty-two studies were selected for this systematic review, and five of them were considered for meta-analysis. This search evidenced a lack of studies on the anaerobic digestion of cocoa residues, leading to, for example, high heterogeneity in methane yields between studies (163 to 382 mL C<sub>214</sub> gVS<sup>-1</sup>). Operational and compositional conditions in the anaerobic digestion were comparable (statistically significant correlations), and anaerobic digestion was considered efficient in the treatment of cocoa residues. In the meta-analysis, optimizing strategies did not significantly affect methane yields. Nonetheless, pretreatment using organic solvents can lead to inhibitory effects on the process. Anaerobic co-digestion can be considered a satisfactory strategy depending on the origin of the co-substrate. In conclusion, this review has worldwide relevance for the waste treatment sector and regarding the search for sustainable energy alternatives. To the best of our knowledge, this study was the first one that used quantitative methods such as multivariate bivariate statistical approaches and meta-analysis to answer questions related to the energy conversion of cocoa residues using anaerobic digestion.

### 11.3 EFFECTIVE BIOCORROSIVE CONTROL IN OIL INDUSTRY FACILITIES: 16S rRNA GENE METABARCODING FOR MONITORING MICROBIAL COMMUNITIES IN PRODUCED WATER

Atualmente, a indústria de petróleo no Brasil apresenta uma grande demanda para o desenvolvimento de protocolos eficazes para monitorar a biocorrosão com métodos moleculares microbiológicos. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar as características físico-químicas das comunidades microbianas que ocorrem na água produzida e em culturas de enriquecimento em oleodutos da indústria do petróleo, bem como a detecção de microrganismos por meio de *metabarcoding*. Nossos resultados demonstraram que essa combinação pode ser um método mais eficiente quando comparado com o método de cultivo, pois é mais econômico para monitorar a corrosão influenciada microbiologicamente nas instalações da indústria do petróleo.

Open Access Article

#### Effective Biocorrosive Control in Oil Industry Facilities: 16S rRNA Gene Metabarcoding for Monitoring Microbial Communities in Produced Water

by  Joyce Dutra <sup>1,2</sup>  Glen Garcia <sup>3</sup>  Rosimeire Gomes <sup>1</sup>  Mariana Cardoso <sup>3</sup>,  
 Árley Côrtes <sup>2</sup>,  Tales Silva <sup>2</sup>,  Luís de Jesus <sup>2</sup>,  Luciano Rodrigues <sup>4</sup>,  
 Andria Freitas <sup>2</sup>,  Vinicius Waldow <sup>5</sup>,  Juliana Laguna <sup>2</sup>,  Gabriela Campos <sup>2</sup>,  
 Monique Américo <sup>2</sup>,  Rubens Akamine <sup>5</sup>,  Maira de Sousa <sup>5</sup>,  Claudia Groposo <sup>5</sup>,  
 Henrique Figueiredo <sup>4</sup>,  Vasco Azevedo <sup>1,2,3</sup> and  Aristóteles Góes-Neto <sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil

<sup>2</sup> Department of Genetics Ecology and Evolution, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil

<sup>3</sup> Departments of Bioinformatic, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil

<sup>4</sup> Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil

<sup>5</sup> Petrobras Research and Development Center (CENPES), Petrobras, Rio de Janeiro 21941-915, RJ, Brazil

\* Author to whom correspondence should be addressed.

*Microorganisms* **2023**, *11*(4), 846; <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040846>

Received: 28 January 2023 / Revised: 4 March 2023 / Accepted: 7 March 2023 / Published: 27 March 2023

(This article belongs to the Special Issue Petroleum Microbiology 2.0)

### 11.3 GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR 11 DELIVERED BY DAIRY *LACTOCOCCUS LACTIS* STRAINS MODULATES INFLAMMATION AND PREVENTS MUCOSAL DAMAGE IN A MICE MODEL OF INTESTINAL MUCOSITIS.

A mucosite é uma inflamação da mucosa gastrointestinal que afeta a qualidade de vida dos pacientes em tratamento utilizando quimioterápicos como o 5-Fluoruracil. Neste contexto o uso de cepas probióticas como vetores de entrega ou expressão de proteínas heterólogas vêm mostrando resultados promissores no tratamento da mucosite. Este estudo avaliou o efeito anti-inflamatório da proteína GDF11 administrada por cepas de *Lactococcus lactis* em um modelo murino de mucosite induzida pelo 5-FU. Os resultados demonstraram melhorias histopatológicas intestinais, redução da degeneração das células caliciformes e redução da infiltração de neutrófilos no tecido. Além disso, houve imunomodulação de marcadores inflamatórios. Esses achados sugerem que o uso de *L. lactis* recombinante poderia ser um potencial terapia gênica para a mucosite induzida pelo 5-FU.

ORIGINAL RESEARCH article

Front. Microbiol., 17 April 2023

Sec. Food Microbiology

Volume 14 - 2023 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1157544>

## Growth differentiation factor 11 delivered by dairy *Lactococcus lactis* strains modulates inflammation and prevents mucosal damage in a mice model of intestinal mucositis

 Monique Ferrary Américo<sup>1</sup>, 
  Andria dos Santos Freitas<sup>1</sup>, 
  Tales Fernando da Silva<sup>1,2</sup>,  
 Luís Cláudio Lima de Jesus<sup>1</sup>, 
  Fernanda Alvarenga Lima Barroso<sup>1</sup>, 
  Gabriela Munis Campos<sup>1</sup>,  
 Rhayane Cristina Viegas Santos<sup>1</sup>, 
  Gabriel Camargos Gomes<sup>1</sup>, 
  Rafael Assis<sup>1</sup>, 
  Ênio Ferreira<sup>3</sup>,  
 Pamela Mancha-Agresti<sup>4</sup>, 
  Juliana Guimarães Laguna<sup>4</sup>, 
  Jean-Marc Chatel<sup>5</sup>,  
 Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho<sup>1,6</sup> and 
  Vasco Azevedo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics, Ecology, and Evolution, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup> INRAE, Institut Agro Rennes-Angers, STLO, Rennes, France

<sup>3</sup> Department of General Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>4</sup> Federal Center for Technological Education of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>5</sup> INRAE, AgroParisTech, MICALIS, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France


<sup>6</sup> Department of Biochemistry and Biophysics, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

#### 11.4 SYNERGISTIC SYNBIOTIC CONTAINING FRUCTOOLIGOSACCHARIDES AND *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* CIDCA 133 ALLEVIATES CHEMOTHERAPY-INDUCED INTESTINAL MUCOSITIS IN MICE.

Probióticos, prebióticos e simbióticos têm sido investigados como abordagens terapêuticas alternativas contra a mucosite intestinal, devido às propriedades anti-inflamatórias e benefícios à saúde do hospedeiro. Estudos anteriores mostraram o potencial probiótico de *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 e do prebiótico fructooligosacarídeos (FOS) em aliviar os efeitos inflamatórios da mucosite intestinal induzida pelo 5-Fluoruracil de forma separada. Com base nesses efeitos, este trabalho buscou avaliar o potencial anti-inflamatório da formulação simbiótica contendo CIDCA 133 e FOS. Os dados deste estudo mostraram que esta formulação pode ser um tratamento adjuvante promissor para diminuir os danos inflamatórios causados pelo uso do 5-Fluoruracil.

Research | [Published: 27 June 2023](#)

### Synergistic synbiotic containing fructooligosaccharides and *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 alleviates chemotherapy-induced intestinal mucositis in mice

[Laísa Macedo Tavares](#), [Luís Cláudio Lima de Jesus](#), [Viviane Lima Batista](#), [Fernanda Alvarenga Lima Barroso](#), [Andria dos Santos Freitas](#), [Gabriela Munis Campos](#), [Monique Ferrary Américo](#), [Tales Fernando da Silva](#), [Nina Dias Coelho-Rocha](#), [Giovanna Angeli Belo](#), [Mariana Martins Drumond](#), [Pamela Mancha-Agresti](#), [Kátia Duarte Vital](#), [Simone Odília Antunes Fernandes](#), [Valbert Nascimento Cardoso](#), [Alexander Birbrair](#), [Enio Ferreira](#), [Flaviano Santos Martins](#), [Juliana Guimarães Laguna](#) & [Vasco Azevedo](#) 

[World Journal of Microbiology and Biotechnology](#) **39**, Article number: 235 (2023) | [Cite this article](#)

**123** Accesses | [Metrics](#)


## 11.5 LYOPHILIZED SYMBIOTIC MITIGATES MUCOSITIS INDUCED BY 5-FLUOROURACIL.

Tratamentos oncológicos que utilizam o quimioterápico 5-Fluoruracil podem causar um efeito adverso chamado mucosite intestinal, caracterizado por inflamação da mucosa, dor, diarreia e perda de peso. Neste estudo, foi desenvolvido um produto simbiótico liofilizado contendo leite desnatado com isolado de proteína do soro do leite, frutooligosacarídeos e fermentado com cepas probióticas, *Lactobacillus casei* BL23, *Lactiplantibacillus plantarum* B7 e *Lacticaseibacillus rhamnosus* B1. Alguns estudos relataram efeitos cicatrizantes promissores com o uso de cepas probióticas. O consumo dessa formulação simbiótica reduziu a inflamação no íleo dos animais causada pelo 5-Fluoruracil, demonstrando ser um tratamento adjuvante promissor para a mucosite intestinal.

[Home](#) > [World Journal of Microbiology and Biotechnology](#) > [Article](#)

Research | [Published: 27 June 2023](#)

### Synergistic synbiotic containing fructooligosaccharides and *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 alleviates chemotherapy-induced intestinal mucositis in mice

[Laísa Macedo Tavares](#), [Luís Cláudio Lima de Jesus](#), [Viviane Lima Batista](#), [Fernanda Alvarenga Lima Barroso](#), [Andria dos Santos Freitas](#), [Gabriela Munis Campos](#), [Monique Ferrary Américo](#), [Tales Fernando da Silva](#), [Nina Dias Coelho-Rocha](#), [Giovanna Angeli Belo](#), [Mariana Martins Drumond](#), [Pamela Mancha-Agresti](#), [Kátia Duarte Vital](#), [Simone Odília Antunes Fernandes](#), [Valbert Nascimento Cardoso](#), [Alexander Birbrair](#), [Enio Ferreira](#), [Flaviano Santos Martins](#), [Juliana Guimarães Laguna](#) & [Vasco Azevedo](#) 

[World Journal of Microbiology and Biotechnology](#) **39**, Article number: 235 (2023) | [Cite this article](#)

**123** Accesses | [Metrics](#)

## 12 CURRÍCULO LATTES

16/06/23, 11:34

Currículo Lattes


 Imprimir  
currículo


### Gabriela Munis Campos

 Endereço para acessar este CV: <https://lattes.cnpq.br/4838982170145190>

Última atualização do currículo em 16/06/2023

#### Resumo informado pelo autor

Estudante de Mestrado em Genética no Laboratório de Genética Celular e Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais trabalhando nas áreas de genética de microrganismos utilizando bactérias lácticas recombinantes como vetores de expressão de proteínas heterólogas, vacinas de DNA e biologia molecular. Graduada em Ciências Biológicas - Bacharelado pela Universidade Federal do Espírito Santo - campus Alegre (2020) onde obteve experiência nas áreas de ecotoxicologia, manejo de animais bioindicadores e filogenia do HIV.  
(Texto informado pelo autor)

#### Nome civil

Nome Gabriela Munis Campos

#### Dados pessoais

**Nome em citações bibliográficas** CAMPOS, G. M.; CAMPOS, GABRIELA MUNIS; CAMPOS, GABRIELA

**Sexo** Feminino

**Cor ou Raça** Branca

**Filiação** José Francisco Moraes Campos Júnior e Gisela Munis Custódio Campos

**Nascimento** 24/05/1997 - Muriaé/MG - Brasil

**Carteira de Identidade** 19031423 SSP - MG - 22/01/2020

**CPF** 136.569.466-63

**Endereço residencial** Rua Professor Manoel Casassanta  
Ouro Preto - Belo Horizonte  
31310590, MG - Brasil  
Telefone: 28 35528624  
Celular 28 999713289

**Endereço profissional** Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas  
Instituto de Ciências Biológicas, bloco Q, Laboratório de Genética Celular e Molecular de Microrganismos  
Pampulha - Belo Horizonte  
31270901, MG - Brasil  
Telefone: 28 35528624  
URL da home page: [igcm.icb.ufmg.br/site/](http://igcm.icb.ufmg.br/site/)

**Endereço eletrônico** E-mail para contato: [gabrielamunis24@gmail.com](mailto:gabrielamunis24@gmail.com)

#### Formação acadêmica/titulação

- 2021** Mestrado em Genética.  
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil  
Título: Avaliação bioterapêutica de *Lactocaseibacillus rhamnosus* L156.4 na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil  
Orientador: Vasco Ariston de Carvalho Azevedo   
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2016 - 2020** Graduação em Ciências Biológicas.  
Universidade Federal do Espírito Santo, UFES, Vitória, Brasil  
Título: Análises evolutivas de isolados brasileiros do HIV-1 carregando o subtipo A  
Orientador: Prof. Dr. Edson Oliveira Delatorre

#### Formação complementar

- 2022 - 2022** Curso de curta duração em Real-time PCR Techniques. (Carga horária: 5h).  
BIO-RAD, BIO-RAD, Estados Unidos
- 2022 - 2022** Curso de curta duração em Treinamento Online do Sistema de Bibliotecas da UFMG. (Carga horária: 4h).  
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
- 2021 - 2021** Extensão universitária em Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório. (Carga horária: 60h).  
Universidade de São Paulo - Instituto de Ciências Biomédicas, ICB - USP, Brasil  
Palavras-chave: Manejo de animais, Biotério

16/06/23, 11:34

Currículo Lattes

**2015 - 2015** Curso de curta duração em Introdução à Ornitologia de Campo. (Carga horária: 12h).  
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil

## Atuação profissional

1. Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

### Vínculo institucional

**2018 - 2020** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Projeto: Avaliação da qualidade de água na região do Caparaó Capixaba para delimitação de áreas prioritárias para investigação da exposição humana aos metais

**2017 - 2018** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação Científica (PÍVIC), Carga horária: 20, Regime: Dedicado  
Outras informações:  
Subprojeto: Avaliação histológica do cérebro de tilápia expostas ao agrotóxico 2,4D.

2. Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

### Vínculo institucional

**2021 - 2021** Vínculo: Estagiária, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 20, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Auxiliei nas atividades cotidianas de manutenção do laboratório assim como no projeto intitulado Avaliação do efeito probiótico de linhagens de *Lactococcus lactis* carregando vetor vacinal para produção da proteína HSP65 de *Mycobacterium leprae* em modelo murino de colite induzida por DSS.

### Projetos

#### Projetos de pesquisa

**2021 - 2021** Biogeoquímica, ecogenômica e ecotoxicologia em áreas com influência da foz do rio doce

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa  
Integrantes: Gabriela Munis Campos; Cristiane dos Santos Vergílio (Responsável)

**2020 - Atual** Abordagem integrada de combate à COVID-19: Desenvolvimento de formulações vacinais, avaliação de imunobiológicos e compostos imunomoduladores

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa  
Integrantes: Gabriela Munis Campos; AZEVEDO, VASCO (Responsável)

**2018 - 2019** Estudo de aspectos toxicológicos e efeitos da exposição ao mercúrio inorgânico em peixes

Descrição: Este estudo detém-se na caracterização anatômica da morfologia do encéfalo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), pois é notório o quanto a descrição macroscópica da morfologia dos tecidos e órgãos possibilita um entendimento maior no avanço das pesquisas relacionadas a essa temática.  
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa  
Alunos envolvidos: Graduação (3); Doutorado (2);  
Integrantes: Gabriela Munis Campos; Cristiane dos Santos Vergílio (Responsável); Tatiana da Silva Souza; Echily Sartori; Lucas Henrique Viana Costa

**2018 - 2019** Avaliação da qualidade de água na região do Caparaó capixaba para a delimitação de áreas prioritárias para investigação da exposição humana aos metais

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa  
Integrantes: Gabriela Munis Campos; Cristiane dos Santos Vergílio (Responsável)

**2017 - 2018** Efeitos Toxicológicos da Exposição aos Agrotóxicos Utilizados em Lavouras de Café do Caparaó Capixaba

Descrição: O presente estudo visa avaliar por meio da histologia de cérebro, os efeitos da exposição a um dos principais pesticidas utilizados na região do Caparaó Capixaba o 2,4D em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia).  
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa  
Alunos envolvidos: Graduação (2); Doutorado (1);  
Integrantes: Gabriela Munis Campos; Cristiane dos Santos Vergílio (Responsável); Viviane Tavares de Paula  
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo-FAPES/ES

## Áreas de atuação

1. Genética de Microorganismos
2. Genética
3. Biotecnologia
4. Biologia Molecular

## Idiomas

**Inglês** Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem  
**Português** Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

## Prêmios e títulos

- 2022** Best Microorganism Genetics Poster - 2nd Place, GeneTime Conference - UFMG  
**2022** Best Oral Presentation - 1st Place, GeneTime Conference - UFMG  
**2020** Menção Honrosa - VI Semana de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo (Campus Alegre)

## Produção

## Produção bibliográfica

## Artigos completos publicados em periódicos

1. [doi](#) DA CRUZ FERRAZ DUTRA, JOYCE; PASSOS, MARCELE FONSECA; GARCÍA, GLEN JASPER YUPANQUI; GOMES, ROSIMEIRE FLORIPES; MAGALHÃES, TOMAS ANDRADE; DOS SANTOS FREITAS, ANDRIA; LAGUNA, JULIANA GUIMARÃES; DA COSTA, FRANCIELLY MORAIS RODRIGUES; DA SILVA, TALEF FERNANDO; RODRIGUES, LUCIANO SANTOS; AMÉRICO, MONIQUE FERRARY; CAMPOS, GABRIELA MUNIS; PEREIRA, GILBERTO; VANDENBEGHE, LUCIANA; SOCCOL, CARLOS RICARDO; GOES-NETO, ARISTÓTELES; DE CARVALHO AZEVEDO, VASCO ARISTON Anaerobic digestion using cocoa residues as substrate: Systematic review and meta-analysis. *Energy for Sustainable Development*. [iCER](#), v.72, p.265 - 277, 2023. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1016/j.esd.2022.12.007](https://doi.org/10.1016/j.esd.2022.12.007)
2. [doi](#) DUTRA, JOYCE; GARCÍA, GLEN; GOMES, ROSIMEIRE; CARDOSO, MARIANA; CÔRTEZ, ÁRLEY; SILVA, TALEF; DE JESUS, LUÍS; RODRIGUES, LUCIANO; FREITAS, ANDRIA; WALDOW, VINÍCIUS; LAGUNA, JULIANA; CAMPOS, GABRIELA; AMÉRICO, MONIQUE; AKAMINE, RUBENS; DE SOUSA, MAÍRA; GROPOSO, CLAUDIA; FIGUEIREDO, HENRIQUE; AZEVEDO, VASCO; GOES-NETO, ARISTÓTELES Effective Bioerosive Control in Oil Industry Facilities: 16S rRNA Gene Metabarcoding for Monitoring Microbial Communities in Produced Water. *Microorganisms*. [iCER](#), v.11, p.846 - , 2023. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.3390/microorganisms11040846](https://doi.org/10.3390/microorganisms11040846)
3. [doi](#) AMÉRICO, MONIQUE FERRARY; FREITAS, ANDRIA DOS SANTOS; DA SILVA, TALEF FERNANDO; DE JESUS, LUÍS CLÁUDIO LIMA; BARROSO, FERNANDA ALVARENGA LIMA; CAMPOS, GABRIELA MUNIS; SANTOS, RAYANE CRISTINA VIEGAS; GOMES, GABRIEL CAMARGOS; ASSIS, RAFAEL; FERREIRA, ÊNIO; MANCHA-AGRESTI, PAMELA; LAGUNA, JULIANA GUIMARÃES; CHATEL, JEAN-MARC; CARVALHO, RODRIGO DIAS DE OLIVEIRA; AZEVEDO, VASCO Growth differentiation factor 11 delivered by dairy Lactococcus lactis strains modulates inflammation and prevents mucosal damage in a mice model of intestinal mucositis. *Frontiers in Microbiology*. [iCER](#), v.14, p.1 - , 2023. Referências adicionais: Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.3389/fmicb.2023.1157544](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1157544)
4. [doi](#) CAMPOS, GABRIELA MUNIS; AMÉRICO, MONIQUE FERRARY; DOS SANTOS FREITAS, ANDRIA; BARROSO, FERNANDA ALVARENGA LIMA; DA CRUZ FERRAZ DUTRA, JOYCE; QUARESMA, LUDMILA SILVA; CORDEIRO, BÁRBARA FERNANDES; LAGUNA, JULIANA GUIMARÃES; DE JESUS, LUÍS CLÁUDIO LIMA; FONTES, APARECIDA MARIA; BIRBRAIR, ALEXANDER; SANTOS, TULIO MARCOS; AZEVEDO, VASCO Lactococcus lactis as an Interleukin Delivery System for Prophylaxis and Treatment of Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. [iCER](#), v.1, p.1 - 1, 2023. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1007/s12602-023-10041-1](https://doi.org/10.1007/s12602-023-10041-1)
5. [doi](#) SAVASSI, BRUNA; CORDEIRO, BÁRBARA F.; SILVA, SARA H.; OLIVEIRA, EMILIANO R.; BELO, GIOVANNA; FIGUEIROA, ALESSANDRA GOMES; ALVES QUEIROZ, MARIA IZABEL; FARIA, ANA MARIA CAETANO; ALVES, JULIANA; SILVA, TALEF FERNANDO DA; CAMPOS, GABRIELA MUNIS; ESNERINO, ERICK A.; ROCHA, RAYAN S.; FREITAS, MONICA Q.; SILVA, MARCIA C.; CRUZ, ADRIANO G.; VITAL, KÁTIA DUARTE; FERNANDES, SIMONE O.A.; CARDOSO, VALBERT H.; ACURCIO, LEONARDO BORGES; JAN, GWÉNAEL; LE LOIR, YVES; GALA-GARCIA, ALFONSO; DO CARMO, FILLIPE LUIZ R.; AZEVEDO, VASCO Lyophilized Symbiotic Mitigates Mucositis Induced by 5-Fluorouracil. *Frontiers in Pharmacology*. [iCER](#), v.12, p.755871 - , 2021. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.3389/fphar.2021.755871](https://doi.org/10.3389/fphar.2021.755871)
6. [doi](#) VERGILIO, CRISTIANE DOS SANTOS; LACERDA, DIEGO; OLIVEIRA, BRAULIO CHERENE VAZ DE; SARTORI, ECHILY; CAMPOS, GABRIELA MUNIS; PEREIRA, ANINA LUIZA DE SOUZA; AGUIAR, DIEGO BORGES DE; SOUZA, TATIANA DA SILVA; ALMEIDA, MARCELO GOMES DE; THOMPSON, FABIANO; REZENDE, CARLOS EDUARDO DE Metal concentrations and biological effects from one of the largest mining disasters in the world (Bumadinho, Minas Gerais, Brazil). *Scientific Reports*. [iCER](#), v.10, p.5936 - , 2020. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

## Artigos aceitos para publicação

1. TAVARES, L. M.; DE JESUS, LUÍS; BATISTA, V. L.; BARROSO, F.; FREITAS, A.; CAMPOS, G. M.; AMÉRICO, M. F.; SILVA, TALEF; COELHO-ROCHA, N. D.; BELO, G. A.; DRUMOND, M. M.; MANCHA-AGRESTI, PAMELA; VITAL, KÁTIA DUARTE; FERNANDES, S. O. A.; CARDOSO, V. N.; FERREIRA, ÊNIO; MARTINS, F. S.; LAGUNA, JULIANA; AZEVEDO, VASCO Synergistic Symbiotic containing Fructooligosaccharides and Lactobacillus delbrueckii CIDCA 133 Alleviates Chemotherapy-induced Intestinal Mucositis in Mice. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CURRENT MICROBIOLOGY AND APPLIED SCIENCES*, 2023. Referências adicionais: Inglês.

## Capítulos de livros publicados

1. BARROSO, FERNANDA ALVARENGA LIMA; DE JESUS, LUÍS; DA SILVA, TALEF FERNANDO; FREITAS, A.; AMÉRICO, M. F.; FERNANDES, L. J. S.; ASSIS, R.; CAMPOS, GABRIELA MUNIS; CARVALHO, R.; SANTOS, TULIO MARCOS; LAGUNA, JULIANA; AZEVEDO, VASCO LAB as cell factories: A synthetic biology approach for plasmid DNA and recombinant protein production In: LAB as cell factories: A synthetic biology approach for plasmid DNA and recombinant protein production. 1 ed.USA: Elsevier, 2023, v.1, p. 1-385. Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso. ISBN: 9780323919296
2. JESUS, L. C. L.; SILVA, TALEF FERNANDO DA; ASSIS, R.; FREITAS, A.; AMÉRICO, M. F.; FERNANDES, L. J. S.; CAMPOS, G. M.; GOMES, G. C.; SANTOS, R. C. V.; CARVALHO, R. D. O.; BARH, D.; AZEVEDO, VASCO Lactic acid bacteria-based beverages in the promotion of gastrointestinal tract health In: Lactic acid bacteria-based beverages in the promotion of gastrointestinal tract health. 1, 2022, v.1, p. 373-385. Palavras-chave: Lactobacillus, gut microbiota, inflammatory diseases, biotechnology Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. ISBN: 9780128222, Home page: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012822236600008X>

## Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. PEREIRA, A. L. S.; CAMPOS, G. M.; SARTORI, E.; FERREIRA, C. D.; VERGILIO, C. S. Caracterização anatômica do cérebro de tilápia (*Oreochromis niloticus*) do sudoeste do estado do Espírito Santo In: XXII Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica, 2019. São José dos Campos. Anais do XXII Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica (XXII INIC), 2019. Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
2. CAMPOS, G. M.; VERGILIO, C. S. Caracterização anatômica do cérebro de tilápia (*Oreochromis niloticus*) do sudoeste do estado do Espírito Santo In: Jornada de Iniciação Científica da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), 2019, Alegre. Anais da Jornada de Iniciação Científica da UFES, Vitória: PRPPG, 2019. v.10. Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
3. CAMPOS, G. M.; VERGILIO, C. S. Avaliação histológica do cérebro de tilápias expostas ao agrotóxico 2,4-D In: Jornada de Iniciação

Científica da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), 2018, Alegre.  
**Anais da Jornada de Iniciação Científica da UFES**. Vitória: PRPPG, 2018. v.9.  
 Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. CAMPOS, G. M.; DELATORRE, E. O. Evidências de múltiplas introduções e expansão local dos CRFs 02\_AG e 45\_CPX no Brasil In: VI Semana de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (VI SECIBIO), 2020, Online. **Anais da VI Semana de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - VI SECIBIO**. CAUFES, 2020. v.1. p.1 - 90  
 Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
2. PEREIRA, A. L. S.; CAMPOS, G. M.; LACERDA, D.; OLIVEIRA, B. C. V.; REZENDE, C. E.; VERGILIO, C. S. Indicadores de diferentes níveis tróficos (algas e microcrustáceos) na avaliação da toxicidade da água após o rompimento da barragem de Brumadinho (MG) In: VI Semana de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (VI SECIBIO), 2020, Online. **Anais da VI Semana de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - VI SECIBIO**. CAUFES, 2020. v.1. p.1 - 90  
 Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

#### Apresentação de trabalho e palestra

1. SANTOS, R. C. V.; QUARESMA, L. S.; CAMPOS, GABRIELA MUNIS; GOMES, G. C.; AMERICO, M. F.; JESUS, L. C. L.; FREITAS, A.; LAGUNA, JULIANA GUIMARAES; AZEVEDO, VASCO **Cellular Viability of Lactococcus lactis NCDO2118 After Spray-Drying Technique Using Powder Skimmed Milk**, 2022. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)  
 Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Brazil; Cidade: Belo Horizonte; Evento: GeneTime Conference; Inst.promotora/financiadora: UFMG
2. SILVA, TALEF FERNANDO DA; ASSIS, R.; ABURJAILE, F.; SOUSA, T.; VIANA, M. V. C.; CARVALHO, R.; JESUS, L. C. L.; FREITAS, A.; AMERICO, M. F.; CAMPOS, G. M.; MENARD, O.; COCHET, M.; DUPONT, D.; JAN, G.; CHERBUY, C.; GUEDON, E.; AZEVEDO, VASCO **Genomic and probiotic traits of the commensal E. coli CEC15 strain**, 2022. (Seminário, Apresentação de Trabalho)  
 Palavras-chave: *Eschechia coli*, Extracellular vesicle, Immunomodulation, Probiotic, Anti-inflammatory, Intestinal mucositis  
 Áreas do conhecimento: Genética Molecular e de Microorganismos, Biotecnologia  
 Referências adicionais: França/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital; Local: France; Cidade: Rennes; Evento: Bactinflam; Inst.promotora/financiadora: INRAE STLO
3. AMÉRICO, MONIQUE FERRARY; FREITAS, A.; SILVA, TALEF FERNANDO DA; JESUS, L. C. L.; BARROSO, F.; CAMPOS, GABRIELA MUNIS; SANTOS, R. C. V.; GOMES, G. C.; LAGUNA, JULIANA GUIMARAES; AZEVEDO, VASCO **Growth differentiation factor 11 delivered by dairy Lactococcus lactis strains MG1363 and NCDO2118 as a promising tool for the treatment of intestinal mucositis**, 2022. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)  
 Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Brazil; Cidade: Belo Horizonte; Evento: GeneTime Conference; Inst.promotora/financiadora: UFMG
4. CAMPOS, GABRIELA MUNIS; SILVA, TALEF FERNANDO DA; GOMES, G. C.; SANTOS, R. C. V.; GOMES, T. A. M.; AZEVEDO, VASCO **HSP65 protein DNA vaccine and heterologous protein administration for the treatment of DSS-induced colitis**, 2022. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)  
 Referências adicionais: Brasil/Português. Home page: <https://genetimedivulgacao.wixsite.com/genetime>; Local: Brazil; Cidade: Belo Horizonte; Evento: GENETIME Conference; Inst.promotora/financiadora: UFMG
5. LAGUNA, JULIANA GUIMARAES; VASCONCELOS, O. A.; QUARESMA, L. S.; FREITAS, A.; BARROSO, F.; JESUS, L. C. L.; CAMPOS, GABRIELA MUNIS; AMERICO, M. F.; ASSIS, R.; SANTOS, R. C. V.; GOMES, G. C.; VITAL, K.; SOUZA, R.; SILVA, T. F.; FERREIRA, E.; FERNANDES, S. O. A.; AZEVEDO, VASCO **Lactococcus lactis NCDO2118 pExu:p62 Increases the Intestinal Integrity and Modulates the Inflammatory Responses in Murine Ulcerative Colitis Model DSS-Induced**, 2022. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)  
 Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Brazil; Cidade: Belo Horizonte; Evento: GENETIME Conference; Inst.promotora/financiadora: UFMG
6. PEREIRA, A. L. S.; CAMPOS, G. M.; SARTORI, E.; AGUIAR, DIEGO BORGES DE; LACERDA, D.; OLIVEIRA, B. C. V.; REZENDE, C. E. **Associação de indicadores químicos e biológicos na avaliação da toxicidade da água após o rompimento da barragem de Brumadinho (MG)**, 2021. (Congresso, Apresentação de Trabalho)  
 Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Cidade: Campinas; Evento: XVI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia – ECOTOX 2021,
7. CAMPOS, G. M.; DELATORRE, E. O. **Evidências de múltiplas introduções e expansão local dos CRFs 02\_AG e 45\_CPX no Brasil**, 2020. (Outra, Apresentação de Trabalho)  
 Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [https://biologia.alegre.ufes.br/sites/biologia.alegre.ufes.br/files/field/anejo/anais\\_vi\\_secibio\\_-\\_2020.pdf](https://biologia.alegre.ufes.br/sites/biologia.alegre.ufes.br/files/field/anejo/anais_vi_secibio_-_2020.pdf); Local: Online; Evento: VI Semana de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (VI SECIBIO); Inst.promotora/financiadora: UFES
8. PEREIRA, A. L. S.; CAMPOS, G. M.; LACERDA, D.; OLIVEIRA, B. C. V.; REZENDE, C. E.; VERGILIO, C. S. **Indicadores de diferentes níveis tróficos (algas e microcrustáceos) na avaliação da toxicidade da água após o rompimento da barragem de Brumadinho (MG)**, 2020. (Outra, Apresentação de Trabalho)  
 Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [https://biologia.alegre.ufes.br/sites/biologia.alegre.ufes.br/files/field/anejo/anais\\_vi\\_secibio\\_-\\_2020.pdf](https://biologia.alegre.ufes.br/sites/biologia.alegre.ufes.br/files/field/anejo/anais_vi_secibio_-_2020.pdf); Local: Online; Evento: VI Semana de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (VI SECIBIO); Inst.promotora/financiadora: UFES
9. PEREIRA, A. L. S.; CAMPOS, G. M.; SARTORI, E.; FERREIRA, C. D.; VERGILIO, C. S. **Caracterização anatômica do encéfalo de tilápia (*Oreochromis niloticus*) do sudoeste do estado do Espírito Santo**, 2019. (Outra, Apresentação de Trabalho)  
 Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC\\_2019/anais/indice\\_geral.html](http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2019/anais/indice_geral.html); Local: Univap; Cidade: São José dos Campos; Evento: XXIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica; Inst.promotora/financiadora: Univap

Educação e Popularização de C&T

#### Participação em eventos, congressos, exposições, feiras e olimpíadas

1. III Simpósio de Zoologia Sistemática, 2015. (Simpósio)

#### Eventos

**Participação em eventos**

1. I Ciclo de Debates COMFIC Convida: "Formação Docente: Currículos e Percursos Formativos – Qual perfil de professores/as a UFMG se propõe a formar?", 2023. (Encontro)
2. Aula Inaugural Pós-Graduação ICB UFMG, 2022. (Encontro)
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) GeneTime Conference, 2022. (Simpósio)  
HSP65 protein DNA vaccine and heterologous protein administration for the treatment of DSS-induced colitis.
4. International Associated Laboratoires Meeting - LIA 2022 BACT-INFLAM: CLOSING SEMINARS, 2022. (Encontro)
5. Primeiro Congresso de Biólogos da 4ª Região, 2022. (Congresso)
6. Curso de Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório - USP, 2021. (Outra)
7. VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM 2021, 2021. (Simpósio)
8. Curso de Férias - IOC 2020 Introdução a Bioinformática e Biologia Estrutural, 2020. (Outra)
9. Apresentação Oral no(a) VI Semana de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (VI SECIBIO), 2020. (Outra)  
EVIDÊNCIAS DE MÚLTIPLAS INTRODUÇÕES E EXPANSÃO LOCAL DOS CRFS 02\_AG E 45\_CPX NO BRASIL.
10. Escola de Verão em Toxicologia, 2018. (Outra)
11. Apresentação de Poster / Painel no(a) V Semana de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (V SECIBIO), 2018. (Simpósio)  
AVALIAÇÃO DA TOXIDADE PRELIMINAR DO AGROTÓXICO 2,4D EM DAPHNIA SIMILIS.
12. I Simpósio de Ciências Forenses da Região Sudeste, 2017. (Simpósio)
13. III Simpósio de Zoologia Sistemática, 2015. (Simpósio)

**Organização de evento**

1. CAMPOS, G. M.  
Café com Bio, 2018. (Outro, Organização de evento)  
*Referências adicionais: Brasil/Espanhol. Meio de divulgação: Meio digital*
2. CAMPOS, G. M.  
Semana de Ciências Biológicas, 2018. (Outro, Organização de evento)  
*Áreas do conhecimento: Biologia Geral*  
*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro*
3. CAMPOS, G. M.  
Mostra de Profissões, 2016. (Outro, Organização de evento)  
*Referências adicionais: Brasil/Bretão.*

**Totais de produção****Produção bibliográfica**

Artigos completos publicados em periódico	6
Artigos aceitos para publicação	1
Capítulos de livros publicados	2
Trabalhos publicados em anais de eventos	5
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra)	1
Apresentações de trabalhos (Congresso)	1
Apresentações de trabalhos (Seminário)	1
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	3
Apresentações de trabalhos (Outra)	3

**Eventos**

Participações em eventos (congresso)	1
Participações em eventos (simpósio)	5
Participações em eventos (encontro)	3
Participações em eventos (outra)	4
Organização de evento (outro)	3