

MARCELLA LOBATO DIAS CONSOLI

**IMPACTO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE**  
*Saccharomyces boulardii* **NA IMUNOMODULAÇÃO E**  
**RECUPERAÇÃO DE PACIENTES SUBMETIDOS A**  
**RESSECÇÃO CÓLICA**

Faculdade de Medicina da UFMG

Belo Horizonte, MG

2013

MARCELLA LOBATO DIAS CONSOLI

**IMPACTO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE  
*Saccharomyces boulardii* NA IMUNOMODULAÇÃO E  
RECUPERAÇÃO DE PACIENTES SUBMETIDOS A  
RESSECÇÃO CÓLICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia.

Orientador: Maria Isabel Toulson Davisson  
Correia

Coorientador: Jacques Robert Nicoli

Faculdade de Medicina da UFMG

Belo Horizonte, MG

2013

Marcella Lobato Dias Consoli  
(candidata ao Doutorado)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Toulson Davisson Correia  
(Orientadora)

Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli  
(Coorientador)

Área de concentração do CGP  
Resposta inflamatória à agressão tecidual

Linha de pesquisa  
Repercussões metabólicas da obesidade e seu tratamento

Área de Conhecimento (CNPq/CAPES)

4. Ciências da Saúde. 4.05.00.00-4 – Nutrição; 4.05.03.00-3 – Análise Nutricional de População; 4.05.02.00-7 – Dietética; 4.05.01.00-0 – Bioquímica da Nutrição; 4.01.02.00-9 – Cirurgia.

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

### **REITOR**

Prof. Dr. Clélio Campolina

### **VICE-REITORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rocksane de Carvalho Norton

### **PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

### **PRÓ-REITOR DE PESQUISA**

Prof. Dr. Renato de Lima dos Santos

### **DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA**

Prof. Dr. Francisco José Penna

### **VICE-DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA**

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

### **COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

### **CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA DA FACULDADE DE MEDICINA**

Prof. Dr. Marcelo Eller Miranda

### **COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA**

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches (coordenador)

Prof. Dra. Ivana Duval Araújo (subcoordenadora)

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Marco Aurélio Lana Peixoto

Sumara Marques Barral (representante discente)

## Ficha catalográfica

A minha filha, Helena,  
luz que veio iluminar nossas vidas.

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Maria Isabel Toulson Davisson Correia, minha orientadora, por seguir incansável em mais esta etapa ao meu lado, por estar sempre pronta a me atender, discutir e ajudar e, por incentivar e apoiar minhas escolhas pessoais, meus sinceros agradecimentos;

Ao prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, pela coorientação da pesquisa, por abrir as portas do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos para o meu trabalho, pela ajuda irrestrita à sua execução, em termos de apoio científico, insumos e recursos financeiros, pelo exemplo de pessoa e pesquisador e pela disponibilidade e convívio agradável;

Ao prof. Dr. Oscar Bruña Romero, pela colaboração ao longo de todo o trabalho e pelos valiosos ensinamentos;

Ao serviço de coloproctologia do Hospital das Clínicas da UFMG, em especial aos professores Dr. Rodrigo Gomes da Silva, Dra. Magda Maria Profeta da Luz e Dr. Antônio Lacerda Filho pela disponibilidade e apoio ao longo desses quatro anos;

Aos médicos residentes Cristiane de Souza Bechara, Kelly Cristine de Lacerda Rodrigues Buzatti, Ana Carolina Parussolo André, Augusto Motta Neiva e Vinícius Rodrigues Taranto Nunes pelo convívio no ambulatório de coloproctologia e no centro cirúrgico e, pela ajuda na captação dos pacientes;

A profa. Maria Rosa Quaresma Bomfim, profissional competente e pessoa iluminada que tive o prazer de conhecer no início deste trabalho, por me apresentar ao mundo da biologia molecular, pela paciência e apoio constantes;

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia, pela contribuição em minha formação científica;

A todos os pacientes que participaram deste trabalho, sem os quais nada disso seria possível;

Aos meus pais, Romero Silva Dias e Káthia M<sup>a</sup> de Aguiar Lobato e irmãos Gustavo Lobato Dias e Fernanda Lobato Dias pelo apoio incondicional. Ao meu marido, Renato, por vencer mais esta etapa ao meu lado, pelo apoio constante e irrestrito em meu trabalho, em casa e nos cuidados com nossa filha;

Às companheiras de doutorado Livia Garcia Ferreira, Lucilene Rezende Anastácio e Mariane Curado Borges pelas discussões e, por contribuírem com críticas e sugestões, além da conversa amiga de sempre;

Ao Raphael Steinberg da Silva, pela amizade e ajuda nas discussões sobre PCR em tempo real, além da convivência agradável e divertida que tornaram meus dias no laboratório mais produtivos;

Aos colegas do LEFM, Ariane Martins, Sílvia Crispim, Fabiana, Samir Elian, Karla Joseane, Mario Abatemarco, Karine Rodrigues e Bianca Seridan pela convivência diária. Em especial à Tássia Costa Souza, pessoa querida que tive o prazer de conhecer ao longo do trabalho no LEFM e por quem tenho grande carinho;

Às amigas Beatriz Diniz Gabriel e Débora Bohnen Guimarães, companheiras de profissão que sempre me apoiaram e incentivaram ao longo de toda essa jornada;

A Fundação de Amparo de Ensino à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo incentivo da bolsa e apoio financeiro;

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para conclusão deste trabalho;

E finalmente, a Deus, por me ajudar a vencer mais esse desafio e conviver com todas estas pessoas especiais!

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	11
LISTA DE FIGURAS .....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS / LIST OF ABBREVIATIONS AND ACRONYMS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT .....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVO .....	18
Objetivos específicos .....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
Microbiota intestinal .....	19
Composição .....	19
Nichos de colonização no trato gastrointestinal .....	20
Funções do ecossistema microbiano .....	20
Desequilíbrio da microbiota e complicações.....	21
Probióticos .....	23
Saccharomyces boulardii .....	25
4. MÉTODOS.....	27
Pacientes e instituições participantes .....	27
Execução do estudo .....	27
Coleta da amostra.....	28
Extração de RNA e transcrição reversa.....	29
Padronização da quantificação relativa da expressão de citocinas em mucosa de cólon de seres humanos usando RT-qPCR .....	30
Quantificação relativa da expressão de citocinas em mucosa de cólon de seres humanos usando RT-qPCR .....	32
Análise estatística .....	32
5. RESULTADOS.....	34
6. CONCLUSÃO .....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	51

APÊNDICE B - FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS.....	53
<b>FICHA DE IDENTIFICAÇÃO</b> .....	53
<b>FICHA LABORATORIAL</b> .....	54
ANEXO A - PARECER ÉTICO - ETIC 0391.0.203.000-09.....	55
ANEXO B - SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	56
ANEXO C - ATA DA DEFESA.....	57
ANEXO D- DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO.....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos conjuntos de <i>primers</i> (5' → 3') empregados nas reações de amplificação.....	30
Tabela 2: Demographic and clinical data for included patients in the control and probiotic groups.....	36
Tabela 3: Length of hospital stay and postoperative complications.....	39

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A microbiota intestinal natural do hospedeiro modula a resposta imunológica durante os processos de saúde e doença.....	22
Figura 2: Curvas de amplificação, dissociação e de diluição para o gene IL10 de amostras de mucosa de cólon de pacientes submetidos a ressecção cólica.....	31
Figura 3: Flowchart of the randomization procedure that was used to enroll patients in the study. ....	36
Figura 4: Gene expression levels of cytokines IL10, IL1B, IL23A, TNF, IL12B, INFG and IL17A in samples of colorectal cancer-free mucosa that were derived from patients who underwent surgical resection. Patients in the probiotic group (n=15) were given <i>Saccharomyces boulardii</i> at least 7 days before the operation; patients in the control group (n=18) received conventional treatment with no probiotic supplementation. Relative quantification was performed with the method developed by Hellemans et al. (46). The results are expressed in relation to the control group, which is expressed as level 1x. */ ** = Different number of asterisk were significantly different (P < 0.05). ....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS / LIST OF ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

ACT- $\beta$ -actina	ACT- $\beta$ -actin
AGCC - ácidos graxos de cadeia curta	SCFA - short chain fatty acids
cDNA* - DNA complementar	cDNA - complementary DNA
FAO/WHO* - Organização para alimentação e agricultura/Organização mundial da saúde	FAO/WHO - Food and Agriculture Organization / World Health Organization
GAPDH - gliceraldeído - 3-fosfato - desidrogenase	GAPDH - Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase
IL - Interleucina	IL - interleukin
I $\kappa$ B - Inibidor Kappa B	I $\kappa$ B - Inibitory Kappa B
INFG - Interferon gama	INFG - Interferon gamma
IL1B - interleucina 1 beta	IL1B - interleukin 1 beta
IL23A - interleucina 23 subunidade p19	IL23A - Interleukin 23 p19 subunit
IL12B - interleucina 12 subunidade p40	IL12B - Interleukin 12 p40 subunit
IL17A - interleucina 17 subunidade A	IL17 - Interleukin 17 A subunit
IgA- Imunoglobulina A	IgA - A immunoglobulin
LPS - lipopolissacarídeo	LPS - lipopolysaccharide
NF- $\kappa$ B - Fator de transição nuclear Kappa B	NF- $\kappa$ B - Nuclear factor kappa B
PCR - Reação em cadeia de polimerase	PCR - polymerase chain reaction
PPAR-gama - Receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama	PPAR-gama - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RNA <sub>m</sub> - RNA mensageiro	mRNA - messenger RNA
RNA - ácido ribonucléico	RNA - ribonucleic acid
RT-qPCR - Reação em cadeia de polimerase em tempo real	RT-qPCR - Real time quantitative polymerase chain reaction
<i>S. boulardii</i> - <i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>S. boulardii</i> - <i>Saccharomyces boulardii</i>
SPSS <sup>†</sup> : Pacote Estatístico para Ciências Sociais	SPSS: Statistical Package for Social Science
TNF - fator de necrose tumoral alfa	TNF - tumour necrosis factor alpha
UFC - Unidades formadoras de colônia	CFU - Colony forming unit

\* A abreviatura na língua inglesa foi mantida devido ao uso na língua portuguesa

## RESUMO

Probióticos, microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas fornecem benefícios à saúde do hospedeiro, têm sido utilizados em humanos por muitos anos. No entanto, os mecanismos pelos quais os probióticos exercem o efeito protetor ainda não estão totalmente esclarecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da administração oral pré-operatória de *Saccharomyces boulardii* sobre a expressão gênica das seguintes citocinas: IL10, IL1B, IL23A, TNF, IL12B, INFG, IL17A, na mucosa intestinal de pacientes submetidos a ressecção cólica. Avaliaram-se também as complicações pós-operatórias. Trinta e três pacientes submetidos a ressecções cólicas foram divididos aleatoriamente em dois grupos: (1) grupo controle (n=18): recebeu tratamento convencional sem interferências e sem uso de suplementação com probióticos e (2) grupo probiótico (n=15): recebeu, diariamente, uma cápsula de probiótico, contendo 100mg ( $0,5 \times 10^9$  UFC/g) da levedura *Saccharomyces boulardii*, durante sete dias antes da operação. Entre os pacientes que usaram probióticos, a expressão gênica das citocinas IL1B, IL10 and IL23A na mucosa foi significativamente menor que na mucosa do grupo controle ( $P=0.001$ ;  $P=0,04$  and  $P=0,03$ , respectivamente). No entanto, os níveis de RNAm de IL12B, INFG, IL17A and TNF mRNA não alcançaram diferença estatística entre os grupos ( $P>0,05$ ). A incidência de complicações infecciosas foi 13.3% e 38.8% no grupo probiótico e no grupo controle ( $P>0.05$ ). A mortalidade peroperatória foi 0% em ambos os grupos. O tempo médio de internação não foi diferente entre os grupos ( $P>0,05$ ). Esse estudo demonstrou que o tratamento com *Saccharomyces boulardii* foi capaz de modular a resposta imunológica local reduzindo os níveis citocinas pro e antiinflamatórias na mucosa intestinal.

**Descritores:** Probióticos; câncer colorretal, complicações infecciosas; resposta imunológica; translocação bacteriana, operação gastrointestinal.

## ABSTRACT

Probiotics, live microorganisms that confer health benefits to the host when administered in adequate amounts, have been used in humans for many years. Even though many potential health benefits seem to be associated with the use of probiotics, the mechanisms by which these living organisms exert their effects remain unclear. The objective of the current study was to determine the effects of pre-operative administration of probiotics on mRNA expression levels of the following cytokines: IL10, IL1B, IL23A, TNF, IL12B, INFG, IL17A in patients undergoing colorectal surgery. Postoperative infections were also assessed. Thirty three patients undergoing colorectal resection were randomly assigned to 7-day preoperative probiotics (probiotic group, n=15) or conventional (control group, n=18) treatment. Patients who received the probiotic presented with significantly lower mucosa IL1B, IL10 and IL23A mRNA expression than the control group ( $P=0.001$ ;  $P=0,04$  and  $P=0,03$ , respectively). However, IL12B, INFG, IL17A and TNF mRNA expressions did not differ between the two groups ( $P>0,05$ ). The incidence of postoperative infectious complications was 13.3% and 38.8% in probiotic and control groups, respectively ( $P>0.05$ ). There was no perioperative mortality in both groups. The median total length of hospital stay was similar between the groups ( $P>0,05$ ). This study has shown that probiotic treatment with *Saccharomyces boulardii* can locally downregulate both pro- and anti-inflammatory cytokines, in the intestinal mucosa.

**Keywords:** Probiotics; colorectal cancer; postoperative infections; immune function; bacterial translocation; gastrointestinal surgery.

## 1. INTRODUÇÃO

Probióticos representam boa estratégia para se alcançarem modificações controladas no ecossistema intestinal. A interação benéfica entre mucosa intestinal e microbiota nativa é conceito comprovado cientificamente (1-5). Qualquer alteração em fatores endógenos (mecanismos de controle do hospedeiro importantes para manter a homeostase) ou exógenos (composição da microbiota durante o processo de colonização ou na fase adulta) pode causar distúrbios agudos ou crônicos. Mudanças na microbiota podem ser identificadas pelo sistema imunológico da mucosa intestinal e levar a alterações nas respostas inflamatória e imunológica específica e não específica, deixando o hospedeiro susceptível à colonização por patógenos (5). Portanto, esforços em criar novas terapias com o objetivo de restabelecer o equilíbrio após qualquer agressão, tal como procedimentos cirúrgicos ou tratamento com antimicrobianos, por meio de modificação da microbiota intestinal, vêm sendo buscados.

Resultados de estudos com probióticos em modelos animais e humanos têm mostrado o potencial benefício desses contra várias doenças. O uso de probióticos: reduz o risco de diarreia e a duração da mesma em crianças e adultos (6-7); é capaz de inibir a colonização do *H. pylori* no trato gastrointestinal e reduzir os efeitos colaterais da terapia padrão contra essa bactéria (8-9); minimiza a intolerância a lactose (10); tem ação benéfica na manutenção de remissão clínica de doenças como colite ulcerativa e doença de Crohn (6-7); e tem mostrado resultados positivos na diminuição de lesões precursoras de câncer colorretal (11).

No entanto, os mecanismos pelos quais os probióticos exercem o efeito protetor ainda não estão totalmente esclarecidos (6, 12). A imunomodulação, ou seja, a modulação da resposta inflamatória a partir da regulação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (13-14) é um dos prováveis mecanismos de ação. Estudos *in vitro* e em modelos animais mostraram que os probióticos são capazes de inibir a ativação do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (15), aumentar a atividade das células *natural killer* (16), induzir a secreção de citocinas que contribuem para a maturação das células dendríticas (16) e induzir a secreção de imunoglobulina A (IgAs) (17). Porém, estudos clínicos investigando a interação *in*

*vivo* entre administração de probióticos e modulação do sistema imunológico estão em fase inicial.

Elucidar os mecanismos pelos quais os probióticos influenciam o sistema de defesa do hospedeiro é importante em todos os sentidos, em especial entre aqueles indivíduos submetidos a situações de estresse, como os pacientes cirúrgicos. Nos últimos anos, avanços na Medicina e em técnicas cirúrgicas diminuíram a incidência de complicações pós-operatórias. No entanto, as complicações de origem infecciosa continuam sendo fator que afeta a evolução de pacientes cirúrgicos (18). Enfermos submetidos a operações colorretais usualmente tem complicações infecciosas sustentadas por microbiota intestinal própria mais frequentemente do que após outros tipos de operação (19). Baseado nisso, manipular a microbiota intestinal parece ser uma alternativa em potencial para prevenir e tratar infecções, neste grupo de doentes.

## 2. OBJETIVO

Avaliar o impacto da administração oral de *Saccharomyces boulardii* na imunomodulação e recuperação de pacientes submetidos a ressecções cólicas.

### *Objetivos específicos*

1. Avaliar a imunomodulação dos pacientes resultante da administração oral de *Saccharomyces boulardii* pela determinação de citocinas de mucosa por RT-qPCR.

2. Avaliar o grau de recuperação dos pacientes pela ocorrência de complicações pós-operatórias, principalmente complicações infecciosas, e pelo o tempo de permanência hospitalar, associado a administração oral de *Saccharomyces boulardii*.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### Microbiota intestinal

##### *Composição*

O trato gastrointestinal de um humano adulto abriga grande diversidade de microrganismos composta por centenas de espécies que formam complexa biomassa (microbioma) de aproximadamente  $10^{14}$  células (6, 11). O peso total desses microrganismos é estimado em cerca de 1,5kg, e a atividade metabólica total é similar à do fígado (20). As populações microbianas vão aumentando e variando de acordo com alguns parâmetros de localização, à medida que se percorre o trato gastrointestinal.

O ambiente luminal do estômago humano possui níveis populacionais muito baixos, pois a acidez elevada e o esvaziamento frequente impedem a multiplicação de microrganismos. Já no intestino delgado, à medida que se percorre essa porção anatômica, as populações bacterianas totais vão aumentando e, inversão do tipo respiratório é observada (os anaeróbios facultativos inicialmente dominantes passam a ser subdominantes e o fenômeno inverso é notado para os anaeróbios estritos) (7). O íleo é sítio de transição bacteriológica, entre a escassa população bacteriana do jejuno e a densa microbiota do cólon. No cólon, as bactérias encontram condições favoráveis para proliferação devido à ausência de secreções intestinais, peristaltismo lento e abundante suprimento nutricional (2, 7).

Estima-se que o número de espécies bacterianas presentes no TGI seja em torno de 500, embora estudos mais recentes indiquem que somente entre 30 e 40 destas espécies conseguem atingir níveis dominantes, desempenhando funções para o hospedeiro (21-22). Entre os dominantes prevalecem os gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Ruminococcus* (3, 6, 21).

### *Nichos de colonização no trato gastrointestinal*

Os componentes da microbiota intestinal podem colonizar locais diferentes no trato gastrointestinal. Particularmente no intestino grosso, onde são encontradas as maiores populações, é possível colonizar o lúmen, o muco e as criptas intestinais.

No lúmen cólico, o potencial de óxido-redução é muito baixo, o que permite crescimento de bactérias anaeróbias estritas extremamente sensíveis ao oxigênio. A razão de bactérias anaeróbias estritas/anaeróbias facultativas no lúmen é de 10 a 1.000 para um. Nesse ecossistema, os substratos não digeríveis remanescentes da dieta do hospedeiro como celulose, pectina, amilose, amilopectina e aditivos alimentares são a fonte de nutrientes desses microrganismos.

Recobrando a superfície do epitélio intestinal há o muco, no qual habitam bactérias anaeróbias estritas, sensíveis ao oxigênio que usam a mucina como suporte físico e nutricional.

Finalmente, há a microbiota presente nas criptas que utiliza células mortas descamadas do epitélio e as diversas secreções do hospedeiro como fonte nutricional. As populações presentes são mais aerotolerantes devido à difusão do oxigênio proveniente dos vasos sanguíneos subjacentes.

### *Funções do ecossistema microbiano*

O entendimento da complexa interação entre microbiota intestinal e a biologia do hospedeiro na qual está inserida só foi reconhecido há algumas dezenas de anos. Didaticamente, essa interação pode ser dividida em três níveis: (1) no lúmen intestinal; (2) no epitélio intestinal e (3) no sistema imunológico.

No lúmen (nível 1) a microbiota intestinal é capaz de fermentar carboidratos não digeríveis e proteínas da dieta que alcançam o cólon e, com isso, produzir ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que servem de fonte de energia para as células do epitélio intestinal (butirato), do fígado (propionato) e do resto do compartimento interno (acetato). Estes ácidos também exercem efeito protetor por inibição de bactérias patogênicas, uma vez que, diminuem o pH da luz intestinal. Esses ácidos quando absorvidos carregam junto sódio e água (3, 22-23). Na luz intestinal, a microbiota produz outras substâncias antagonistas de

patógenos como as bacteriocinas. Além disso, a microbiota sintetiza vitaminas como vitamina K, B<sub>12</sub>, folato, biotina e riboflavina (3, 7).

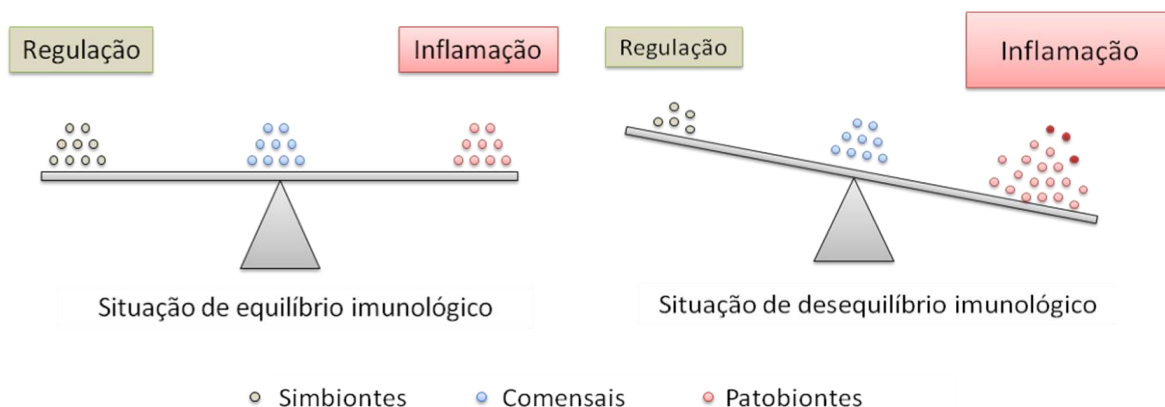
O epitélio intestinal (nível 2) é formado por camada única de enterócitos fortemente unidos por junções intercelulares que ajudam a proteger contra a passagem de patógenos (6). É recoberto por muco que forma um biofilme viscoelástico, composto de glicoproteínas, defensinas e outros peptídeos antibacterianos. O objetivo é formar barreira intestinal que controla e seleciona os substratos que serão absorvidos, mantendo o interior do hospedeiro protegido (3, 6). Além disso, o epitélio intestinal possui células imunológicas locais que são estimuladas pela microbiota e, exercem efeito antiinflamatório prevenindo a inflamação descontrolada da mucosa (24-25).

Finalmente, o terceiro nível é composto pelo sistema imunológico. Células dendríticas abrem caminho entre as junções intercelulares do epitélio para chegar ao lúmen intestinal e capturar bactérias. Essa comunicação entre microbiota e sistema imunológico acarreta estado de estimulação imunológica constante (6, 25). O comportamento imunológico associado à microbiota habitual do indivíduo é sugestivo de resposta imunológica constante, que podemos considerar fisiológica. Este fenômeno é, de fato, uma das maiores funções da microbiota, e é particularmente importante para o recém-nascido que apresenta um sistema imunológico imaturo necessitando de um contato com uma microbiota rica e diversa para a maturação adequada.

### *Desequilíbrio da microbiota e complicações*

Em condições normais (eubiose), as bactérias do trato gastrointestinal são essencialmente benéficas para o hospedeiro, porém em caso de desequilíbrio (disbiose), essas podem ser potencialmente patogênicas. A disbiose ocorre quando o equilíbrio da ecologia microbiana é alterado levando a mudanças na resposta metabólica e imunológica do hospedeiro (7). Round e colaboradores (26) descrevem a microbiota saudável como o equilíbrio entre várias classes de bactérias dentre essas as simbióticas (organismos com funções benéficas conhecidas), comensais (organismos da microbiota natural que não exercem efeitos bons nem ruins à saúde do hospedeiro) e patobiontes (organismos da

microbiota natural capazes de causar doença). Os autores ressaltam que, na disbiose existe alteração na composição da microbiota, que pode resultar na redução do número de bactérias simbióticas e/ou no aumento do número das patobiontes (Figura 1) (26).



**Figura 1:** A microbiota intestinal natural do hospedeiro modula a resposta imunológica durante os processos de saúde e doença.

Os possíveis fatores que podem contribuir para a disbiose são: perfil genético do hospedeiro, estilo de vida, exposição a microrganismos e procedimentos cirúrgicos, dieta e estresse. O uso de antimicrobianos também pode alterar a microbiota de forma prejudicial, uma vez que o efeito dessas drogas não distingue microrganismos patogênicos dos simbióticos (26).

Pensando nesses fatores, pacientes com doenças gastrointestinais submetidos a intervenções cirúrgicas podem estar muito susceptíveis à disbiose. A própria doença, o tratamento farmacológico instituído e o procedimento cirúrgico são capazes de alterar essa barreira protetora que é o epitélio intestinal. Esse desequilíbrio pode levar a crescimento microbiano exagerado, alterações físicas da barreira intestinal ou deficiência na resposta imunológica do hospedeiro (1, 9, 13, 20, 27).

O resultado desse somatório de alterações é a translocação bacteriana – passagem de microrganismos viáveis ou não e de produtos, como endotoxinas, do lúmen intestinal para os linfonodos mesentéricos e, possivelmente, para outros órgãos distintos (14, 28-29). A translocação bacteriana ou de respectivos produtos é fator de risco para resposta inflamatória sistêmica e desenvolvimento de complicações infecciosas. Há várias evidências de que esteja associada ao

aumento da incidência de complicações sépticas (28, 30-31). O'Boyle e colaboradores avaliaram 448 pacientes cirúrgicos submetidos a laparotomia e observaram que ocorreu translocação bacteriana em 15,4% dos pacientes, sendo que o microrganismo mais comumente identificado foi *E. coli*. Além disso, 41% dos pacientes que apresentaram translocação desenvolveram sepse quando comparados com os 14% dos pacientes que apresentaram culturas negativas (32). Em trabalho semelhante, Macfie e colaboradores, avaliaram a translocação bacteriana em 927 pacientes e observaram prevalência de 14%, além de forte relação com aumento de sepse pós-operatória (27).

Assim, desequilíbrios na microbiota habitual do indivíduo podem ser sentidos pelo sistema imunológico e levar a alterações nas respostas inflamatória e imunológica sistêmica, aumentando o risco de complicações (33). Portanto, esforços em criar novas terapias com o objetivo de restabelecer o equilíbrio após qualquer agressão como o que ocorre com o uso de antimicrobianos ou em presença de patógenos pela modificação da microbiota intestinal devem ser avaliados e implementados.

## **Probióticos**

A definição oficial mais recente do termo probióticos é da FAO/WHO e determina que probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas fornecem benefícios à saúde do hospedeiro. São bactérias ou leveduras que, adicionados aos alimentos podem recolonizar e restaurar a simbiose da microbiota do trato gastrointestinal (34).

A maioria dos probióticos são bactérias semelhantes às encontradas naturalmente no intestino humano. Frequentemente são bactérias pertencentes à um dos dois gêneros, *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium*. Alguns probióticos, como o *Saccharomyces boulardii* são leveduras (7, 9).

Os probióticos devem ser capazes de sobreviver aos ácidos gástricos e biliares a fim de alcançar vivos o trato intestinal baixo, colonizar o epitélio do hospedeiro e exibir efeito benéfico. Para que isso seja possível a quantidade

mínima recomendada é de cinco bilhões de unidades formadoras de colônias (5 x 10<sup>9</sup> UFC/dia) por, no mínimo, cinco dias (35).

O mecanismo de ação desses microrganismos é justificado de várias maneiras, dentre essas (Figura 4):

- (1) melhora da função de barreira do epitélio intestinal;
- (2) maior adesão à mucosa intestinal;
- (3) inibição da adesão de patógenos;
- (4) competição com patógenos por sítios de fixação e nutrientes;
- (5) síntese de bacteriocinas e de ácidos orgânicos voláteis;

(6) imunomodulação, ou seja, modulação da resposta inflamatória a partir da regulação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (22-24).

Resultados de estudos em modelos animais e humanos mostraram o potencial clínico dos probióticos contra várias doenças. O uso de probióticos: reduz o risco de diarreia e a duração da mesma em crianças e adultos (6-7); é capaz de inibir a colonização do *H. pylori* no trato gastrointestinal e reduzir os efeitos colaterais da terapia padrão contra essa bactéria (8-9); minimiza a intolerância a lactose (10); tem ação benéfica na manutenção de remissão clínica de doenças como colite ulcerativa e doença de Crohn (6-7); e, tem resultados positivos na diminuição de lesões precursoras de câncer colorretal (11).

Há cada vez mais evidências sobre os benefícios dos probióticos ligados à modulação da função imunológica como: aumento da produção de anticorpos; aumento da atividade das células *natural killer*; modulação da função das células dendríticas; alteração da produção de citocinas; indução de regulação das células T e modulação da apoptose (36-38).

Mcnaught e colaboradores, em trabalho envolvendo 103 pacientes críticos, divididos em 2 grupos - controle (terapia convencional) e tratamento (probiótico + terapia convencional), observaram diminuição dos níveis plasmáticos de IL6 no 15º dia pós-operatório entre os pacientes do grupo tratado. Este fato atenuou a resposta imunológica e, conseqüentemente, a resposta orgânica ao estresse desses doentes (39).

Em relação à incidência de complicações pós-operatórias os trabalhos relatando o uso de probióticos também têm apontado bons resultados. Rayes e colaboradores em estudo prospectivo, randomizado, duplo-encoberto com pacientes submetidos a transplante hepático observaram que a incidência de

infecções pós-operatórias foi significativamente menor (3% versus 48%) quando a solução de nutrição enteral foi suplementada com mistura de bactérias ácido-láticas (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*). Além disso, o tempo de uso de antimicrobianos foi menor no grupo que recebeu probióticos (40).

Especula-se que o mecanismo envolvido no efeito dos probióticos não seja apenas a regulação negativa das citocinas pró-inflamatórias. Acredita-se que, na presença do probiótico, haja aumento da produção de citocinas regulatórias, principalmente a IL10, e diminuição da liberação de IL12 por macrófagos ativados com conseqüente redução na diferenciação e na infiltração de células TH<sub>1</sub>. Okada e colaboradores, em 2009, investigaram o efeito antiinflamatório de três espécies de bifidobactérias (*Bifidobacterium longum*, *B. adolescentis*, *B. breve*) em macrófagos submetidos a condições de inflamação (presença de LPS). Os autores observaram que algumas bifidobactérias foram capazes de modular negativamente a produção de IL1B, TNF e IL12, a partir da diminuição da expressão gênica de RNAm dessas citocinas. Além disso, *B. breve* em presença de LPS foi capaz de aumentar significativamente a expressão gênica da IL10 (41). Lammers e colaboradores estudaram a expressão gênica de várias citocinas em pacientes submetidos ao tratamento com probióticos. Os autores observaram que os pacientes tratados com probióticos tiveram níveis significativamente menores de expressão gênica de IL1B, IL8 e INFG comparados aos pacientes do grupo placebo (38).

#### *Saccharomyces boulardii*

O *Saccharomyces boulardii* é a única levedura comercializada como probiótico para humanos. O uso deste iniciou-se na Europa em 1950 (9). Os efeitos benéficos mais extensivamente estudados e relatados na literatura dizem respeito às diarreias associadas ao uso de antimicrobianos e àquelas associadas ao *Clostridium difficile* (9). Porém, recentemente o *S. boulardii* tem despertado interesse pelo potencial antiinflamatório.

Esta levedura tem mecanismos de ação diferentes e simultâneos. No lúmen intestinal o *S. boulardii* pode degradar toxinas patogênicas, interferir na adesão de patógenos e modular a microbiota nativa, preservando a fisiologia intestinal. *S. boulardii* pode ainda, indiretamente, restaurar o balanço adequado

de AGCC, além de aumentar os níveis de IgA secretória e agir como imunorregulador, influenciando os níveis de citocinas. Esse probiótico exerce ainda efeitos tróficos pela liberação de poliaminas que favorecem a maturação dos enterócitos (9).

Lee e colaboradores avaliaram o efeito do *S. boulardii* *in vitro* e *in vivo* e, sugeriram que a função antiinflamatória está fortemente associada ao efeito sobre a expressão gênica. Os autores observaram que a levedura aumenta a expressão gênica de PPAR-gama em células epiteliais cólicas e inibe a diminuição da expressão desse receptor induzida pelo TNF e IL1B. Os mesmos efeitos foram observados em modelos animais de colite (42). Esses resultados vêm reforçar achados já encontrados pelo mesmo grupo em trabalhos anteriores (43). Estudo com células cólicas HT-29 e THP-1 mostraram que a levedura secreta um fator antiinflamatório termoestável capaz de inibir a produção de IL8, reduzir a ativação de NF- $\kappa$ B e inibir a degradação de I $\kappa$ B (44).

Recentemente, uma meta-análise investigou evidências sobre a eficácia e segurança do uso do *S. boulardii* em pacientes adultos (9). Foram avaliados 27 estudos randomizados, controlados, com 5.029 pacientes. Os autores concluíram que o *S. boulardii* foi significativamente eficaz e seguro em 84% dos tratamentos.

## **4. MÉTODOS**

### **Pacientes e instituições participantes**

Este estudo contemplou os pacientes atendidos inicialmente no Ambulatório de Coloproctologia e Intestino Delgado do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), que foram submetidos nesse hospital a tratamento cirúrgico de lesões cólicas no período de julho de 2010 até maio de 2012.

Os critérios de inclusão foram: ter idade superior a 18 anos e ser submetido a ressecção de segmento cólico independentemente da região anatômica, em regime eletivo, e independentemente de preparo de cólon.

Os critérios de exclusão foram: ser submetido a ressecção em caráter de urgência, não ser contatado em tempo hábil para participar do estudo, ter mudança no procedimento cirúrgico durante a operação que impossibilitasse a coleta de material, interromper o uso do probiótico por conta própria e, não aceitar participar do estudo.

As análises foram realizadas no Laboratório de Agentes Recombinantes, sob coordenação do professor Dr. Oscar Bruña Romero e no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos sob coordenação do professor Dr. Jacques Robert Nicoli, ambos no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

### **Execução do estudo**

O projeto de pesquisa e o termo de consentimento livre e esclarecido foram submetidos à Câmara do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina, ao Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG e ao Departamento de Ensino, Pesquisa e Extensão (DEPE) do Hospital das Clínicas da UFMG sendo aprovado em todas as instâncias (Parecer nº. ETIC 0391.0.203.000/09 - anexo A).

Os pacientes que atenderam os critérios de inclusão foram abordados ao fim do atendimento ambulatorial. Após receber as orientações, aceitar participar

da pesquisa e preencher termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice A), os pacientes foram distribuídos aleatoriamente, por sorteio, em dois grupos.

- Grupo controle: recebeu tratamento convencional sem interferências e sem uso de suplementação com probióticos;

- Grupo probiótico: recebeu, diariamente, uma cápsula de probiótico, contendo 100mg ( $5 \times 10^9$  UFC/g) da levedura *Saccharomyces boulardii* (Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ). Os pacientes foram orientados a ingerir uma cápsula ao dia durante os sete dias que precederam a operação. Para tentar garantir que a ingestão do probiótico não fosse esquecida os pacientes foram contatados por telefone, pela pesquisadora principal, a cada dois dias, durante o período do estudo. Pediu-se também que levassem a embalagem do medicamento vazia no momento da internação.

As informações referentes a dados pessoais, diagnóstico principal, procedimento realizado e complicações pós-operatórias foram anotadas de prontuário médico durante o período de internação no 2º andar do Instituto Alfa de Gastroenterologia (apêndice B).

### **Coleta da amostra**

No momento da operação, depois de retirada a peça cirúrgica, a mucosa cólica foi exposta para coleta das amostras. Os instrumentos cirúrgicos usados para a coleta e a mucosa do cólon foram lavados com água bidestilada para remoção de células mortas, fezes e líquidos gastrointestinais. Em seguida, foram obtidos fragmentos de tecido cólico que foram divididos em três tubos coletores (três replicatas) para análise da expressão gênica. Os tubos continham solução de conservação de RNA chamada *RNAlater* (Qiagen®), na quantidade de 1000µL, no qual as amostras ficaram submersas. Durante o transporte as amostras foram mantidas em temperatura ambiente e, em seguida, armazenadas em geladeira (2 a 8°C) por 24 horas, conforme orientação do fabricante da solução de conservação de RNA. Após esse período, a solução foi retirada dos tubos e esses foram armazenados em freezer a -80°C até o momento da manipulação.

## Extração de RNA e transcrição reversa

Utilizaram-se aproximadamente 20mg de tecido de cada amostra. A extração foi realizada com o kit de extração *QiAamp RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Alemanha). O protocolo de extração do RNA foi aquele recomendado pelo fabricante.

A integridade das amostras de RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando-se tampão TBE 1X [Tris-HCl a 45mM, ácido bórico a 45mM e EDTA a 1mM]. A separação eletroforética foi realizada a 100v e 60mA.

O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria a 260nm. A qualidade do RNA foi analisada pelas razões espectrofotométricas  $A_{260nm/230nm}$  e  $A_{260nm/280nm}$  utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop modelo ND-100 (ThermoScientific®). Todas as amostras de RNA utilizadas para este trabalho tiveram alta qualidade e pureza ( $A_{260nm/280nm} \geq 1,7$ ). Após a verificação da integridade do RNA total, foi realizado o tratamento desse material com DNase I. Esse procedimento visou eliminar a contaminação das amostras de RNA total com DNA genômico. Contaminação desse tipo pode superestimar a expressão de um gene. O tratamento foi realizado em 1µg de RNA total utilizando-se 1U da enzima DNase I e 1µL do tampão de reação com MgCl 10X durante 30 minutos a 37°C. A inativação da DNase foi feita com a adição de 1µL de EDTA (50µM) e aquecimento a 65°C, por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram imediatamente resfriadas em gelo.

O RNA extraído foi submetido à reação de transcrição reversa para obtenção de cDNA (ácido desoxirribonucléico complementar) seguindo as instruções do fabricante do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*® (Applied Biosystems®).

O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até à realização da PCR em tempo real.

## Padronização da quantificação relativa da expressão de citocinas em mucosa de cólon de seres humanos usando RT-qPCR

Foram usados para normalização dos dados de expressão gênica os resultados das amplificações do cDNA codificado pelos genes GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e ACT ( $\beta$ -actina). As reações de RT-qPCR foram feitas na plataforma ABI 7900 HT REAL TIME PCR (Applied Biosystems®) pertencente ao Departamento de Biologia Geral - Instituto de Ciências Biológicas/UFMG. As reações foram realizadas usando o Kit SYBR Green PCR Master Mix 2x (Life Technologies®).

Os pares de *primers* foram sintetizados pela Applied Biosystems® de acordo com a listagem apresentada na tabela a seguir.

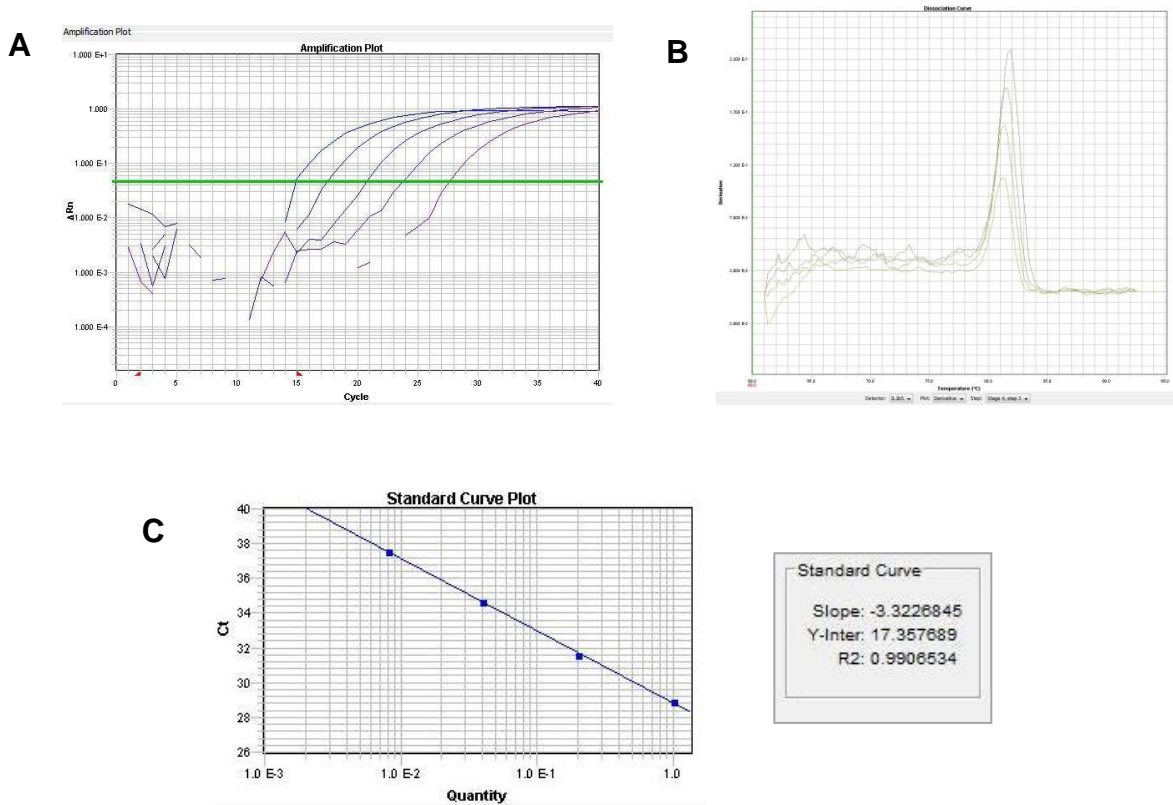
**Tabela 1:** Sequência dos conjuntos de *primers* (5' → 3') empregados nas reações de amplificação.

Gene-alvo	Primer senso (5' → 3')	Primer anti-senso (5' → 3')
<b>TNF</b>	CTCAGTCGTGCCCGACT	CATGGATGGAGGAGCTTGGT
<b>IL10</b>	CCTTGTCGGAAATGATCCAGTT	TTCACGTGCTCCTTGATGTCA
<b>IL1B</b>	GCTGCCTGTAGCAGACGTCTT	GGAGGACTTCAAAAAGCTGATTCA
<b>IL23A</b>	ATGAGAAGCTGCTAGGATCGG	CCAACTCCTGCAGCCTGA
<b>IL12B</b>	CCCTGACATTCTGCGTTCA	AGAGTCTTCACGGACAAGACCT
<b>IL17A</b>	TGGGAAGACCTCATTGGT	ATCACAATCCCACGAAATCC
<b>INFG</b>	GGCATTGTTGAAGAATTGAAAG	AAGATGACCAGAGCATCCAAA
<b>GAPDH</b>	GCGCCAAGAGGGTCAT	GTGGTTCACGCCATCACA
<b>ACT</b>	GAGGTGCACACCGCCTATTC	TGCCGCAGGATGTCTTGAA

A padronização das reações contemplou curvas feitas de diluição seriada de cDNA utilizando-se pontos contendo 50ng; 5ng; 0,5ng, 0,05ng e 0,005ng de cDNA. Foi utilizada amostra de cDNA produzida a partir de um *pool* de amostras de RNA total de seis pacientes do grupo controle (estudo piloto) adicionadas em igual proporção. As curvas de diluição foram feitas para cada um dos genes estudados. Os padrões para avaliação da qualidade das reações foram a eficiência de amplificação e o perfil da curva de dissociação. As reações tiveram eficiência (E) calculada pela inclinação da curva (*slope*) de diluição do cDNA *versus* C<sub>q</sub> (ciclo de quantificação ou C<sub>t</sub>), pela equação (45):

$$E_{(\%)} = [(10)^{-1/\text{slope}} - 1] \times 100$$

A especificidade das reações foi avaliada pela curva de dissociação. Foram padronizadas condições para cada um dos genes amplificados, com eficiência entre 90% e 110% e, com um único pico nas curvas de dissociação. Na Figura 2 estão representadas curvas de amplificação, curvas de diluição seriada de cDNA e curva de dissociação obtidas durante a padronização das reações de RT-qPCR para quantificação relativa da expressão de IL10, como exemplo dos resultados obtidos.



**Figura 2:** Curvas de amplificação, dissociação e de diluição para o gene IL10 de amostras de mucosa de cólon de pacientes submetidos a ressecção cólica.

**Legenda:** **A-** Curva de amplificação da série de diluição para o gene da IL10 com linhas representando a amplificação de diferentes quantidades de cDNA (50, 5, 0,5, 0,05 e 0,005ng). Nessa reação foi utilizada uma amostra de cDNA produzida a partir de um *pool* de amostras de RNA total de seis pacientes do grupo controle (estudo piloto) adicionadas em igual proporção. No gráfico estão representados no eixo X os valores dos ciclos de amplificação, no Y os valores de

$\Delta Rn$  que são medidas de fluorescência e, a linha verde representa o *threshold* ou limiar de fluorescência usado para determinação do  $C_q$ . **B-** Curva de dissociação com pico representando o ponto de dissociação do produto amplificado para IL10. No gráfico estão representados no eixo X os valores de temperatura, no Y os valores de  $\Delta Rn$  que são medidas de fluorescência. O pico corresponde à temperatura na qual 50% do produto de amplificação está desnaturado e 50% renaturado, e essa temperatura é chamada de temperatura de *melting*. **C-** Curva de diluição (quantidade) de cDNA versus  $C_t$  ( $C_q$ ) de amplificação das diferentes quantidades de cDNA. Cada ponto representa a associação de um  $C_q$  com um ponto de quantidade de cDNA. A inclinação desta curva (*slope*) foi utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação.

### **Quantificação relativa da expressão de citocinas em mucosa de cólon de seres humanos usando RT-qPCR**

A obtenção dos dados de nível relativo de expressão (NRE) foi decorrente do método derivado do RQ (*relative quantification*) =  $2^{\Delta\Delta C_q}$  (45), descrito por Hellemans et al., (2007) (46). Os dados de expressão do grupo controle foram utilizados como calibradores. Os resultados foram expressos graficamente usando média e erro-padrão dos valores do nível relativo de RNAm de cada citocina, corrigido pelo fator de normalização, este último dado pela média geométrica das quantidades relativas de RNAm de GAPDH e ACT, para o grupo experimental.

### **Análise estatística**

Os resultados foram submetidos a testes estatísticos para determinar a normalidade e homocedasticidade dos dados. Utilizou-se o teste de Shapiro-Wilks para determinar a normalidade. A homocedasticidade foi avaliada pelo teste de igualdade de variâncias de Levene.

O teste de Mann–Whitney foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos. Para comparar variáveis discretas utilizaram-se os testes  $\chi^2$ , Exato de Fisher ou McNemar. Os resultados foram apresentados como a diferença média de n-vezes em relação ao grupo calibrador.

O cálculo amostral para comparação dos grupos adotou os valores de 5% (bilateralmente) e 20%, probabilidades associadas aos erros tipos I e II respectivamente. O objetivo foi observar diferença mínima de 0,1 vez na

expressão gênica das citocinas, para mais ou para menos, no grupo probiótico em relação ao grupo controle. O resultado baseou-se nos valores obtidos de estudo piloto realizado previamente à coleta de dados. O tamanho amostral mínimo necessário foi de 12 pares de indivíduos.

As diferenças foram consideradas significativas para  $P < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas com os programas SPSS versão 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) e GraphPadPrism 5.0 para Windows (GraphPad Software Inc.).

## 5. RESULTADOS

Os resultados do presente estudo serão apresentados em forma de artigo. O artigo foi escrito com base nos objetivos delimitados pelo escopo do trabalho. Contudo, algumas mudanças foram realizadas com relação à formatação original do artigo: a seção de métodos foi retirada visto que a mesma foi contemplada anteriormente; as tabelas e figuras receberam numeração sequencial considerando-se a tese como um todo; as referências bibliográficas foram apresentadas em seção única ao final do trabalho. A fim de facilitar a compreensão dos termos, lista com significado de abreviaturas e siglas em inglês, foi inserida no início do trabalho com o correspondente em português. O artigo desenvolvido com os resultados desse trabalho foi submetido para publicação (anexo B) como segue abaixo:

- **"Effect of oral administration of *Saccharomyces boulardii* in the immunomodulation and recovery in patients undergoing colon resection: results of a prospective and randomized clinical trial."** Artigo submetido para publicação em 07/07/2013 para a Revista "Annals of Surgery" (Fator de impacto: 6,33/ Qualis: A1)

**TITLE:** "Effect of oral administration of *Saccharomyces boulardii* in the immunomodulation and recovery in patients undergoing colon resection: results of a prospective and randomized clinical trial."

### INTRODUCTION

Probiotics are live microorganisms that confer health benefits to the host when they are administered in adequate amounts. Probiotics have been used in humans for many years (47). In particular, strains belonging to *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, which are the predominant and subdominant groups of the gastrointestinal microbiota, respectively, are the most widely used probiotics. These probiotics are included in many functional foods and dietary supplements. *Saccharomyces boulardii* (SB) is a yeast that has also been associated with health benefits (9). Because of the long-standing use of SB to treat infectious diarrhea,

most experimental research has focused on the prevention of microbial pathogen adherence (48), translocation of commensal microbiota (49-50), and investigation of the neutralization of bacterial toxins (i.e., *Clostridium difficile* toxin A (51) or Cholera toxin (52)) and toxin-related signaling (52-53). The maintenance of normal intestinal permeability and barrier function (17, 51) and the control of mucosal electrolyte transport and luminal secretion (51, 54) have also been studied.

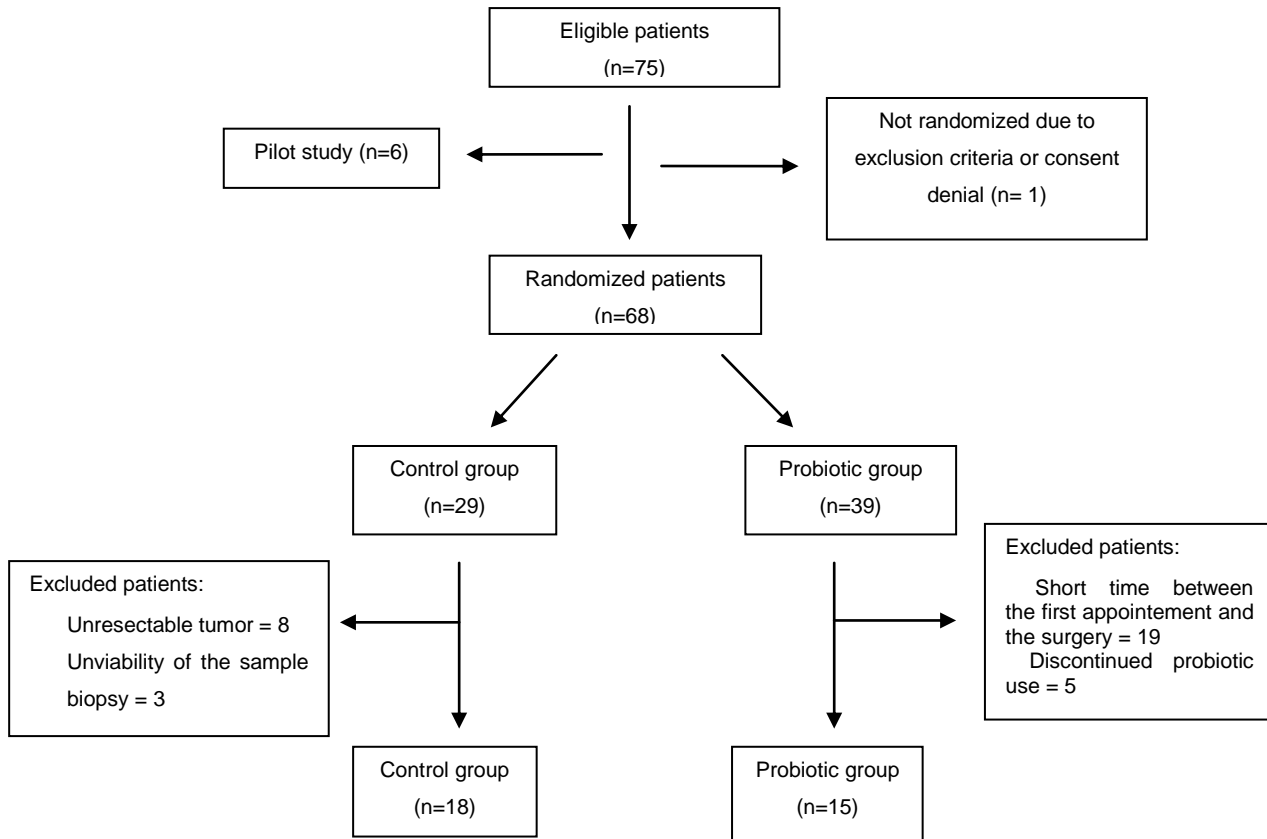
While many health benefits appear to be associated with the use of probiotics, the mechanisms by which these living organisms exert their effects remain unclear (55). Modulation of the immune system is among the acting mechanisms. Studies *in vitro* and in animal models have shown that some probiotics inhibit the inflammatory response of the intestinal immune system by downregulating the nuclear factor- $\kappa$ B activation (15), increasing the activity of the natural killer cells (16), inducing the secretion of cytokines, and by contributing to dendritic cell maturation (16). Other studies have reported that probiotics induce the secretion of immunoglobulin A (17). However, clinical trials that are investigating the *in vivo* interaction of probiotic administration and intestinal immune function modulation are in the early stages.

In recent years, advances in medicine and surgical techniques have lowered the incidence of postoperative complications. However, postoperative infection continues to affect morbidity (18). As patients' intestinal microbiota are often the origin of postoperative infection (19), manipulating the intestinal microbiota may lead to the prevention or treatment of infection.

## **RESULTS**

### **Demographic and operative data**

A total of 75 patients were assessed for eligibility, and 68 patients were enrolled. Of the enrolled patients, 33 patients completed the entire study (figure 3).



**Figure 3:** Flowchart of the randomization procedure that was used to enroll patients in the study.

Demographic and clinical data of the groups are presented in table 2.

**Tabela 2:** Demographic and clinical data for included patients in the control and probiotic groups.

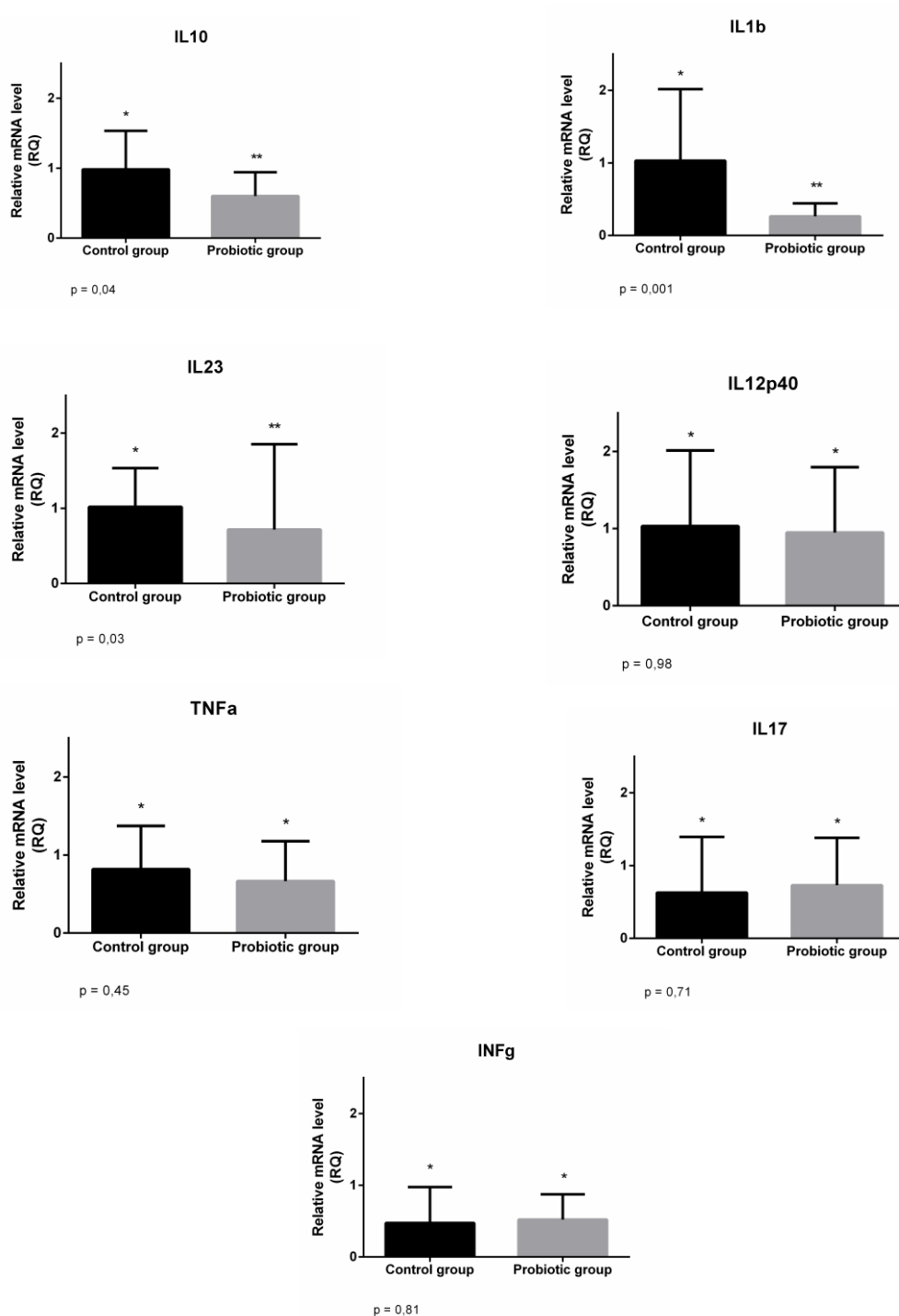
<b>Characteristic</b>	<b>Control group (n = 18)</b>	<b>Probiotic group (n = 15)</b>
<b>Sex (n)</b>		
<b>Male</b>	10	5
<b>Female</b>	8	10
<b>Age (y)</b>	59	51
<b>Range</b>	18-83	28-76
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23.7	24.4
<b>Diagnosis (n)</b>		
<b>Neoplasms</b>		
<b>Benign/malignant</b>	0/16	1/9

<b>Other</b>	2	5
<b>Type of operation (n)</b>		
<b>Left colectomy</b>	15	9
<b>Right colectomy</b>	1	5
<b>Total colectomy</b>	2	1
<b>Mechanical bowel preparation (n)</b>	14	10

Diagnoses in the control group included familial adenomatous polyposis and stenosis of the sigmoid; in the probiotic group, diagnoses included diverticular disease, endometriosis, Crohn's disease (two patients) and cystadenoma of the appendix.

#### **Mucosal cytokine mRNA expression profiles**

Colonic mucosal specimens were analyzed to determine the mucosal expression profiles of IL1B, IL12B, IL10, IL23A, INFG, IL17A and TNF. In the probiotic group, IL1B, IL10 and IL23A mRNA expressions in the normal mucosa were significantly lower than in the control group ( $P=0.001$ ,  $P=0.04$  and  $P=0.03$ , respectively). However, IL12B, INFG, IL17A and TNF mRNA expressions did not differ between the two groups ( $P>0.05$ ). The results are presented in figure 4.



**Figure 4:** Gene expression levels of cytokines IL10, IL1B, IL23A, TNF, IL12B, INFG and IL17A in samples of colorectal cancer-free mucosa that were derived from patients who underwent surgical resection. Patients in the probiotic group (n=15) were given *Saccharomyces boulardii* at least 7 days before the operation; patients in the control group (n=18) received conventional treatment with no probiotic supplementation. Relative quantification was performed with the method developed by Hellemans et al. (46). The results are expressed in relation to the control group, which is expressed as level 1x. \*/ \*\* = Different number of asterisk were significantly different (P < 0.05).

### Length of hospital stay and postoperative complications

The probiotic therapy was well tolerated in all patients in the probiotic group. There were no reports of side effects. The median total length of hospital stay did not differ between the groups ( $P>0.05$ ). Perioperative mortality was 0% in both groups. Infectious complications developed in 2 of 15 patients in the probiotic group and 7 of 18 patients in the control group (table 3).

**Tabela 3:** Length of hospital stay and postoperative complications.

Group	Control group	Probiotic group
Median length of hospital stay (days)	11	10
Patients with infectious complications*	7/18 (38,8%)	2/15 (13,3%)
Peritoneal infection/fistulae	2	1
Intra-abdominal abscesses	4	0
Urinary tract infections	1	1

\* No significant difference between groups ( $P = 0.10$ ).

One patient in the control group (5.5%) and one patient in the probiotic group (6.6%) developed non-infectious complications. The control group patient's complication was intestinal obstruction, and the probiotic group patient's complication was abdominal hemorrhage that required relaparotomy.

### DISCUSSION

Our data suggest that the preoperatively administered probiotic can modulate the intestinal immune response of colonic mucosa. The primary interest of this study was to assess the effect oral administration of *Saccharomyces boulardii* on the expressions of major cytokines (IL10, IL1B, IL23A, TNF, IL12B, INFG, IL17A) in the mRNA levels of colonic mucosa. Microbiota are known to affect the TH1-TH2 balance in the systemic immune compartments, and TH17 cell development in the gut is known to be affected by commensal bacteria (56).

Therefore, the aim of this study was to investigate the probiotic effect on this environment. Patients who are candidates for colorectal resection provide an ideal model for studying these effects, as the resected intestine allows the local impact to be measured without adversely affecting the patient and without changing the surgical strategy. Other authors have investigated the *in vivo* interaction among probiotic administration and the modulation of intestinal immune function in patients undergoing colorectal resection (19), but they relied on a different approach. Our study is the first clinical trial to use *Saccharomyces boulardii* to assess the expression of the inflammatory cytokine profile.

We tested *Saccharomyces boulardii* because the strain has been industrially commercialized worldwide in a lyophilized form. Therefore, the strain is not affected by transport or storage, and if beneficial effects are confirmed, the use of the strain will be easy to implement in clinical practice. Moreover, comprehensive knowledge of the positive and negative interactions between defined probiotic strains and the host is essential before therapeutic trials can be developed.

Available tissue samples are often too small to allow for the quantification of cytokines at the protein level. Therefore, the detection of mRNA has been used to investigate the cytokine profiles at sites of immune infiltration or inflammation (57-58). Moreover, cytokine protein detection, using techniques such as ELISA, allows only a limited number of cytokines to be analyzed from a single sample (58).

The statistically significant findings included a decrease in the IL1B, IL23A and IL10 mucosal gene expressions in *Saccharomyces boulardii*-treated patients. In a retrospective analysis of endoscopic samples from patients with UC who underwent ileal-pouch anal anastomosis, Lammers et al. investigated mRNA expression levels of cytokines (38). The authors observed that patients who had been treated with a different probiotic preparation of VSL#3 (VSL Pharmaceuticals, Ft. Lauderdale, Flaprobiotics) displayed significantly lower mucosal mRNA expression levels of IL1B compared with placebo-treated patients, and the regulatory cytokine IL10 was not altered (38).

We did not observe changes in the proinflammatory cytokines TNF, IL12B, INFG and IL17A in either group. One possibility is that the length of probiotic use before surgery was insufficient to affect the mRNA expression levels of these

cytokines, especially of IL17A, which is an end-stage product of the TH17 response. Interleukin-17 is a proinflammatory cytokine that is predominantly produced by activated T cells. Interleukin-17 enhances T-cell priming and stimulates fibroblasts, endothelial cells, macrophages, and epithelial cells to produce multiple proinflammatory mediators, including IL1, IL6, TNF, NOS-2, metalloproteases, and chemokines; the result is the induction of inflammation (59-61).

On the contrary, 7 days of probiotic use was sufficient to lower the expression of IL23A mRNA. IL23A is a heterodimeric cytokine that promotes a distinct T-cell activation state that expresses IL-17 as an effector cytokine (59, 62-63). Therefore, a longer probiotic treatment may display this effect in IL17A levels. Given that the TH17 response is amplified by IL1B (62, 64) and that IL10 plays a role in stimulating IL23 (65), the downregulation of these cytokines that was observed in this study suggests that the use of probiotics impacts a small inflammatory mucosal profile. In a healthy microbiome, there is an optimal proportion of the pro- and anti-inflammatory organisms that signal the developing immune system (controlled by the host genome); the optimal levels balance the number of effector and regulatory cells (TH1, TH2, TH17 and Treg) (56, 66). An increase in proinflammatory cytokines or, alternatively, a decrease or absence of anti-inflammatory cytokines leads to excessive effector T-cell function or deficient regulatory T-cell function (66). In the current study, we observed that *Saccharomyces boulardii* was capable of downregulating both pro- and anti-inflammatory cytokines, which balances the immune response and creates a healthier microbiome.

Our study showed that patients who used probiotics before surgery presented with fewer postoperative infectious complications before hospital discharge; however, the difference was not statistically significant. The lack of statistical significance may be a function of a small sample size, as recent research has shown that probiotics significantly impact the surgical outcome (18, 67-72). In a recent meta-analysis of probiotic use in elective surgery, the authors concluded that probiotics reduce the rate of infectious complications following major abdominal surgery. These findings support the hypothesis that such an approach is safe in the elective surgical setting (72). However, different species of microorganisms were used, and strains substantially differ in their survival during

GI transit, ability to modulate the intestinal metabolism, ability to affect the type of immune response and competition with microbiota and pathogens. In surgical studies, strains belonging to *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* have been the most widely used probiotic bacteria (72). *Saccharomyces boulardii*'s yeast has also been shown to produce health benefits in other clinical settings (9, 17, 48-52, 54). Thus, our study is difficult to compare with other studies in terms of the surgical outcome.

The current study may be limited because the cytokine profiles could have been influenced by two extra factors other than the probiotic use: the presence/absence of colorectal carcinoma and the type of colectomy (right or left). Samples were obtained from colorectal cancer-free mucosa, but we cannot guarantee that the cytokine profiles of the samples were not already affected by the presence of the tumor. Léon et al. showed that even in unaffected areas of patients with intestinal bowel disease, mRNA levels of IL23A and IL1B were higher than in healthy controls. Additionally, the microbiome is known to vary by the colon area (2).

In conclusion, this study highlights that probiotic treatment with *Saccharomyces boulardii* can regulate the mucosal immune response by reducing the mucosal levels of IL23 and IL10. This regulation may further inhibit T-cell activation, reinforce the barrier function and control the potent proinflammatory cytokine IL1B. Future studies should administer probiotics for a longer period of time and assess other cytokines, such as TGF $\beta$ , IL6 and a marker of regulatory T-cells (forkhead box P3 (Foxp3)). These studies can elucidate the relationship between probiotics use and the Treg response to determine the clinical benefit of gut microbiota modulation in overall elective surgery.

## **6. CONCLUSÃO**

O uso de probióticos exerceu efeito imunomodulador na mucosa intestinal de pacientes submetidos a ressecções cólicas.

A ocorrência de complicações pós-operatórias e o tempo de permanência hospitalar foi semelhante entre os pacientes que usaram e os que não usaram probióticos durante o período pré-operatório.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 1996 Nov;4(11):430-5.
2. Brandt KG, Sampaio, M. M. S. C., Miuki, C. J. Importance of the intestinal microflora. *Pediatria (São Paulo)*. [Reviews and Essays]. 2006;28(2):117-27.
3. Guarner F. Enteric flora in health and disease. *Digestion.* 2006;73 Suppl 1:5-12.
4. Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Oct;6(10):776-88.
5. Sanchez de Medina F, Ortega-Gonzalez M, Gonzalez-Perez R, Capitan-Canadas F, Martinez-Augustin O. Host-microbe interactions: the difficult yet peaceful coexistence of the microbiota and the intestinal mucosa. *Br J Nutr.* 2013 Jan;109 Suppl 2:S12-20.
6. Ruemmele FM, Bier D, Marteau P, Rechkemmer G, Bourdet-Sicard R, Walker WA, et al. Clinical evidence for immunomodulatory effects of probiotic bacteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009 Feb;48(2):126-41.
7. Iannitti T, Palmieri B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clin Nutr.* 2010 Dec;29(6):701-25.
8. Felley C, Michetti P. Probiotics and *Helicobacter pylori*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003 Oct;17(5):785-91.
9. McFarland LV. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J Gastroenterol.* 2010 May 14;16(18):2202-22.
10. Pelletier X, Laure-Boussuge S, Donazzolo Y. Hydrogen excretion upon ingestion of dairy products in lactose-intolerant male subjects: importance of the live flora. *Eur J Clin Nutr.* 2001 Jun;55(6):509-12.
11. Zhu Y, Michelle Luo T, Jobin C, Young HA. Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Lett.* 2011 Oct 28;309(2):119-27.
12. Penna FJ, Peret LA, Vieira LQ, Nicoli JR. Probiotics and mucosal barrier in children. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008 Sep;11(5):640-4.

13. Gorski A, Wazna E, Dabrowska BW, Dabrowska K, Switala-Jelen K, Miedzybrodzki R. Bacteriophage translocation. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006 Apr;46(3):313-9.
14. Lichtman SM. Bacterial [correction of bacterial] translocation in humans. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001 Jul;33(1):1-10.
15. Tien MT, Girardin SE, Regnault B, Le Bourhis L, Dillies MA, Coppee JY, et al. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *J Immunol*. 2006 Jan 15;176(2):1228-37.
16. Takeda K, Suzuki T, Shimada SI, Shida K, Nanno M, Okumura K. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin Exp Immunol*. 2006 Oct;146(1):109-15.
17. Generoso SV, Viana ML, Santos RG, Arantes RM, Martins FS, Nicoli JR, et al. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. *Eur J Nutr*. 2011 Jun;50(4):261-9.
18. Liu Z, Qin H, Yang Z, Xia Y, Liu W, Yang J, et al. Randomised clinical trial: the effects of perioperative probiotic treatment on barrier function and post-operative infectious complications in colorectal cancer surgery - a double-blind study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 Jan;33(1):50-63.
19. Gianotti L, Morelli L, Galbiati F, Rocchetti S, Coppola S, Beneduce A, et al. A randomized double-blind trial on perioperative administration of probiotics in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2010 Jan 14;16(2):167-75.
20. Correia MI, Nicoli JR. The role of probiotics in gastrointestinal surgery. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2006 Sep;9(5):618-21.
21. Martins FST, F. C. P.; Barbosa, F. H. F.; Penna, F. J.; Rosa, A. C.; Nardi, R. M. D.; Neves, M. J.; Nicoli, J. R. Utilização de leveduras como probióticos. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 2005;5:1519-30.
22. Salminen S, Benno Y, de Vos W. Intestinal colonisation, microbiota and future probiotics? *Asia Pac J Clin Nutr*. 2006;15(4):558-62.
23. Mountzouris KC, McCartney AL, Gibson GR. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *Br J Nutr*. 2002 May;87(5):405-20.
24. van Santvoort HC, Besselink MG, Timmerman HM, van Minnen LP, Akkermans LM, Gooszen HG. Probiotics in surgery. *Surgery*. 2008 Jan;143(1):1-7.

25. Kelly D, Conway S, Aminov R. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends Immunol.* 2005 Jun;26(6):326-33.
26. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009 May;9(5):313-23.
27. MacFie J, Reddy BS, Gatt M, Jain PK, Sowdi R, Mitchell CJ. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years. *Br J Surg.* 2006 Jan;93(1):87-93.
28. Wiest R, Rath HC. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003 Jun;17(3):397-425.
29. Gatt M, MacFie J. Randomized clinical trial of the impact of early enteral feeding on postoperative ileus and recovery (Br J Surg 2007; 94: 555-561). *Br J Surg.* 2007 Aug;94(8):1044-5.
30. Woodcock NP, Robertson J, Morgan DR, Gregg KL, Mitchell CJ, MacFie J. Bacterial translocation and immunohistochemical measurement of gut immune function. *J Clin Pathol.* 2001 Aug;54(8):619-23.
31. MacFie J, O'Boyle C, Mitchell CJ, Buckley PM, Johnstone D, Sudworth P. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut.* 1999 Aug;45(2):223-8.
32. O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, Johnstone D, Sagar PM, Sedman PC. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut.* 1998 Jan;42(1):29-35.
33. Maung AA, Davis KA. Perioperative Nutritional Support: Immunonutrition, Probiotics, and Anabolic Steroids. *Surgical Clinics of North America.* [doi: 10.1016/j.suc.2012.01.014]. 2012;92(2):273-83.
34. FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London: Ontario (Canada)2002.
35. Gupta V, Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol.* 2009 Jul-Sep;27(3):202-9.
36. Penner R, Fedorak RN, Madsen KL. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2005 Dec;5(6):596-603.
37. Rayes N, Seehofer D, Muller AR, Hansen S, Bengmark S, Neuhaus P. [Influence of probiotics and fibre on the incidence of bacterial infections following

major abdominal surgery - results of a prospective trial]. *Z Gastroenterol.* 2002 Oct;40(10):869-76.

38. Lammers KM, Vergopoulos A, Babel N, Gionchetti P, Rizzello F, Morselli C, et al. Probiotic therapy in the prevention of pouchitis onset: decreased interleukin-1beta, interleukin-8, and interferon-gamma gene expression. *Inflamm Bowel Dis.* 2005 May;11(5):447-54.

39. McNaught CE, Woodcock NP, Anderson AD, MacFie J. A prospective randomised trial of probiotics in critically ill patients. *Clin Nutr.* 2005 Apr;24(2):211-9.

40. Rayes N, Seehofer D, Theruvath T, Schiller RA, Langrehr JM, Jonas S, et al. Supply of pre- and probiotics reduces bacterial infection rates after liver transplantation--a randomized, double-blind trial. *Am J Transplant.* 2005 Jan;5(1):125-30.

41. Okada Y, Tsuzuki Y, Hokari R, Komoto S, Kurihara C, Kawaguchi A, et al. Anti-inflammatory effects of the genus *Bifidobacterium* on macrophages by modification of phospho-I kappaB and SOCS gene expression. *Int J Exp Pathol.* 2009 Apr;90(2):131-40.

42. Lee SK, Kim YW, Chi SG, Joo YS, Kim HJ. The effect of *Saccharomyces boulardii* on human colon cells and inflammation in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Dig Dis Sci.* 2009 Feb;54(2):255-63.

43. Lee SK, Kim HJ, Chi SG, Jang JY, Nam KD, Kim NH, et al. [*Saccharomyces boulardii* activates expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in HT-29 cells]. *Korean J Gastroenterol.* 2005 May;45(5):328-34.

44. Sougioultzis S, Simeonidis S, Bhaskar KR, Chen X, Anton PM, Keates S, et al. *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Apr 28;343(1):69-76.

45. Livak KJ, Schmittgen TD. Analyzing real-time PCR data by the comparative [C.sub.T] method. *Nature Protocols.* [Article]. 2008 2008/05//;3(6):1101+.

46. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 2007;8(2):R19.

47. Fao/Who. FAO/WHO: Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. www.fao.org. 2001.
48. Tasteyre A, Barc MC, Karjalainen T, Bourlioux P, Collignon A. Inhibition of in vitro cell adherence of *Clostridium difficile* by *Saccharomyces boulardii*. *Microb Pathog*. 2002 May;32(5):219-25.
49. Geyik MF, Aldemir M, Hosoglu S, Ayaz C, Satilmis S, Buyukbayram H, et al. The effects of *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation in rats with obstructive jaundice. *Ann R Coll Surg Engl*. 2006 Mar;88(2):176-80.
50. Berg R, Bernasconi P, Fowler D, Gautreaux M. Inhibition of *Candida albicans* translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *J Infect Dis*. 1993 Nov;168(5):1314-8.
51. Pothoulakis C, Kelly CP, Joshi MA, Gao N, O'Keane CJ, Castagliuolo I, et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology*. 1993 Apr;104(4):1108-15.
52. Brandao RL, Castro IM, Bambirra EA, Amaral SC, Fietto LG, Tropia MJ, et al. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 1998 Feb;64(2):564-8.
53. Czerucka D, Dahan S, Mograbi B, Rossi B, Rampal P. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Infect Immun*. 2000 Oct;68(10):5998-6004.
54. Schroeder B, Winckler C, Failing K, Breves G. Studies on the time course of the effects of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* on electrolyte transport in pig jejunum. *Dig Dis Sci*. 2004 Aug;49(7-8):1311-7.
55. Correia MITD, Liboredo JC, Consoli MLD. The role of probiotics in gastrointestinal surgery. *Nutrition*. [doi: 10.1016/j.nut.2011.10.013]. 2012;28(3):230-4.
56. Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science*. 2010 Dec 24;330(6012):1768-73.
57. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. 2001 Dec;25(4):386-401.

58. Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, Mathieu C. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech.* 2003 Mar;14(1):33-43.
59. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest.* 2006 May;116(5):1218-22.
60. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol.* 1998 Apr 1;160(7):3513-21.
61. Kolls JK, Khader SA. The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 Dec;21(6):443-8.
62. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.
63. Sarra M, Pallone F, Macdonald TT, Monteleone G. IL-23/IL-17 axis in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2010 Oct;16(10):1808-13.
64. Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Dec;114(6):1265-73; quiz 74.
65. Nickoloff BJ, Qin JZ, Nestle FO. Immunopathogenesis of psoriasis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2007 Oct;33(1-2):45-56.
66. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jul;3(7):521-33.
67. Zhang JW, Du P, Gao J, Yang BR, Fang WJ, Ying CM. Preoperative probiotics decrease postoperative infectious complications of colorectal cancer. *Am J Med Sci.* 2012 Mar;343(3):199-205.
68. Sugawara G, Nagino M, Nishio H, Ebata T, Takagi K, Asahara T, et al. Perioperative synbiotic treatment to prevent postoperative infectious complications in biliary cancer surgery: a randomized controlled trial. *Ann Surg.* 2006 Nov;244(5):706-14.
69. Kinross J, Warren O, Silk D, Darzi A. Perioperative synbiotic treatment to prevent postoperative infectious complications in biliary cancer surgery: a randomized control trial. *Ann Surg.* 2007 Jun;245(6):1000.
70. Reddy BS, Macfie J, Gatt M, Larsen CN, Jensen SS, Leser TD. Randomized clinical trial of effect of synbiotics, neomycin and mechanical bowel

preparation on intestinal barrier function in patients undergoing colectomy. *Br J Surg.* 2007 May;94(5):546-54.

71. Liu ZH, Huang MJ, Zhang XW, Wang L, Huang NQ, Peng H, et al. The effects of perioperative probiotic treatment on serum zonulin concentration and subsequent postoperative infectious complications after colorectal cancer surgery: a double-center and double-blind randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr.* 2013 Jan;97(1):117-26.

72. Kinross JM, Markar S, Karthikesalingam A, Chow A, Penney N, Silk D, et al. A meta-analysis of probiotic and synbiotic use in elective surgery: does nutrition modulation of the gut microbiome improve clinical outcome? *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2013 Mar;37(2):243-53.

# APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

## Termo de Consentimento para Participação em Pesquisa

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada “Impacto dos probióticos na modulação da microbiota intestinal de pacientes submetidos a ressecção colônica”. Os investigadores principais são a Prof<sup>a</sup>. Maria Isabel Correia e Marcella Lobato Dias Consoli. Os objetivos do estudo são avaliar se a oferta de probióticos (microrganismos vivos que fornecem benefícios à saúde do hospedeiro, semelhantes aos utilizados em alguns iogurtes) antes da operação interfere nos resultados, beneficiando o paciente em termos de defesas orgânicas. Os procedimentos que você deve seguir se concordar em participar do estudo serão: (1) Você fará parte de sorteio que definirá o grupo ao qual irei pertencer: a) um grupo receberá probióticos gratuitamente que deverão ser tomados diariamente durante, no mínimo, sete dias antes da operação; b) o outro grupo não tomará nada. (2) Os pesquisadores farão sua avaliação geral, rotina habitual antes da operação, além da avaliação nutricional obtendo peso e altura. Além disso, farão perguntas como, por exemplo, quanto você costuma pesar, se perdeu peso recentemente, se apresentou náuseas, vômitos ou se está conseguindo se alimentar. (3) os pesquisadores avaliarão constantemente a sua evolução depois da operação. (4) independente de você usar ou não o probiótico terá o acompanhamento antes e após a operação com a mesma dedicação e preocupação da equipe médica. Quanto aos benefícios e riscos que você corre saiba que: diversas pesquisas já mostraram que o uso de probióticos não representa risco para a saúde. Em pessoas imunodeprimidas, ou seja, muito debilitadas com outras infecções ou em quimioterapia, o que não é o seu caso, já ocorreram casos com infecção pelo probiótico. O esperado é que você se beneficie dessa conduta. Isso poderá diminuir os riscos de você ter complicações depois da operação e diminuir o número de dias de internação. Os resultados do estudo serão discutidos com você e ficarão disponíveis para o seu médico de referência. Todas as informações obtidas neste estudo serão consideradas confidenciais e usadas estritamente para fins de pesquisa. Sua identidade será mantida em segredo.

O/A \_\_\_\_\_, assistente da pesquisa, discutiu essas informações comigo, oferecendo-se para responder às minhas dúvidas. Caso eu tenha perguntas adicionais, poderei contatar a pesquisadora Marcella Lobato Dias Consoli pelo telefone 8624-0403 ou a Dra. Isabel Correia, pelo telefone 9168-8239.

Direito de recusa: Minha participação neste estudo é totalmente voluntária, sendo eu livre para recusar a participar, sem afetar ou pôr em risco meu futuro atendimento médico.

Consentimento: Concordo em participar deste estudo. Recebi uma cópia do presente termo de consentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer dúvidas.

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 20\_\_\_\_.

Assinatura do paciente

---

Assinatura do médico

---

Assinatura da testemunha

---

Assinatura da testemunha

---

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP/UFMG  
Endereço: Avenida Antônio Carlos, 6627  
Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005  
Campus Pampulha, Belo Horizonte – MG, 31270-901  
Email: [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br)  
Telefone: (31) 3409-4592  
Horário de atendimento: 09h às 12h e 13h30 às 16h30

# APÊNDICE B - FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

Amostra nº:

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA E OFTALMOLOGIA FM / UFMG

*"Impacto dos probióticos na modulação da microbiota intestinal de pacientes submetidos a ressecção cólica"*



Doutoranda: Marcella Lobato Dias

## FICHA DE IDENTIFICAÇÃO

Data da Coleta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Grupo: ( ) 0=controle 1=probiótico Pront. nº: \_\_\_\_\_  
Paciente: \_\_\_\_\_  
Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_anos Estado civil: \_\_\_\_\_  
Cor: \_\_\_\_\_ Ocupação: \_\_\_\_\_ Acompanhante: \_\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_  
Telefone(s): \_\_\_\_\_  
Data de admissão: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Data da Alta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Diagnóstico principal: \_\_\_\_\_  
Procedimento: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Dados pré-operatórios:

Avaliação antropométrica:

Peso (kg): \_\_\_\_\_ Estatura (m): \_\_\_\_\_

IMC (kg/m<sup>2</sup>): \_\_\_\_\_ EN segundo IMC: \_\_\_\_\_

Faz uso de probióticos regularmente: ( ) 0=não 1=sim Se sim, quais: \_\_\_\_\_

### Dados pós-operatórios:

Data da operação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Fez preparo de cólon: ( ) 0=não 1=sim

Médico responsável: \_\_\_\_\_

Fragmento do cólon retirado: \_\_\_\_\_

Fragmento da amostra:

Tipo de operação: ( ) 0=aberta 1=videolaparoscópica

Complicação pós-operatória: ( ) 0=não 1=sim

Se sim, complicação infecciosa: ( ) 0=não 1=sim

Se sim, qual: \_\_\_\_\_

Se não, qual: \_\_\_\_\_

## FICHA LABORATORIAL

Número do paciente: \_\_\_\_\_ Iniciais: \_\_\_\_\_

Grupo: ( ) 0=controle 1=probiótico

	<b>Peso tubo vazio</b>	<b>Peso com amostra</b>	<b>Peso da amostra</b>
<b>Butirato</b>			
<b>Biomol 1<sup>a</sup></b>			
<b>Biomol 2<sup>a</sup></b>			
<b>Biomol 3<sup>a</sup></b>			
<b>Extra</b>			

Data/hora coleta:

Considerações:

## ANEXO A - PARECER ÉTICO - ETIC 0391.0.203.000-09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

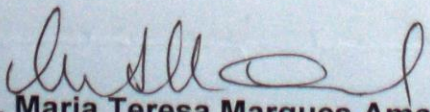
Parecer nº. ETIC 0391.0.203.000-09

Interessado(a): **Profa. Maria Isabel Toulson Davisson Correia**  
**Departamento de Cirurgia**  
**Faculdade de Medicina - UFMG**

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 14 de outubro de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Impacto dos probióticos na modulação da microbiota intestinal e nas complicações pós-operatórias de pacientes submetidos a ressecção colônica"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Prof. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**

## ANEXO B - SUBMISSÃO DO ARTIGO



**Submission Confirmation for Effect of oral administration of *Saccharomyces boulardii* in the immunomodulation and recovery in patients undergoing colon resection: results of a prospective and randomized clinical trial - [EMID:8cafe386ce486c84]**

---

7 de julho de 2013 21:39

**De:** "Annals of Surgery" <[editorial@annalsofsurgery.org](mailto:editorial@annalsofsurgery.org)>

**Assunto:** Submission Confirmation for Effect of oral administration of *Saccharomyces boulardii* in the immunomodulation and recovery in patients undergoing colon resection: results of a prospective and randomized clinical trial - [EMID:8cafe386ce486c84]

**Data:** 7 de julho de 2013 17:41:20 BRT

**Para:** "Maria Isabel Toulson Davisson Correia" <[isabel\\_correia@uol.com.br](mailto:isabel_correia@uol.com.br)>

Dear Mrs Correia,

This is to acknowledge receipt of your manuscript entitled "Effect of oral administration of *Saccharomyces boulardii* in the immunomodulation and recovery in patients undergoing colon resection: results of a prospective and randomized clinical trial ". It is being sent to members of the Editorial Board for review.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://annsurg.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned, and you are requested to use it in all subsequent correspondence.

Thank you for submitting this work to Annals of Surgery.

Kind regards,

Editorial Staff

Annals of Surgery

## **ANEXO C - ATA DA DEFESA**

## **ANEXO D- DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO**

