

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA**

**PAULA LOPES ARMOND CARVALHO**

**EFEITOS DOS FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS NO PRÉ-TRATAMENTO E  
TRATAMENTO TOTAL SOBRE A MUCOSITE INTESTINAL, INDUZIDA POR 5-  
FLUOROURACIL**

Belo Horizonte - MG  
2019

**PAULA LOPES ARMOND CARVALHO**

**EFEITOS DOS FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS NO PRÉ-TRATAMENTO E  
TRATAMENTO TOTAL SOBRE A MUCOSITE INTESTINAL, INDUZIDA POR 5-  
FLUOROURACIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências de Alimentos.

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Simone de Vasconcelos Generoso

Belo Horizonte - MG  
2019

C331e Carvalho, Paula Lopes Armond.  
Efeitos dos fruto-oligossacarídeos no pré-tratamento e tratamento total sobre a mucosite intestinal, induzida por 5-fluorouracil / Paula Lopes Armond Carvalho. – 2019.  
95 f. : il.

Orientador: Valbert Nascimento Cardoso.  
Coorientadora: Simone de Vasconcelos Generoso.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Inflamação – Teses. 2. Sistema gastrointestinal – Teses. 3. Fluorouracil – Teses. 4. Oligossacarídeos – Teses. 5. Prebióticos. 6. 5-Fluorouracil. 7. Mucosite intestinal. I. Cardoso, Valbert Nascimento. II. Generoso, Simone de Vasconcelos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.34



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPCCA

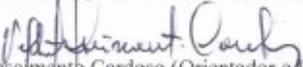
## FOLHA DE APROVAÇÃO

**EFEITOS DOS FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS NO PRÉ-TRATAMENTO E TRATAMENTO TOTAL SOBRE A MUCOSITE INTESTINAL, INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**

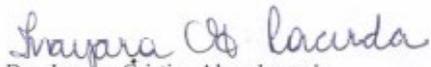
**PAULA LOPES ARMOND CARVALHO**

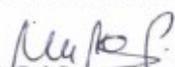
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 25 de setembro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso (Orientador e Presidente da Comissão)  
Faculdade de Farmácia - UFMG

  
Prof(a). Dra. Simone de Vasconcelos Geroso (Coorientadora)  
Escola de Enfermagem - UFMG

  
Prof(a). Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda  
Faculdade de Farmácia - UFMG

  
Prof(a). Pamela Del Carmen Mancha Agresti  
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Belo Horizonte, 25 de setembro de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família, pelo apoio e compreensão durante esses dois anos.

Ao Pablo, pelo incentivo, apoio e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso que abriu as portas do seu laboratório e me guiou durante neste trabalho.

A minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone de Vasconcelos Generoso por me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Odília Antunes Fernandes pela ajuda sempre que precisei.

A Dr<sup>a</sup>. Maria Emília Rabelo Andrade pela paciência em me ensinar e por sempre estar disponível quando precisei.

A aluna de doutorado Luísa Martins Trindade pela calma e paciência em me ensinar e pelo auxílio na realização das análises.

A mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas Rafaela Miranda Pessoa pela ajuda na realização dos experimentos.

Ao Farmacêutico Vanderli Pacheco por toda ajuda, paciência e pelo fornecimento de materiais para os experimentos.

A Adelaide Fernandes e ao Batista Vitorino pelo auxílio desde o início com os animais no Biotério e pelo carinho e atenção.

Aos amigos do laboratório de Radioisótopos pela amizade e por tornarem os dias mais alegres.

A todos os alunos de iniciação científica que passaram pelo laboratório nestes dois anos.

Ao doutorando Sued Miranda, por sempre estar disposto a ajudar e pelo apoio em nos experimentos.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Jaqueline Isaura Alvarez Leite e sua aluna de Pós-Doutorado Dr<sup>a</sup>. Paola Caroline pela colaboração nas análises de junções firmes e infiltrado inflamatório.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria do Carmo Peluzio pela colaboração nas análises de ácidos graxos de cadeia curta.

Ao Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins e sua aluna de Pós-Doutorado Éricka Lorena de Sales Souza e Melo pela colaboração na análise de sIgA.

Ao professor Dr. Geovanni Cassali pela colaboração nas análises histológicas e seu aluno Jonathan Júnio de Souza Oliveira pela realização da análise de muco.

## RESUMO

O uso do antimetabólico 5-fluorouracil (5-FU) no tratamento de câncer, leva ao desenvolvimento de efeitos colaterais como a mucosite. Esta debilita o estado nutricional do paciente e dificulta o processo do tratamento. Estudos têm demonstrado efeitos benéficos na utilização do prebiótico fruto-oligossacarídeo (FOS) em doenças inflamatórias intestinais. O FOS contribui para a homeostase intestinal, podendo amenizar a inflamação causada pela mucosite. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do pré-tratamento e do tratamento total com FOS na mucosite intestinal induzida pelo 5-FU investigando possíveis mecanismos envolvidos na ação deste prebiótico. Foram utilizados camundongos BALB/c machos, divididos em 5 grupos: Controle (sem mucosite + solução salina), FOS (sem mucosite + 6 % de FOS), MUC (com mucosite + solução salina), PT (com mucosite + suplementação com 6 % de FOS antes da indução da doença) e TT (com mucosite + suplementação com 6 % de FOS durante todo o período experimental). Os animais foram alimentados com dieta comercial e suplementados com FOS ou salina via gavagem durante 10 dias. A mucosite foi induzida com uma única injeção intraperitoneal (300 mg/kg) de 5-FU no sétimo dia. Após 72 horas da injeção, os camundongos foram anestesiados e eutanasiados, foi então feita a coleta de material para as análises. Antes da indução da mucosite não foi observada modificações no consumo de ração e variação ponderal em todos os grupos ( $p>0,05$ ). Entretanto, após a indução da mucosite observou-se redução de ambos os parâmetros para o grupo MUC ( $p<0,05$ ) e a suplementação com FOS não foi capaz de prevenir a redução no consumo e na perda de peso. Os animais que receberam FOS mostraram níveis fisiológicos de permeabilidade intestinal (PI) em ambos os tratamentos. Os grupos PT e TT apresentaram redução da translocação bacteriana (TB) em relação ao grupo MUC ( $p<0,05$ ). Os resultados de PI e TB estão de acordo com os dados histológicos que apresentaram preservação parcial da arquitetura intestinal no íleo com manutenção da altura das vilosidades e profundidade das criptas nos animais que receberam o pré tratamento e tratamento total. A análise das junções mostrou que as duas modalidades de tratamento foram capazes de preservar expressão de ocludina e zonulina, prevenindo a PI e a TB. Observou-se aumento das atividades de MPO e EPO no grupo MUC ( $p<0,05$ ) em relação aos demais grupos e ambos os tratamentos

foram capazes de prevenir o infiltrado inflamatório. A análise da citocina IL-10 não apresentou diferença entre os grupos ( $p>0,05$ ) e a concentração de TNF- $\alpha$  demonstrou redução significativa nos grupos com mucosite ( $p<0,05$ ). A suplementação com FOS foi capaz de aumentar a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), porém os animais com mucosite que receberam os tratamentos apresentaram níveis de acetato e butirato semelhantes ao grupo MUC ( $p>0,05$ ), a concentração de propionato nos grupos PT e TT foi semelhante ao controle ( $p>0,05$ ). A concentração de sIgA mostrou-se reduzida no grupo MUC e TT apresentou níveis semelhantes ao CTL ( $p<0,05$ ). O tratamento total foi capaz de manter a produção de muco semelhante ao grupo controle, assim como a produção de sIgA além de apresentar maior preservação da mucosa na análise histológica, promovendo efeitos benéficos sobre a mucosite intestinal, mostrando ser mais eficaz do que a modalidade do pré-tratamento.

**Palavras-chave:** Mucosite intestinal. 5-fluorouracil. Fruto-oligossacarídeos. Prebióticos.

## ABSTRACT

The use of the antimetabolic 5-fluorouracil (5-FU) in the cancer treatment leads to the development of side effects such as mucositis. This debility the patient nutritional status and hinders the treatment process. Studies have shown beneficial effects of the use of prebiotic fruit-oligosaccharides (FOS) in inflammatory bowel diseases. FOS contributes to intestinal homeostasis and can mitigate inflammation caused by mucositis. The objective of the present work was to validate the effects of pre-treatment and total treatment with FOS in intestinal mucositis induced by 5-FU investigating possible mechanisms involved in the effect of this prebiotic. BALB/c male mice were used, they were divided into 5 groups: control (without mucositis + saline solution), FOS (without mucositis + 6% FOS), MUC (with mucositis + saline solution), PT (with mucositis + 6% FOS supplementation before disease induction) and TT (with mucositis + 6% FOS supplementation during the entire experimental period). The animals were fed with a commercial diet and supplemented with FOS or saline via gavage for 10 days. Mucositis was induced with a single intraperitoneal injection (300 mg/kg) of 5-FU on the seventh day. After 72 hours of injection, the mice were anesthetized and euthanized, and the material was collected for the analyses. Before the induction of mucositis, no changes in food intake and weight variation were observed in all groups ( $p > 0,05$ ). However, after the induction of mucositis a reduction of both parameters were observed for the MUC group ( $p < 0,05$ ) and the supplementation with FOS was not able to prevent the reduction in consumption and weight loss. The animals that received FOS showed physiological levels of intestinal permeability (IP) in both treatments. The PT and TT groups showed a reduction in bacterial translocation (BT) in relation to the MUC group ( $p < 0,05$ ). The results of IP and BT are in agreement with the histological data that showed partial preservation of the intestinal architecture in the ileum with maintenance of the villi height and depth of the crypts in the animals that received the pretreatment and total treatment. The analysis of the tight junctions showed that the two modalities of treatment were able to preserve the production of this protein also preventing IP and BT. There was an increase in the activities of MPO and EPO in the MUC group ( $p < 0,05$ ) in relation to the other groups and both treatments were able to prevent the inflammatory infiltrate. The analysis of IL-10 cytokine showed no difference between the groups ( $p > 0.05$ ) and TNF- $\alpha$  concentration

showed a significant reduction in the groups with mucositis ( $p < 0,05$ ). The supplementation with FOS was able to increase the production of short-chain fatty acids (SCFA), but the animals with mucositis that received the treatments presented levels of acetate and butyrate similar to the MUC group ( $p > 0,05$ ), the propionate concentration in PT and TT groups was similar to the control ( $p > 0,05$ ). The concentration of sIgA was reduced in the group MUC and TT showed similar levels to CTL ( $p < 0,05$ ). The total treatment was able to maintain the mucus production similar to the control group, as well as the production of sIgA besides presenting greater preservation of the mucosa in the histological analysis, promoting beneficial effects on the intestinal mucositis showing higher efficacy when compared to pretreatment modalities.

Keywords: Mucosite intestinal.5-fluorouracil. Fructo-oligosaccharides. Prebiotics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Vilosidades e criptas.....	20
Figura 2. Estrutura química do 5-FU.....	26
Figura 3. Mecanismo de citotoxicidade e metabolismo do 5-FU. ....	27
Figura 4. Fases da mucosite. ....	29
Figura 5- Estrutura química do FOS .....	34
Figura 6. Ação dos prebióticos .....	37
Figura 7. Delineamento experimental.....	44
Figura 8. Variação de peso antes da indução da mucosite (1º ao 6º dia).....	57
Figura 9. Variação da perda de peso após a indução da mucosite (7º ao 10º dia).....	57
Figura 10. Variação do consumo alimentar pré mucosite (1º ao 6º dia) e variação do consumo alimentar após a indução da mucosite (7º ao 10º dia).....	58
Figura 11. Permeabilidade intestinal 72 horas após a indução da mucosite.....	59
Figura 12. Análise histológica do íleo .....	61
Figura 13. Escore histológico .....	62
Figura 14. Análise morfométrica.....	63
Figura 15 . Análise Histológica Muco .....	64
Figura 16. Análise da secreção de muco .....	64
Figura 17. Expressão gênica de Zonula occludens-1 e Ocludina no íleo.....	65
Figura 18. Infiltrado inflamatório no íleo .....	66
Figura 19. Dosagem de sIgA intestinal.....	66
Figura 20. Concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-10 e razão TNF- $\alpha$ /IL-10.....	68
Figura 21. Dosagem de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes.....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1- Classes de prebióticos .....</b>	<b>32</b>
<b>Tabela 2. Conteúdo de FOS em alimentos .....</b>	<b>36</b>
<b>Tabela 3 - Escore histológico .....</b>	<b>48</b>
<b>Tabela 4 - Sequência dos nucleotídeos utilizados para o PCR em tempo real..</b>	<b>52</b>
<b>Tabela 5 - Biodistribuição da <sup>99m</sup>Tc-E.coli .....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®	Marca registrada
%	Percentual
5-FU	5-Fluorouracil
<sup>99m</sup> Tc	Tecnécio-99m
<sup>99m</sup> Tc - DTPA	DTPA marcado com tecnécio-99m
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Agriculture Chemists</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG
cm/s	Centímetros por segundo
cpm	Contagens por minuto
CTL	Controle
CTI	Células tronco intestinais
DC	Doença de Crohn
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRI	<i>Dietary Reference Intakes</i>
DTPA	Ácido dietileno-triaminopentacético
EPO	Peroxidase de eosinófilos
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FD	Fibra dietética
FdUMP	5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato
FdUTP	Fluorodeoxiuridina trifosfato
FOS	Frutooligossacarídeos
FUTP	Fluorotrifosfato
g	Gramas
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino
GLP-2	Glucagon peptídeo-2
GOS	Galactooligossacarídeos
HE	Hematoxilina e eosina
HETAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
HMOs	Oligossacarídeos do leite humano
IECs	Células epiteliais intestinais
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
IP	Injeção intraperitoneal
Kg	Kilogramas
MBq	Megabecquerel
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MMLVRT	Transcriptase reversa
MPO	Mieloperoxidase
MUC	Mucosite
m/z	Razão massa (m) sobre a carga (z)
Na	Sódio
NF-κB	Fator nuclear – Kappa B
Nm	Nanômetro

<b>Ng</b>	Nano grama
<b>OD</b>	Densidade óptica
<b>OPD</b>	Ofenilenediamina diidrocloreto
<b>PAMPS</b>	Moléculas padrões associadas aos patógenos
<b>PAS</b>	Ácido periódico- <i>Schiff</i>
<b>PBS</b>	Solução de tampão fosfato
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PI</b>	Permeabilidade Intestinal
<b>PT</b>	Pré-tratamento
<b>PRRs</b>	Receptores de reconhecimento padrão
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>Rpm</b>	Rotações por Minuto
<b>SACN</b>	<i>The UK Scientific Advisory Committee on Nutrition's</i>
<b>SHIME</b>	<i>Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem</i>
<b>SII</b>	Síndrome do intestino irritável
<b>TLRs</b>	Receptores do tipo <i>Toll-like</i>
<b>TT</b>	Tratamento total
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TOS</b>	Trans-galacto-oligossacarídeos
<b>TRL</b>	Receptores <i>Toll-like</i>
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colônia
<b>UFMG</b>	Universidade federal de Minas Gerais
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrômetro
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b>XOS</b>	Xilooliogossacarídeos
<b>ZO</b>	Zona ocludente

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 Barreira intestinal</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 Microbiota Intestinal</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3 5-FU e mucosite</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4 Prebióticos</b> .....	<b>30</b>
<b>2.4.1 Frutooligossacarídeos</b> .....	<b>33</b>
<b>2.4.2 Mecanismos de ação</b> .....	<b>36</b>
<b>2.4.3 AGCC</b> .....	<b>38</b>
<b>2.4.4 Modulação imunológica</b> .....	<b>40</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	<b>42</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>42</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1 Animais</b> .....	<b>43</b>
<b>4.2 Prebiótico</b> .....	<b>43</b>
<b>4.3 Modelo experimental de mucosite intestinal</b> .....	<b>44</b>
<b>4.4 Consumo alimentar</b> .....	<b>45</b>
<b>4.5 Variação ponderal</b> .....	<b>45</b>
<b>4.6 Avaliação da permeabilidade intestinal</b> .....	<b>45</b>
<b>4.7 Avaliação da translocação bacteriana</b> .....	<b>46</b>
<b>4.8 Análises histológicas</b> .....	<b>47</b>
<b>4.9 Células Caliciformes</b> .....	<b>49</b>
<b>4.10 Análise da expressão gênica de proteínas da junção firme</b> .....	<b>50</b>
<b>4.11 Avaliação de parâmetros imunológicos</b> .....	<b>52</b>
<b>4.12 Análise de AGCC</b> .....	<b>55</b>
<b>4.13 Análises estatísticas</b> .....	<b>56</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>56</b>
<b>5.1 Variação ponderal e consumo alimentar</b> .....	<b>56</b>
<b>5.2 Permeabilidade intestinal</b> .....	<b>58</b>
<b>5.3 Avaliação da translocação bacteriana</b> .....	<b>59</b>
<b>5.4 Análises histológicas</b> .....	<b>60</b>
<b>5.5 Análise da secreção de muco</b> .....	<b>63</b>
<b>5.6 Análise da expressão gênica de proteínas da junção firme</b> .....	<b>65</b>

5.7	Avaliação do infiltrado inflamatório.....	65
5.8	Avaliação da sIgA intestinal .....	66
5.9	Concentrações de IL-10 e TNF- $\alpha$ no íleo .....	67
5.10	Dosagem de AGCC nas fezes.....	68
6.	DISCUSSÃO.....	71
7.	CONCLUSÃO .....	81
8.	PERSPECTIVAS .....	82

## 1. INTRODUÇÃO

A mucosite é efeito colateral comum em pacientes submetidos ao tratamento de câncer por quimioterapia e radioterapia, e é caracterizada por inflamação e danificação da mucosa do trato gastrointestinal (TGI), afetando mais comumente a boca e o intestino delgado (MAIOLI, 2014; YU et al., 2017). A mucosite gastrointestinal está diretamente associada a sintomas como dor, ulceração, distensão abdominal, náusea, vômito, diarreia e constipação. Estes fatores aumentam o risco de infecções sistêmicas, podendo levar a desnutrição, bem como a descontinuidade do tratamento, diminuindo as chances de cura (THORPE; M.; J., 2013; ZHANG et al., 2018c), além de reduzir a qualidade de vida destes pacientes.

O 5-Fluorouracil (5-FU) é antimetabólico que atua inibindo processos de biossíntese essenciais. O 5-FU incorpora-se a macromoléculas como o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA), impedindo desta forma o funcionamento normal (LONGLEY; JOHNSTON, 2003). É um dos quimioterápicos mais utilizados no tratamento de câncer, têm sido reportado que aproximadamente 80% dos pacientes tratados com esta droga desenvolvem mucosite intestinal (ZHANG et al., 2018b). A quimioterapia inicia a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ , o que amplifica os danos intestinais. (DE SANCTIS et al., 2019; HAMOUDA et al., 2017; SMITH et al., 2008).

As opções de tratamentos existentes para o controle da mucosite são limitadas, e em sua maioria não promovem o reparo da mucosa. Antimicrobianos, antibióticos e analgésicos são usados para aliviar os sintomas ocasionados pela inflamação. Por isso, são necessárias novas terapias que promovam este reparo sem comprometer os efeitos citotóxicos do tratamento antineoplásico (SMITH et al., 2008; WANG; S.; S., 2014).

Além disso, as investigações com foco na microbiota intestinal têm demonstrado o papel central deste componente como elemento regulador do hospedeiro, tanto fisiologicamente quanto patologicamente. A microbiota contribui para o desenvolvimento do sistema imune modulando a imunidade inata e adaptativa. A

utilização de pré, pró e simbióticos tem sido relatada como forma de modular a microbiota. Esta modulação contribui para a homeostase intestinal durante processos inflamatórios como a mucosite (CUI et al., 2017; MAZMANIAN et al., 2005; RAJKUMAR et al., 2015).

Prébióticos são carboidratos que não são digeridos ou absorvidos no TGI (Trato gastrointestinal) superior, sendo assim fermentados por espécies benéficas de bactérias intestinais ao atingirem o cólon (KOLEVA et al., 2014; SMITH et al., 2008). A fermentação leva a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que estimulam a proliferação de células do epitélio intestinal e aumentam a absorção de água e eletrólitos (VANDEPUTTE et al., 2017). Os prébióticos como os fruto-oligossacarídeos (FOS) têm demonstrado boa ação terapêutica nas infecções intestinais. Os seus maiores efeitos ocorrem sobre o epitélio colônico, estimulando a proliferação das criptas, aumentando a concentração de poliaminas, modificando o perfil de mucinas e modulando a função imunológica (TSUDA et al., 2017).

FOS são polímeros de glicose lineares, estão presentes em algumas plantas comestíveis e são produzidos por espécies de *Lactobacillus* em cereais fermentados (SMITH et al., 2008). O efeito protetor do FOS é associado ao estímulo de crescimento de *Bifidobacterium* e algumas espécies de *Lactobacillus*, desta maneira reduzindo a quantidade de outras bactérias patogênicas contribuindo para manutenção da microbiota com consequente produção de AGCC capazes de beneficiar a mucosa (DENIPOTE; MORAES; CARLOS, 2010; KOLEVA et al., 2014; PASCHOAL, 2008)

Evidências anteriores e, também, em estudo recente realizado pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que o FOS apresentou efeito benéfico na modulação da resposta inflamatória e melhorou a arquitetura da mucosa (GALDINO et al., 2018). A proposta deste trabalho é investigar outros parâmetros histológicos/inflamatórios e uma nova modalidade de tratamento, o tratamento total, sobre as respostas inflamatórias intestinais induzidas pelo 5-FU. Desta forma, esperando contribuir para uma opção alternativa de tratamento adjuvante no sentido de minimizar ou até evitar os sinais e sintomas da mucosite.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

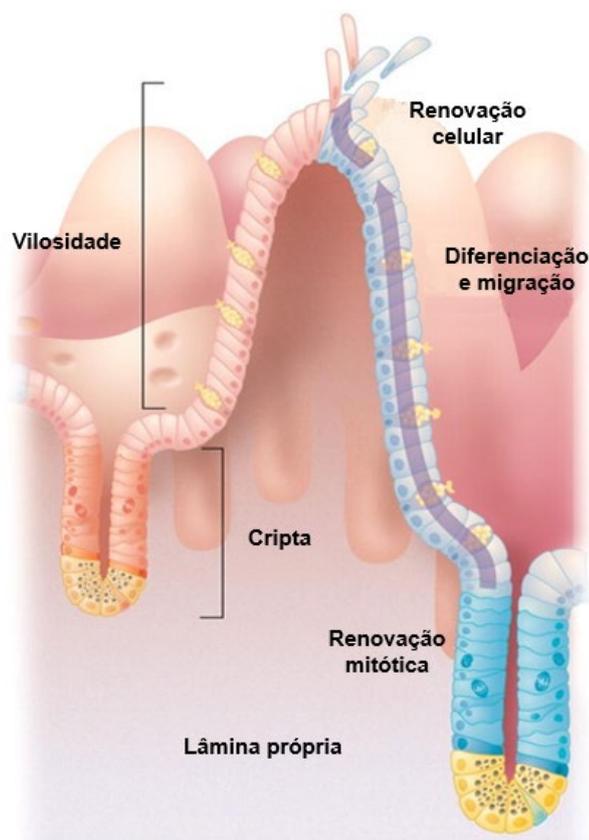
### 2.1 Barreira intestinal

O trato gastrointestinal tem área total de aproximadamente 200 metros quadrados, esta superfície está exposta a grandes quantidades de antígenos, sendo separadas destes por somente uma fina camada de células, o epitélio intestinal. Esses tecidos são essenciais para a vida e, por isso, requerem proteção contínua e efetiva contra invasão de agressores, tornando essencial a presença de um complexo sistema de defesa. A primeira linha de defesa gastrointestinal é encontrada no lúmen, o pH gástrico e as secreções pancreáticas e biliares ajudam na digestão e exercem efeitos catalíticos e tóxicos sobre microrganismos e antígenos. A superfície da mucosa intestinal é recoberta por uma camada de mucinas e lipídeos que limitam a exposição das células epiteliais a partículas presentes no lúmen e exercem papel importante na mediação do transporte de moléculas através da membrana. (GRAZIANI et al., 2019; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; ORIÁ et al., 2016).

O epitélio intestinal é composto por uma camada única de células, estas diferem em sua arquitetura no intestino grosso e no delgado. A monocamada epitelial forma uma interface entre o conteúdo luminal e o tecido intersticial que previne a difusão de potenciais fatores prejudiciais do lúmen gastrointestinal para os tecidos e eventualmente para a circulação sistêmica (RAO; SAMAK, 2013). A superfície do epitélio é constantemente renovada por células tronco intestinais pluripotentes. Morfologicamente, uma das principais características do intestino delgado é a existência de vilosidades e de criptas em sua arquitetura (Figura 1). As vilosidades se estendem para o lúmen intestinal e são revestidas por uma só camada de epitélio colunar que contém células terminalmente diferenciadas, estas não estão presentes no cólon. As criptas são invaginações epiteliais na mucosa do intestino, responsáveis pelo potencial proliferativo deste tecido (ALLAIRE et al., 2018; ORIÁ et al., 2016; SCHNEEBERGER et al., 2018).

Nas criptas estão presentes as células-tronco intestinais (CTI), que possuem duas propriedades funcionais: a capacidade de se perpetuar ao longo de um período prolongado (autorrenovação) e a capacidade de gerar todas as células diferenciadas

do tecido de origem (multipotência). Assim, são responsáveis por promover a constante renovação da população celular do epitélio intestinal. Adjacentes ao epitélio intestinal estão um complexo de células que formam a lâmina própria, a submucosa e a camada muscular (ORÍÁ et al., 2016; SPENCE; LAUF; SHROYER, 2011).



**Figura 1. Vilosidades e criptas.**

Fonte: Adaptado de (VAN DER FLIER; HANS, 2009).

As células formadoras do epitélio intestinal, os enterócitos, são células absorptivas. Sua superfície apical apresenta microvilosidades que formam uma borda em escova que contém proteínas necessárias para a absorção e digestão de nutrientes. Além destas, outros tipos de células diferenciadas estão presentes, entre elas: células secretórias como as células caliciformes (goblet), células enteroendócrinas e células de Paneth. As células caliciformes e de Paneth são especializadas em manter a função digestiva e de barreira do epitélio, secretando mucinas e fatores antimicrobianos, respectivamente. Células enteroendócrinas secretam hormônios digestivos regulatórios que atuam no sistema entérico neuroendócrino, e fatores antimicrobianos

que protegem a base das criptas. As células dispersas através do epitélio e lâmina própria compreendem as células efetoras da resposta imune local (ALLAIRE et al., 2018; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; PETERSON; DAVID, 2014; SCHNEEBERGER et al., 2018).

O muco intestinal forma a barreira física do intestino, separando o conteúdo luminal da camada interna de células e apresentando fatores antimicrobianos e IgA. A camada de muco possui propriedades hidrofóbicas e surfactantes. Esta camada contribui para a retenção das secreções da mucosa que são ricas em peptídeos antibacterianos. O muco é formado por duas camadas, uma mais interna, integrada, que protege a superfície das células epiteliais e outra externa menos espessa. Além disso, o muco fornece proteção contra os microrganismos luminiais, como as bactérias, destruindo-as e prevenindo a sua adesão à mucosa e ao epitélio intestinal. A IgA atua como primeira linha de barreira limitando o acesso de antígenos provenientes da dieta e microrganismos na camada mucosa (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; ORIÁ et al., 2016; SCHNEEBERGER et al., 2018; YAMAMOTO et al., 2016)

A IgA é o isotipo de anticorpo de maior abundância no sistema imune de mucosa, é sintetizado principalmente na forma secretada nos tecidos linfoides associados ao intestino (GALT). O receptor polimérico Ig (pIgR), uma proteína integral da membrana, tem o papel de ligar e transportar anticorpos IgA e IgM através da camada de epitélio intestinal além de exercer proteção contra a degradação proteolítica. A IgA secretada também atua neutralizando a invasão de patógenos no tecido intraepitelial. As células caliciformes, além de produzirem mucinas, produzem moléculas capazes de estabilizar os polímeros de mucina mantendo a integridade da barreira (GENDA et al., 2017; GRAZIANI et al., 2019). A IgA presente no lúmen intestinal liga-se à camada de muco que recobre a superfície epitelial, sua retenção próxima à superfície epitelial significa que ela pode prevenir a aderência de microrganismos, assim como neutralizar as toxinas ou enzimas provenientes destes. Além dessa atividade no lúmen intestinal, a IgA neutraliza lipopolissacarídeos bacterianos que penetram nas células epiteliais, exercendo sua principal função que é limitar o acesso de patógenos às superfícies mucosas, sem o risco de dano inflamatório a esses frágeis tecidos (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010)

O epitélio intestinal forma uma barreira física e bioquímica contra microrganismos comensais e patogênicos. A integridade do epitélio gastrointestinal é fundamental para a manutenção desta barreira. Vários fatores contribuem para a manutenção da barreira intestinal dentre eles a ativação do sistema imune, a microbiota intestinal e seu metabolismo, a produção de muco, secreção de peptídeos antimicrobianos, proteínas de junções firmes e o sistema nervoso entérico. A regulação da absorção de nutrientes, permitindo a interação da microbiota com o sistema imune intestinal e a regulação da translocação de bactérias é chamada função de barreira (PETERSON; DAVID, 2014; WILMS et al., 2016).

A função de barreira ou permeabilidade intestinal (PI) também é regulada pelas junções firmes que consistem em complexos formados por proteínas como a ocludina, claudina-1 e zonulina localizadas na porção apical dos enterócitos. O espaço paracelular deve formar uma barreira seletiva e semipermeável, em condições fisiológicas normais (FERREIRA et al., 2012; RAO; G., 2013). As junções entre os enterócitos, junções firmes e de aderência, formadas por proteínas transmembrana, selam o espaço paracelular limitando a permeabilidade entre as células. A ZO-1 interage com a actina do citoesqueleto, com a ocludina, ZO-2 e ZO-3, estas permitem a passagem seletiva paracelular, normalmente impedindo a permeação de macromoléculas hidrofílicas, como as bactérias, contribuindo para a integridade da barreira (BALZAN, 2007; FERREIRA et al., 2012; GRAZIANI et al., 2019; RAO; SAMAK, 2013).

As células do epitélio intestinal são capazes de responder ao estímulo microbiano, desempenhando papel fundamental na função imunomoduladora que influencia o desenvolvimento e a homeostase das células imunes da mucosa, participando assim da coordenação de resposta imune apropriada. O GALT apresenta estrutura anatomicamente compartimentalizada e é o local onde as respostas imunes são iniciadas (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; PETERSON; DAVID, 2014). O GALT é o maior órgão imunológico do corpo humano e está localizado na lâmina própria incluindo células linfoides dispersas no epitélio da mucosa. O maior número de células imunes do corpo estão localizadas no GALT de maneira a garantir a

integridade da barreira intestinal, não permitindo a translocação dos microrganismos da microbiota, e também mantendo a homeostase da microbiota preservando suas funções regulatórias (SONG; GYARMATI, 2019).

A disfunção da integridade da mucosa intestinal leva ao aumento da permeabilidade a compostos alérgenos, toxinas e patógenos, desencadeando uma resposta ao estresse imunológico e à inflamação. Esta disfunção com consequente aumento da permeabilidade, é um fator de risco para o surgimento de doenças gastrointestinais como: síndrome do intestino irritável (SII), doença de Crohn (DC), doença celíaca, enterocolite, alergias alimentares entre outras (GRAZIANI et al., 2019; PETERSON; DAVID, 2014). A manutenção da função de barreira intestinal é imperativa para manter a homeostase intestinal e depende de fatores como, microbiota intestinal saudável, camada de muco normal e secreção de IgA e outras células imunes. A integridade desta barreira é um mecanismo de defesa assim como as secreções epiteliais, células imunocompetentes e um fluxo adequado de sangue na mucosa (BALZAN, 2007; RAO; SAMAK, 2013).

## **2.2 Microbiota Intestinal**

A microbiota é um potencial modificador de risco na etiologia de várias patologias incluindo Síndrome do Intestino Irritável (SII), diabetes tipo 2 entre outras que estão relacionados a distúrbios da composição da microbiota. A microbiota localizada no trato gastrointestinal promove o desenvolvimento de sinais reguladores pró e anti-inflamatórios o que promove tolerância imunológica e metabólica. Cada indivíduo possui uma microbiota única, que tem sua composição influenciada por diversos fatores, entre eles, fatores genéticos e fisiológicos, histórico de colonização, fatores ambientais e uso de medicamentos (DEN BESTEN et al., 2013; SO et al., 2018; VITETTA et al., 2014).

Existem aproximadamente 100 trilhões de bactérias no trato gastrointestinal humano, estudos recentes têm demonstrado que o número de bactérias em nosso corpo é maior que o número de células. A maior parte destes microrganismos habita o cólon e são em sua maioria bactérias anaeróbicas, que podem sobreviver na ausência de

oxigênio (ALLAIRE et al., 2018; PHAM; MOHAJERI, 2018). Estas bactérias comensais formam uma complexa rede que compõe a microbiota intestinal, esta pode ser considerada como um órgão externo, desempenhando papel importante na fisiologia e no metabolismo do hospedeiro, assim como nas respostas imunes. Os genes destes microrganismos, o microbioma intestinal, apresentam 100 vezes mais genes que o genoma humano (ALLAIRE et al., 2018; CATRY et al., 2018).

A distribuição de células bacterianas no trato gastrointestinal não é homogênea, apresentando baixa concentração no estômago e duodeno ( $10^1$  a  $10^3$  bactérias por grama), aumentando para  $10^4$  a  $10^7$  bactérias por grama no jejuno e a maior concentração ( $10^{11}$  a  $10^{12}$  bactérias por grama) sendo encontrada no cólon, que contém 70% de todos os microrganismos do corpo humano (PHAM; MOHAJERI, 2018). Esta microbiota é crucial para a saúde humana, agindo de forma simbiótica com o hospedeiro para melhorar a integridade intestinal, o metabolismo, além de competir com microrganismos patogênicos (COLLINS; GREGOR, 2016; DAVANI-DAVARI et al., 2019b).

Variações na composição da microbiota entre os indivíduos são influenciadas por vários fatores como idade, gênero, dieta, doenças, uso de medicação e ambiente onde vivem. Durante os primeiros anos de vida a microbiota é formada e sua composição sofre influência de fatores como saúde materna, tipo de parto, idade gestacional, tipo de amamentação e uso de antibióticos no período perinatal. A grande diversidade da microbiota inclui não somente bactérias, mas também os fungos *Archaea*. A maior parte das bactérias da microbiota são dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* seguidos por *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Fusobacteria* (DEN BESTEN et al., 2013; GRAZIANI et al., 2019; PHAM; MOHAJERI, 2018; WATKINS et al., 2017).

A microbiota intestinal desempenha diferentes funções, incluindo função metabólica, imunológica e regulação da barreira intestinal, ela desempenha papel fundamental no equilíbrio da resposta imune no intestino. Cada vez mais vem ganhando importância à medida em que vem sendo descrita como um grande modulador do sistema nervoso central (SNC), reconhecido como o eixo microbiota-intestino-cérebro, um sistema de comunicação bidirecional englobando conexões neurais e sinalização endócrina e

imunológica. Evidências tem demonstrado que o equilíbrio das bactérias comensais no trato gastrointestinal pode estar associado ao desenvolvimento de desordens inflamatórias no intestino (BARRERA-BUGUEÑO et al., 2017; GRAZIANI et al., 2019; HAMER et al., 2008; VITETTA et al., 2014).

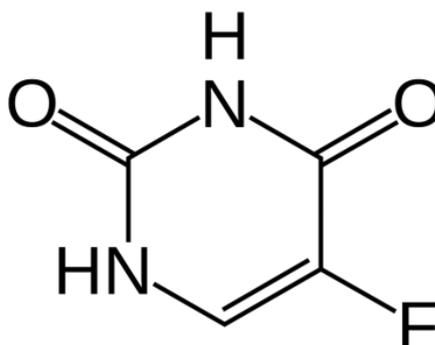
A disbiose pode ser definida como mudança não natural na composição da microbiota que está associada ao desequilíbrio entre bactérias protetoras e nocivas. Várias doenças inflamatórias intestinais têm sido relacionadas com a homeostase da microbiota, a diminuição dos sintomas ocorre quando há uma microbiota equilibrada (LOCKYER; STANNER, 2019).

### **2.3 5-FU e mucosite**

O câncer é uma doença complexa, caracterizada pelo crescimento descontrolado de células, é uma das principais causas de mortalidade no mundo. A quimioterapia e a radioterapia são os tratamentos mais comuns. A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) pelo tratamento, leva ao dano e morte de células epiteliais saudáveis com consequente liberação de mediadores induzindo o processo inflamatório. Os efeitos adversos causados reduzem a qualidade de vida dos pacientes podendo levar a descontinuidade do tratamento, além de aumentar o risco de infecções (CEREDA; CARACCIA; CACCIALANZA, 2018; DE MIRANDA et al., 2019; ZHANG et al., 2018a).

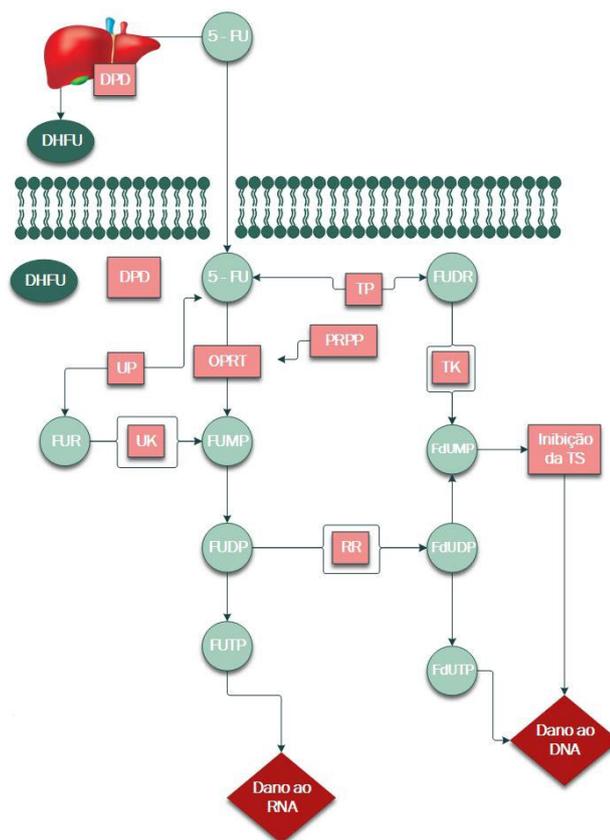
Uma classe destes quimioterápicos, as fluoropirimidinas foram desenvolvidas na década de 1950, quando observou-se que tumores hepáticos, em ratos, usavam a pirimidina uracila, uma das bases do RNA, mais rapidamente que os tecidos normais, indicando que o metabolismo da uracila seria um potencial alvo para a quimioterapia antimetabólica. O 5-fluorouracil, que é uma fluoropirimidina, é amplamente utilizado no tratamento de tumores malignos, devido a sua capacidade de erradicar tumores e apresentar altas taxas de sobrevivência (LONGLEY; JOHNSTON, 2003; SAKAI et al., 2014a). Drogas antimetabólicas funcionam inibindo processos essenciais de biossíntese ou sendo incorporadas em macromoléculas como o RNA e DNA inibindo sua função normal (SONIS, 2004).

O 5-fluorouracil é um análogo da uracila com um átomo de flúor na posição cinco no lugar de uma molécula de hidrogênio (Figura 2). É amplamente utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo câncer gastrointestinal, cabeça, mama e pescoço. Sua utilização pode causar danos intestinais como a degradação da barreira intestinal devido a apoptose de células das criptas e diminuição da proliferação de enterócitos (LONGLEY; JOHNSTON, 2003; ZHANG et al., 2018c).



**Figura 2. Estrutura química do 5-FU.**

As drogas quimioterápicas agem não somente nas células tumorais, mas também em células de replicação rápida, gerando efeitos adversos em tecidos normais. A toxicidade intestinal é um dos sintomas mais comuns dos quimioterápicos, particularmente do 5-FU, que é rapidamente convertido em vários metabólitos: 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) e fluorotrifosfato (FUTP) (Figura 3), estes compostos causam danos na síntese de DNA. Os danos intestinais causados pelo 5-FU incluem o comprometimento da integridade da mucosa, encurtamento das vilosidades e perda da estrutura das criptas, e aumento nos níveis de mediadores inflamatórios tudo isso leva ao desenvolvimento da mucosite gastrointestinal que é consequência desta resposta inflamatória, ocasionando má absorção intestinal. Além disso, o 5-FU compromete a funcionalidade de células imunes, resultando em translocação bacteriana do lúmen intestinal para o sangue e tecidos (LONGLEY; JOHNSTON, 2003; SAKAI et al., 2014b; SCULLY; JOEL; STEPHEN, 2004; ZHANG et al., 2018c).



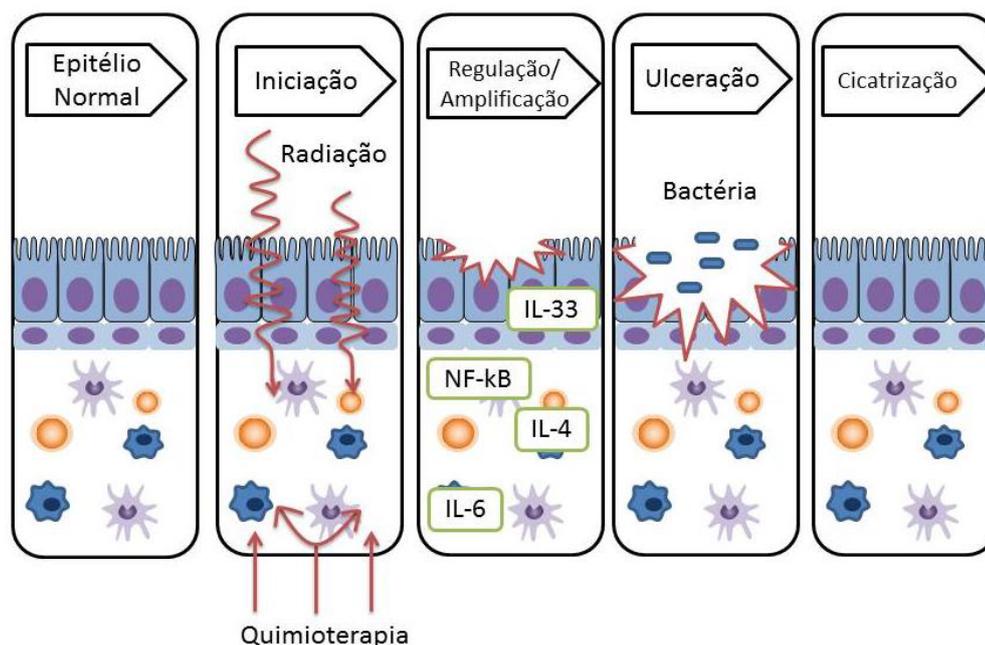
**Figura 3. Mecanismo de citotoxicidade e metabolismo do 5-FU.**

Fonte: Adaptado de (LONGLEY; JOHNSTON, 2003).

Segundo Sonis (2004), cinco fases (Figura 4) são importantes na fisiopatologia da mucosite:

- (I) **Iniciação:** após a administração do quimioterápico ocorre a lesão tecidual, levando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, levando a lesão celular do epitélio basal, endotélio e submucosa (SONIS et al., 2004).
- (II) **Resposta primária ao dano:** devido aos danos causados ao DNA e produção de EROS e a ativação de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B (SONIS, 2002), se transmitem sinais dos receptores da superfície celular para o interior da célula. Isto leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 que são capazes de aumentar a lesão tecidual e induzir a apoptose celular (CHANG et al., 2012) sugerem que a supressão do NF- $\kappa$ B, principal molécula envolvida na mucosite induzida por 5-FU, inibe a inflamação e melhora o dano à mucosa.

- (III) **Amplificação do sinal:** amplificação de moléculas mensageiras, tais como TNF- $\alpha$ . Além de causar danos nos tecidos as citocinas pró-inflamatórias produzidas ativam outras vias de sinalização, ativando fatores de transcrição, como as proteínas quinases ativados por mitógeno (MAPK), o fator p21 e a protease caspase 3, envolvidos no processo inflamatório e na apoptose celular tecidual (SCULLY; JOEL; STEPHEN, 2004; SONIS, 2004).
- (IV) **Ulceração:** ocorre a descontinuidade da barreira epitelial como resultado da apoptose, com importante infiltrado de células inflamatórias. Há um aumento da permeabilidade intestinal, permitindo assim a translocação bacteriana. Outras alterações como a ablação das criptas e atrofia das vilosidades também aparecem nesta fase, levando a diminuição da área absorptiva, diminuição da produção de enzimas e alterações na microbiota (SONIS, 2004). Nesta fase o paciente sente dor, desconforto gastrointestinal e apresenta risco de sepse e bacteremia (SONIS, 2009; STRINGER et al., 2009).
- (V) **Cicatrização:** Esta fase final ocorre dentro de aproximadamente duas semanas após interrupção do tratamento, sendo um processo espontâneo de auto recuperação do epitélio, reparando a mucosa e reestabelecendo a microbiota (LALLA; T.; E., 2008; YEUNG et al., 2015). A reparação do epitélio se dá por meio da proliferação e diferenciação de tecidos e células a partir de sinalização da matriz extracelular da submucosa.



**Figura 4. Fases da mucosite.**  
 Fonte: Adaptado de (SONIS, 2004).

A ativação do NF-κB, um sinalizador que regula a atividade de citocinas e outras defesas biológicas, é estimulada pelo 5-FU, assim como o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (ANDRADE et al., 2015; SAKAI et al., 2013). A mucosite gastrointestinal induzida pelo quimioterápico 5-FU é um efeito colateral comum que ocorre em pacientes em tratamento do câncer, é consequência de uma resposta inflamatória anormal que leva a má absorção e disfunções intestinais e está relacionada a alterações na permeabilidade intestinal causando translocação bacteriana e mudanças imunológicas intestinais (FERREIRA et al., 2012; SAKAI et al., 2014a; ZHANG et al., 2018c). Esta enfermidade também está relacionada ao aumento nos custos do tratamento, maior período de hospitalização, risco de infecções, além de reduzir a eficiência do tratamento pela diminuição da dose ou descontinuidade do mesmo (LOGAN et al., 2009).

O uso de quimioterápicos causa apoptose de células intestinais, o que leva a perda da arquitetura da mucosa, com alteração das vilosidades e criptas. Isto pode afetar a PI. Prebióticos têm sido propostos como uma intervenção promissora para a melhora da barreira intestinal, visto que seus efeitos favorecem a manutenção das células

formadoras do epitélio (HONG et al., 2019; SCHOLTENS et al., 2008; TOUCHEFEU et al., 2014)

## 2.4 Prebióticos

O consumo de fibras dietéticas (FD) na alimentação tem sido relacionado à redução da incidência de câncer de cólon, além de outros benefícios para a saúde humana. Fibras alimentares são definidas como carboidratos não digeríveis que beneficiam o funcionamento intestinal, não apresentam valor nutritivo (GIDLEY; YAKUBOV, 2019). Como demonstrado em estudos epidemiológicos, um maior consumo de fibras está associado a menor risco de desenvolver doenças inflamatórias intestinais, doenças cardiovasculares e diabetes. A quantidade e tipo de FD da dieta afeta a composição da microbiota. As substâncias prébioticas são consideradas fibras alimentares (DEN BESTEN et al., 2013; LOCKYER; STANNER, 2019; RAJU et al., 2015). Estudos têm demonstrado que o consumo de prebióticos resulta em múltiplos benefícios para a saúde, incluindo prevenção de alergias, melhoria do trânsito intestinal, modulação imunológica e diminuição do risco de câncer (LIU et al., 2015; SO et al., 2018).

Atualmente, todos os prebióticos são considerados tipos de fibras alimentares, apesar de nem todas as fibras serem consideradas prebióticos. *The UK Scientific Advisory Committee on Nutrition's* (SACN), revisou a evidência de benefícios das fibras para a saúde em 2015. Esta revisão resultou no aumento da recomendação de ingestão de fibras de 24g/dia (*Association of Official Agriculture Chemists* -AOAC) para 30g/dia para adultos (SACN 2015) (LOCKYER; STANNER, 2019). No Brasil são adotadas as DRIs (*Dietary Reference Intakes*) que recomendam entre 25 e 38g/dia de fibras para adultos (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2002).

O conceito de prebióticos, como sendo um ingrediente alimentar não digerível que possui efeito benéfico para a saúde do hospedeiro que estimula, seletivamente, o crescimento e atividade de bactérias no cólon, foi introduzido em 1995 pela primeira vez por Glenn Gibson e Marcel Roberfroid (GIBSON; ROBERFROID, 1995), o interesse no uso de prebióticos surgiu a partir da descoberta que os oligossacarídeos do leite humana (HMOs) são importantes para o desenvolvimento da microbiota do bebê (LOCKYER; STANNER, 2019; VANDEPUTTE et al., 2017). Desde então, vários

estudos têm demonstrado o papel dos prebióticos, especialmente os frutooligossacarídeos (FOSs), em vários distúrbios fisiológicos, incluindo alterações de colesterol e desordens intestinais. Prebióticos parecem exercer seus efeitos por meio de vários mecanismos e estudos têm demonstraram evidências clínicas e experimentais da ação benéfica da suplementação com prebióticos em diversas doenças, como síndrome metabólica, hipercolesterolemias e hiperglicemia (LOCKYER; STANNER, 2019; YASMIN et al., 2015).

Os prebióticos não apresentam efeitos colaterais severos. Os efeitos colaterais são resultado da sua ação osmótica, podendo ocorrer diarreia osmótica, distensão abdominal, cólicas e flatulência. O comprimento da cadeia dos prebióticos influencia diretamente a ocorrência dos efeitos colaterais. Cadeias curtas como a da inulina, apresentam maiores efeitos colaterais, a possível explicação para este fato é que moléculas de cadeia mais curta são metabolizadas primariamente no cólon proximal sendo assim fermentadas mais rapidamente. Enquanto oligossacarídeos de cadeias mais longas são fermentados tardiamente no cólon distal. Além disto, a dose do prebiótico também afeta o aparecimento de efeitos colaterais. Frutooligossacarídeos (FOS), galacto-oligossacarídeo (GOS) e trans-galacto-oligossacarídeos (TOS) são os prebióticos mais comuns utilizados atualmente (DAVANI-DAVARI et al., 2019b; SVENSSON; HÅKANSSON, 2014).

O conceito de prebióticos expandiu nos últimos anos, a definição mais recente diz que prebióticos são “ingredientes alimentares não digeríveis, seletivamente fermentáveis, que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon, desta maneira conferindo benefícios a saúde do hospedeiro” (DAVANI-DAVARI et al., 2019b; GIBSON et al., 2017). De acordo com este conceito uma substância para ser considerada prébiotica, deve ter seu efeito demonstrado *in vitro* e impreterivelmente *in vivo*, e se enquadrar nos seguintes critérios: ser resistente ao pH ácido estomacal não sendo hidrolisada por enzimas e não ser absorvida no trato gastrointestinal, ser fermentada pela microbiota intestinal e estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias intestinais levando a melhora na saúde do hospedeiro (DAVANI-DAVARI et al., 2019a).

Ao contrário dos probióticos que requerem uma administração exógena, os prebióticos estão presentes na dieta e sua ação está relacionada aos microrganismos já existentes no hospedeiro. Uma grande variedade de compostos tem sido estudada por seu efeito prebiótico. Tri, di e até mesmo monossacarídeos podem ser utilizados pelo organismo como prebióticos desde que apresentem em sua composição cadeias não digeríveis (COLLINS; GREGOR, 2016; SVENSSON; HÅKANSSON, 2014).

**Tabela 1- Classes de prebióticos**

<b>FRUTANOS</b>	Inulina e FOS. A estrutura é uma cadeia linear de frutose com ligação (2→1)
<b>GALACTO-OLIGOSSACARÍDEOS (GOS)</b>	São produtos da extensão da lactose, divididos em dois subgrupos: GOS com excesso de galactose em C <sub>3</sub> , C <sub>4</sub> ou C <sub>6</sub> e GOS manufaturado a partir da lactose através de trans-glicosilação enzimática
<b>AMIDOS</b>	Amidos que não sofrem digestão intestinal conhecido como amido resistente (AR), produzem butirato ao sofrer fermentação.
<b>OUTROS OLIGOSSACARÍDEOS</b>	alguns oligossacarídeos são originados de um polissacarídeo conhecido como pectina

Fonte: Adaptado de (DAVANI-DAVARI et al., 2019b).

O consumo de prebióticos é mais seguro que o uso de probióticos para a saúde humana, principalmente em indivíduos imunossuprimidos, visto que probióticos são microrganismos que podem atravessar a barreira intestinal. O uso de probióticos pode acarretar infecções sistêmicas, estímulo imunológico excessivo e transferência de genes. Os prebióticos, além de não apresentarem o risco de translocação, tem menor custo em relação aos probióticos e são relativamente mais fáceis de serem incorporados na dieta (CHEN et al., 2017; DAVANI-DAVARI et al., 2019b).

É amplamente aceito que dietas com poucas fibras podem levar a efeitos adversos na microbiota, visto que as fibras são nutrientes chaves para um microbioma saudável, agindo como substrato para a fermentação microbiana (LOCKYER; STANNER, 2019). Tem sido demonstrado em estudos com camundongos e humanos, que o consumo aumentado de fibras, o que inclui os prebióticos, induz a maior produção de AGCC pelas bactérias intestinais. Estes produtos da fermentação atenuam as injúrias no epitélio e diminuem a inflamação intestinal, diminuindo a permeabilidade (GRAZIANI et al., 2019; SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005; VINOLO et al., 2011).

O uso de prebióticos tem demonstrado potencial para reduzir os distúrbios causados na microbiota intestinal com consequente melhoria nos processos intestinais, visto que sua ação principal é atribuída a regulação imunológica e produção de metabólitos de bactérias (WILSON; WHELAN, 2017).

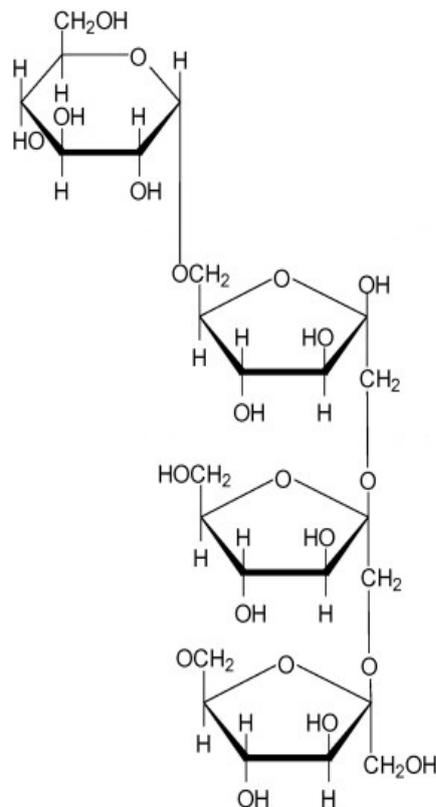
## **2.4.1 Frutooligossacarídeos**

### **2.4.1.1 Definição**

O FOS (Figura 5) e a inulina pertencem a classe de carboidratos denominados frutanos. Frutano é um termo genérico empregado para descrever todos os oligo ou polissacarídeos de origem vegetal e refere-se a qualquer carboidrato em que uma ou mais ligações frutossil-frutose predominam dentre as ligações glicosídicas. Os frutanos são polímeros de frutose linear ou ramificada ligados por ligações  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) ou  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6). FOS apresenta grau de polimerização (DP) entre 7 e 8, com moléculas de frutose e seus resíduos com uma molécula terminal de glicose (AKBARI et al., 2017; KYAZZE et al., 2008).

Frutanos são compostos principalmente de cadeias de unidades de frutose com uma molécula de frutose terminal, FOS e inulina são os dois principais carboidratos que se enquadram na categoria de frutanos, embora várias outras classes estejam sendo investigadas, como a lactulose, GOS, amidos e outros oligossacarídeos (Tabela 1). Os frutanos são compostos por subunidades de frutose, podendo variar consideravelmente no comprimento da cadeia, e apresentarem ou não uma molécula

de glicose terminal. Os oligômeros de frutose são classificados como Fn ou GFn (n = número de subunidades de frutose, GFn = cadeia de frutose com uma molécula terminal de glicose). O comprimento da cadeia também pode ser classificado pelo grau de polimerização (DP), que representa o número de subunidades de monossacarídeos na cadeia. Esta variação na composição está relacionada a diferentes respostas fisiológicas (LOCKYER; STANNER, 2019; VOGT et al., 2013; WANG; S.; S., 2014; WILSON; WHELAN, 2017).



**Figura 5- Estrutura química do FOS**

Fonte: (DE OLIVEIRA et al., 2011)

A estrutura dos frutanos explica seu efeito bifidogênico (habilidade de estimular o crescimento de bifidobactérias) pois estes carboidratos contêm ligações que são degradadas pela enzima  $\beta$ -frutose 1,6-fructofuranosidase que é produzida pelas bifidobactérias, lactobacillus e bacterioidetes (LOCKYER; STANNER, 2019).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova alegação de propriedade funcional para os FOSs, enquadrando-os dentro da categoria de fibras alimentares. “FOS (prebiótico) contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal. Seu consumo

deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. Esta alegação pode ser utilizada desde que a recomendação de consumo diário do produto pronto para consumo forneça no mínimo 5 g de FOS. A porção deve fornecer no mínimo 2,5 g de FOS. Na tabela de informação nutricional deve ser declarada a quantidade de “fruto-oligossacarídeos (FOS)”, abaixo de fibras alimentares. O uso do ingrediente não deve ultrapassar 30g na recomendação diária do produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante. Quando apresentada isolada em cápsulas, tabletes, comprimidos, pós e similares, deve constar no rótulo do produto a seguinte informação, em destaque e em negrito: “O consumo deste produto deve ser acompanhado da ingestão de líquidos” (ANVISA, 2019).

#### **2.4.1.2 Fontes**

FOS ocorrem naturalmente em mais de 36.000 plantas, como tubérculos, bulbos e raízes de plantas, e podem ser encontrados em alimentos como alcachofra, aspargo, alho e trigo (Tabela 3). São carboidratos de armazenamento e resistem a digestão e absorção no estômago e intestino delgado de humanos, como demonstrado ao serem recuperados inteiramente no final do íleo. Apesar disto sua concentração é muito baixa e é limitada a estações específicas do ano. Estes oligossacarídeos não-digeríveis também são produzidos comercialmente por hidrólise enzimática parcial ou síntese enzimática. A batata Yacon é uma fonte rica em oligofrutanos, apresentando 50 a 70% de sua composição de FOS (NOBRE et al., 2019; SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005; VELEZ et al., 2013).

Atualmente a produção comercial de FOS se dá a partir da sacarose através de reações de transfrutossilacção usando a enzima frutossil-transferase (FTase). A FTase é capaz de produzir FOS transferindo uma das três moléculas de frutose. Vários microrganismos contêm FTase, como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. *Candida* e *Saccharomyces cerevisiae* (DAVANI-DAVARI et al., 2019b; MAO et al., 2019).

**Tabela 2. Conteúdo de FOS em alimentos**

<b>ALIMENTO</b>	<b>FOS (g/100)</b>
PÃO BRANCO	0,11
FEIJÃO	0,22
GRÃO DE BICO	0,07
ASPARGO	0,43
BETERRABA	0,33
BRÓCOLIS	0,79
ALHO	0,92
NECTARINA	0,59
ABACAXI	0,10
MELANCIA	0,20

Fonte: adaptado de (LOCKYER; STANNER, 2019).

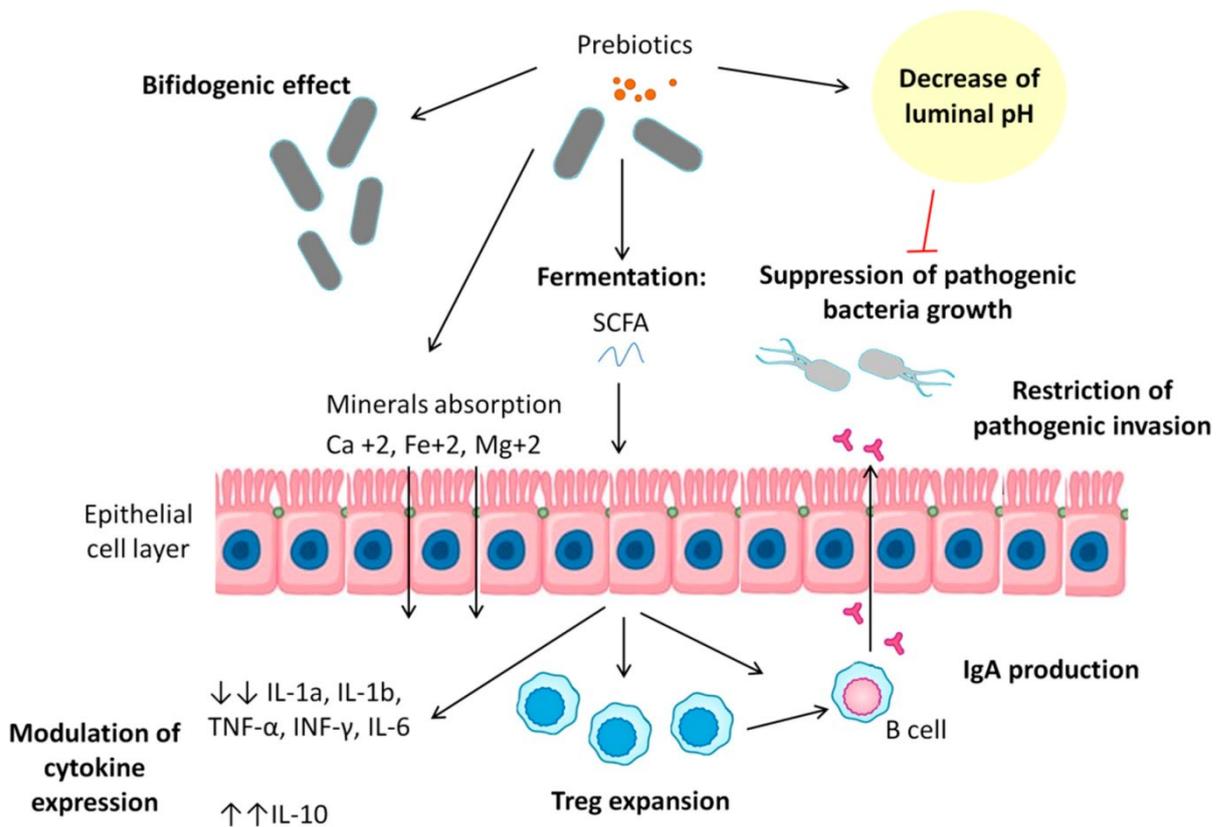
#### **2.4.2 Mecanismos de ação**

A fermentação dos prebióticos pela microbiota intestinal produz ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), incluindo ácido lático, ácido butírico e ácido propiônico, estes podem desempenhar múltiplos efeitos no organismo, como por exemplo o efeito do propionato nas células T helper 2 e nas células dendríticas na medula óssea. A produção de AGCC tem vários efeitos na função intestinal, como a diminuição do pH luminal, estímulo de células proliferativas do epitélio e modificação na composição e espessura da camada de muco. Entre os efeitos benéficos na saúde intestinal, o consumo de prebióticos aumenta a secreção de IgA e de mucinas, importantes para a manutenção da barreira intestinal, além de estimular maior taxa de proliferação de colonócitos (DAVANI-DAVARI et al., 2019b; KOMURA et al., 2014; LEFORESTIER et al., 2009; SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005).

Os prebióticos tem papel de “alimento” para a microbiota intestinal levando a um aumento na concentração de bactérias como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e aumento da capacidade osmótica do lúmen intestinal. Além disso, bactérias produtoras de ácido lático previnem o crescimento e a adesão de microrganismos patogênicos, desta maneira demonstrando um efeito positivo na barreira intestinal. Os produtos da fermentação dos prebióticos, como os AGCC afetam o recrutamento de leucócitos aos locais de inflamação, e suprimem a produção de citocinas pró-

inflamatórias (AKRAM; GARUD; JOSHI, 2019; VANDENPLAS et al., 2011; VOGT et al., 2015).

Prebióticos são capazes de modificar o ambiente intestinal, os produtos de sua fermentação são em sua maioria ácidos, o que leva a diminuição do pH intestinal. Estudos tem demonstrado que a alteração do pH intestinal em uma unidade, de 6,5 para 5,5, contribui para modificar a composição da população da microbiota. A alteração do pH pode alterar a população de espécies sensíveis ao meio ácido, como os *Bacteroidetes*, e promover a formação de butirato por *Firmicutes* (DAVANI-DAVARI et al., 2019b; LI et al., 2017).



**Figura 6. Ação dos prebióticos**

Fonte: adaptado de (CERDÓ et al., 2019).

### 2.4.3 AGCC

Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são ácidos graxos orgânicos saturados voláteis. Estes são produzidos no intestino humano através de fermentação anaeróbica, pela microbiota intestinal, a partir de componentes alimentares provenientes da dieta, que não são absorvidos ou digeridos no intestino delgado, como os polissacarídeos de fibras e carboidratos que não sofrem digestão. São caracterizados por conter de um a seis carbonos em sua cadeia, sendo rapidamente absorvidos e metabolizados no fígado. Os principais AGCC são butirato (C4), propionato (C3) e acetato (C2) somando 95% do total destes ácidos (DEN BESTEN et al., 2013; FERREIRA et al., 2012; RÍOS-COVIÁN et al., 2016; VINOLO et al., 2011).

A microbiota intestinal presente no ceco e intestino grosso produz AGCC a partir de carboidratos que não são metabolizados no intestino delgado, em sua maioria oligossacarídeos. A produção de AGCC varia de 400-600 mmol por dia (DEN BESTEN et al., 2013). A produção de AGCC no intestino é importante para seu funcionamento normal, atuando na absorção de água, produção de energia e também desempenha papel importante na barreira intestinal (PENG et al., 2007). Os AGCC produzidos no cólon são difundidos para a circulação sanguínea através dos enterócitos, sendo encontrados na circulação hepática, portal e periférica, afetando assim outros locais do corpo além do trato gastrointestinal. O filo dos *Bacteroidetes* produz principalmente acetato e butirato, enquanto os *Firmicutes* produzem butirato como principal metabólito (AKRAM; GARUD; JOSHI, 2019; DAVANI-DAVARI et al., 2019b; DEN BESTEN et al., 2013).

Acetato é o AGCC de maior abundância no cólon, compondo mais da metade dos AGCC detectados nas fezes sendo a maior parte produzida por fermentação bacteriana de carboidratos. O butirato presente no lúmen é consumido pelos colonócitos localizados no topo das criptas, sendo capaz de estimular a proliferação celular, inibindo a produção de mediadores inflamatórios e reduzindo a permeabilidade intestinal, além de induzir apoptose em células cancerígenas no cólon. O lactato produzido pela microbiota é um potente indutor de hiperproliferação colônica e é uma importante fonte de energia para as células intestinais, mantendo assim a

capacidade proliferativa e de diferenciação destas. Um dos efeitos na saúde dos AGCC é a diminuição do pH luminal o que inibe microrganismos patogênicos e aumenta a absorção de alguns nutrientes (ALLAIRE et al., 2018; RÍOS-COVIÁN et al., 2016; SO et al., 2018).

Um dos AGCC produzidos pela fermentação dos prebióticos é o butirato, Allaire 2018 observou que níveis baixos de butirato favoreceram o crescimento de bactérias anaeróbicas facultativas, como as Enterobactérias e *Escherichia coli* e diminuiu a quantidade de bactérias anaeróbicas. O butirato foi capaz de regular epigeneticamente a expressão de genes inibindo histonas desacetilases. Isto parece ser o mecanismo de ação que influencia a modulação da microbiota, participando da diferenciação das células T regulatórias periféricas (ALLAIRE et al., 2018; ZHOU et al., 2013).

O pH intestinal tem um efeito importante na composição e na atividade metabólica da microbiota intestinal, afetando importantes enzimas que fermentam os prebióticos, modulando o ambiente intestinal, inibindo ou favorecendo o crescimento e a diferenciação de populações bacterianas específicas. Um pH intestinal baixo resulta na diminuição da população de microrganismos patogênicos além de facilitar o processo de absorção de íons minerais pelo intestino, principalmente cálcio e magnésio, o que produz efeitos benéficos na saúde óssea (PHAM; MOHAJERI, 2018; SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005; VANDENPLAS et al., 2011).

AGCC podem ser metabolizados em glutamato, glutamina e acetoacetato, fontes importantes de combustível para os enterócitos. O butirato eleva os níveis de secreção pancreática e a atividade das enzimas da borda em escova do jejuno, aumentando a disponibilidade de nutrientes para a regeneração de enterócitos, estimulando GLP-2 (glucagon peptideo-2) um hormônio que aumenta a capacidade digestiva e absorptiva (FERREIRA et al., 2012). Tem sido demonstrado na literatura que o butirato pode ocasionar efeitos protetivos contra o risco de desenvolver câncer colorretal, através da ação trófica na barreira intestinal. O equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias também é influenciado pelo butirato, impactando na homeostase intestinal (ALLAIRE et al., 2018; DAVANI-DAVARI et al., 2019b).

A presença de AGCC é essencial para o bom funcionamento da microbiota intestinal. Nas últimas décadas se tornou conhecido que os AGCC podem desempenhar um papel importante na prevenção e tratamento da síndrome metabólica, doenças inflamatórias intestinais e alguns tipos de câncer (DEN BESTEN et al., 2013).

#### **2.4.4 Modulação imunológica**

O sistema imune consiste em uma complexa rede de órgãos, células e moléculas, responsáveis por manter a homeostase corporal e responder a agressões internas e externas. A imunidade inata trabalha em conjunto com a imunidade adquirida e tem como principal característica a rápida resposta ao estímulo, sendo a primeira linha de defesa. Seus mecanismos de ação incluem barreiras químicas e físicas, componentes celulares, bem como moléculas solúveis. A mucosa intestinal é a principal interface entre o sistema imune e o ambiente intraluminal, o desenvolvimento de sistema imune competente depende parcialmente das bactérias intestinais (BALZAN, 2007; CRUVINEL et al., 2010; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Células imunes da mucosa intestinal são organizadas em um sistema especializado e compartimentado conhecido como Tecido linfático associado ao intestino (GALT). É um dos maiores órgãos linfoides, que determina as respostas imunes a patógenos de microrganismos e tolerância imune as bactérias comensais. Esta habilidade é mediada por células dendríticas e células M da placa de Payer, estas células são capazes de internalizar microrganismos e macromoléculas, apresentando os antígenos para linfócitos T naive, que se diferenciam e fazem a resposta imune produzindo vários tipos de citocinas. As células intestinais produzem sinalizadores imunológicos que são necessários para ativar células imunes, limitando a mediação inflamatória e direcionando a resposta imune inata e adaptativa (GRAZIANI et al., 2019; JOHANSSON et al., 2010; PETERSON; DAVID, 2014).

Ambas as respostas imunes, inata e adaptativa dependem dos leucócitos. Neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação e desempenham papel importante nos estágios iniciais da reação a inflamação, estão entre as primeiras células a migrarem para os tecidos atraídos pelas quimiocinas. São ativados por diversos

estímulos como proteínas do complemento, complexos imunes, citocinas e quimiocinas. Eosinófilos são células importantes no combate a infecções e sua ação antiparasitária é a mais eficaz (CRUVINEL et al., 2010; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

A imunonutrição estuda a relação entre o consumo de alimentos e o funcionamento do sistema imune. As pesquisas recentes nesta área estão concentradas em avaliar o potencial de imunomoduladores provenientes de alimentos funcionais em condições inflamatórias. Estudos tem demonstrado aumento na eficiência do sistema imune após o consumo de prebióticos, como a inulina e FOS (CHOQUE DELGADO, et al., 2012). Os prebióticos podem afetar diferentes aspectos do sistema imune, modulando processos imunológicos no GALT. O impacto dos prebióticos no crescimento e metabolismo de cepas específicas de bactérias parece ter ação de sinalização no sistema imune, como demonstrado em estudos *in vivo* em camundongos e humanos. Os frutanos (FOS e inulina) modulam marcadores imunológicos intestinais como IgA e Interleucinas, além de aumentar a atividade de células imunes no baço. O consumo de prebióticos pode melhorar as funções imunes pelo aumento da população de microrganismos protetivos. A presença de microbiota intestinal saudável promove um estado de tolerância imunológica, que previne a ocorrência de resposta imune contra microrganismos comensais e componentes da dieta evitando alergias e irritações intestinais (CHOQUE DELGADO et al., 2012; SCHOLTENS et al., 2008; WILSON; WHELAN, 2017).

A imunomodulação exercido pelo FOS também ocorre através do aumento de imunoglobulinas intestinais específicas e interleucinas imuno-regulatórias e redução de interleucinas pró-inflamatórias (KOMURA et al., 2014; WILSON; WHELAN, 2017). Outra via de ação do prebióticos na modulação imunológica vem ganhando atenção. Estes podem induzir resposta imune através de sinalização direta nas células imunes. Os prebióticos se ligam a receptores de reconhecimento padrão (PRRs) nas células do sistema imune inato, como os receptores *Toll-like* (TLRs). Estes PRRs reconhecem as chamadas moléculas padrões associadas aos patógenos (PAMPS), que são pequenas moléculas encontradas em patógenos, mas também em microrganismos não patogênicos. A hipótese é os prebióticos podem ativar esta via influenciando

diretamente o sistema imune (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; VOGT et al., 2013). Ao comparar modelo *in vivo* com *in vitro* (LEFORESTIER et al., 2009) encontrou proliferação celular aumentada em células na presença de GOS, o mesmo não ocorreu no modelo animal, levando a crer que os prebióticos podem exercer efeito direto nos enterócitos não mediado pela microbiota.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos do pré-tratamento e do tratamento total com FOS, no epitélio intestinal e na resposta inflamatória em modelo de mucosite intestinal, induzida por 5-Fluorouracil (5-FU).

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito das duas modalidades de tratamento com FOS no consumo alimentar e perda ponderal dos animais controle e tratados com FOS.
- Avaliar parâmetros relacionados com a integridade da mucosa intestinal, como aspectos morfológicos, permeabilidade intestinal, translocação bacteriana e a expressão das proteínas de junções firmes nos animais controle e tratados com FOS.
- Avaliar alguns parâmetros imunológicos por meio de dosagens de citocinas inflamatórias, anti-inflamatórias e IgA no intestino dos animais controle e tratados com FOS.
- Verificar a presença de neutrófilos e eosinófilos ativados no intestino por meio da medida da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO), respectivamente.
- Investigar o perfil de ácidos graxos de cadeia curta, butirato, acetato e propionato nos animais que receberam o tratamento com FOS e nos respectivos controles.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c machos, com seis semana de idade, pesando entre 18 e 25 gramas, adquiridos no Biotério Central (BC) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas no biotério da Faculdade e Farmácia da UFMG, com controle de ventilação e iluminação (ciclo de luz claro/escuro de 12 horas) e com acesso à água e ração *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA), sob o protocolo nº. 66 / 2018 (ANEXO I).

### 4.2 Prebiótico

Foi utilizado o suplemento prebiótico Nutraflora® P-95 da GTC Nutrition, trata-se de uma fibra prébiotica produzida a partir da cana de açúcar, contendo no mínimo 95% de fruto-oligossacarídeos puro de cadeia curta (scFOS®).

A quantidade de FOS utilizada foi correspondente a 6% da dieta (GALDINO et al., 2018). Foi verificado anteriormente que a média de consumo de ração diária de cada animal era de 4 g/dia, com isso o quantitativo de suplementação de FOS diário foi de 240 mg/dia por animal (6%). O suplemento foi administrado aos animais dos grupos FOS, PT e TT via gavagem. Os demais grupos (CTL e MUC) receberam salina, por gavagem, para sofrerem o mesmo estresse dos animais dos demais grupos.

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos:

**Controle (CTL):** Gavagem com 0,2 mL de solução salina entre os dias 1 e 6 do experimento e sem indução de mucosite.

**FOS (FOS):** Gavagem com 0,2 mL de solução contendo 240 mg de FOS entre os dias 1 e 10 do experimento e sem indução de mucosite.

**Mucosite (MUC):** Gavagem com 0,2 mL de solução salina entre os dias 1 e 6 do experimento e indução de mucosite com 5-FU (300mg/Kg) com única injeção intraperitoneal no 7º dia.

**Pré-tratamento (PT):** Gavagem com 0,2 mL de solução contendo 240 mg de FOS entre os dias 1 e 6 do experimento e indução de mucosite com 5-FU (300mg/Kg) com única injeção intraperitoneal no 7º dia.

**Tratamento total (TT):** Gavagem com 0,2 mL de solução contendo 240 mg de FOS entre os dias 1 e 10 do experimento e indução de mucosite com 5-FU (300mg/Kg) com única injeção intraperitoneal no 7º dia.

O experimento teve duração de 10 dias com indução da mucosite por dose única de 5-FU (300 mg/Kg) no sétimo dia. Setenta e duas horas após a indução da mucosite os animais foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical, foi realizada a coleta das amostras para análise (Figura 7).

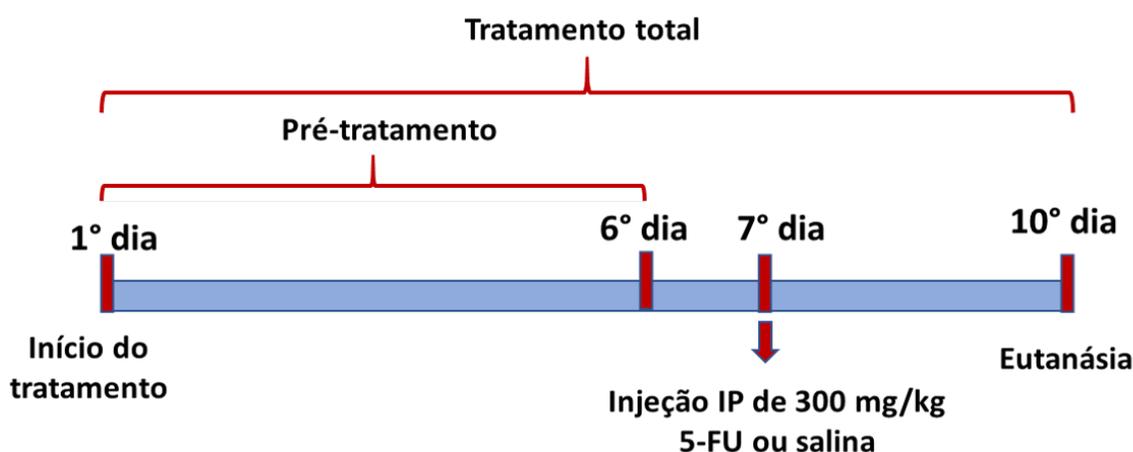


Figura 7. Delineamento experimental.

### 4.3 Modelo experimental de mucosite intestinal

O modelo de mucosite intestinal utilizado foi adaptado de Maioli e colaboradores (2014). A mucosite foi induzida com dose única de 300 mg/kg de peso, administrada por via intraperitoneal.

No 7º dia de tratamento, os animais dos grupos MUC, PT e TT receberam a injeção intraperitoneal (IP) contendo 300 mg/Kg de 5-Fluorouracil (5-FU) (Eurofarma®),

enquanto os animais dos grupos CTL e FOS receberam injeção de salina IP com mesmo volume. A eutanásia foi realizada 72 horas após a indução da mucosite.

#### **4.4 Consumo alimentar**

Os animais receberam a ração comercial da marca Presence® - linha laboratório para ratos e camundongos durante todo o experimento.

Para a avaliação do consumo alimentar, a ração foi pesada em balança semi-analítica diariamente e foi feito o cálculo da diferença entre o peso da ração ofertada e a sobra. Os resultados foram apresentados após a indução da doença, com a finalidade de verificar se a mucosite intestinal interfere no consumo alimentar.

#### **4.5 Variação ponderal**

Os animais foram pesados em balança semi-analítica, durante os dez dias do experimento, sempre no mesmo horário. A variação de peso, ganho ou perda, foi avaliada em gramas (g) antes e após a indução da mucosite.

#### **4.6 Avaliação da permeabilidade intestinal**

A permeabilidade intestinal (PI) foi determinada pela contagem da radiação no sangue, após administração oral, por gavagem, do ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) marcado com o radioisótopo tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ). Trata-se de um complexo ( $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA) inerte e hidrossolúvel com peso molecular aproximadamente de 500 daltons apresentando características ideais para avaliação da PI.

Para realizar a marcação foi utilizado reagente liofilizado contendo 10 mg de DTPA e 0,5 mg do agente redutor cloreto estanoso ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). O reagente foi reconstituído com 1mL de solução de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ) contendo 370 MBq de atividade, obtidos de um gerador de Molibdênio-99/Tecnécio-99m (IPEN/CNEN, São Paulo). Esta preparação foi mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período os animais receberam por gavagem 0,1mL de solução de  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA contendo 18,5MBq (megabecquerel) de atividade. Foi realizada a correção de

decaimento do  $^{99m}\text{Tc}$  por meio de padrões de doses, contendo alíquotas de 0,1 mL de  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA que seguiram o mesmo protocolo para a determinação da radioatividade realizado para as amostras (ANDRADE et al., 2015; VIANA et al., 2010).

Após 4 horas da gavagem os animais foram anestesiados com solução de xilazina (15 mg/Kg de peso vivo) e cloridrato de cetamina (80mg/kg de peso vivo), o sangue foi coletado da veia cava superior para contagem da radioatividade em contador de radiação gama automático *Perkinelmer Wallac*, 1480 *Wizard 3* e determinação da PI. Os resultados obtidos foram comparados com o padrão da dose e calculados em percentual de dose por grama de sangue com a seguinte fórmula:

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

Onde: cpm= contagem por minuto

#### **4.7 Avaliação da translocação bacteriana**

A translocação bacteriana foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por DINIZ *et al.*, (1999) utilizando a bactéria *Escherichia coli* radiomarcada com  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc}$ -*E.coli*). Foi realizado o repique, a partir de uma cultura mãe de *E.coli*, em ágar tripcaseína (Merk, Darmstadt) e incubação a 37°C por 18 horas. Após esse período a bactéria foi transferida para um tubo contendo salina estéril e sua concentração foi ajustada a 580 nm (espectrofotômetro GENESYS), em 31% de transmitância, correspondente a  $10^8$ UFC/mL. Uma alíquota de 2 mL desta suspensão bacteriana foi incubada em tubos contendo 1 mL de solução de cloreto estano (pH 7,0) (Sigma-Aldrich) a 37°C por 10 minutos. Após a incubação 74 Mbq de  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  foram adicionados a suspensão bacteriana e a preparação foi mantida a 37°C por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 3000 g durante 25 minutos, o sobrenadante foi coletado para contagem da radioatividade, o precipitado foi ressuspensionado em 3 mL de salina estéril e sua radioatividade foi contada. O procedimento de centrifugação e lavagem foi repetido três vezes. A porcentagem da marcação foi determinada pela seguinte fórmula:

% da marcação =  $(\text{cpm do precipitado} / (\text{cpm do precipitado} + \text{cpm do sobrenadante})) \times 100$

cpm = contagens por minuto

Após 72 horas da indução da mucosite 0,1mL de suspensão  $^{99m}\text{Tc-E.coli}$  contendo 1,8MBq de atividade foi administrado por gavagem a todos os animais. Os camundongos foram mantidos em gaiolas com restrição de água, após quatro horas foram anestesiados via IP. Após 4 horas da gavagem, o sangue foi coletado por punção venosa axilar e, após este procedimento, os animais foram anestesiados e eutanasiados conforme descrito no item anterior. Linfonodos mesentéricos, fígado, baço e pulmões foram coletados, pesados e a radioatividade determinada em contador de radiação gama automático *Perkinelmer Wallac, 1480 Wizard 3*. Os resultados foram expressos como contagem por minuto (cpm/g de tecido) (MILLER et al., 2017; QUIRINO et al., 2013; QUIRINO; CORREIA; CARDOSO, 2007).

#### **4.8 Análises histológicas**

Para as análises histológicas o segmento intestinal correspondente ao íleo distal foi coletado. Os intestinos foram colocados com a camada serosa em contato com papel filtro, cortados longitudinalmente e abertos pela borda anti-mesentérica (MILLER et al., 2017), o conteúdo luminal foi removido suavemente, sem danos à mucosa. Subsequentemente, o tecido foi lavado com PBS 0,1 M (tampão fosfato salina) para a remoção completa de fluidos. Em seguida foi enrolado e fixado em formol tamponado 4% por um período mínimo de 24 horas. O material foi processado para inclusão em parafina e secções de 4 $\mu\text{m}$  de cada amostra foram cortadas, o íleo foi corado com Hematoxilina e Eosina (HE) para interpretação histológica de rotina de acordo com escore histológico (Tabela 3), e foi corado com Ácido Periódico-*Schiff* (PAS) para avaliação da produção de mucopolissacarídeos por células caliciformes. As imagens fotográficas foram realizadas em microscópio *Olympus BX51* acoplado à câmera digital por meio do programa SPOT Advanced (TAFURI et al., 2004; VIANA et al., 2010).

##### **4.8.1 Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)**

Cortes de 4 µm do íleo foram desparafinizados em dois banhos de xilol de 15 minutos cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%) por três minutos em cada solução e hidratados em água corrente por cinco minutos. Em seguida, os cortes foram corados por Hematoxilina de *Harris* por 50 segundos e lavados em água corrente durante 20 minutos, em seguida foram corados por Eosina por um minuto e 30 segundos. As lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool e diafanizadas em xilol. Os cortes histológicos foram montados em *Entellan* (Merck) e lamínulas de vidro. As lâminas foram analisadas pelo patologista Prof. Dr. Geovanni Cassali Dantas (Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas/UFMG). Lesões da mucosa e camada muscular foram avaliadas de acordo adaptação do método propostos por Howarth et al., 1996. (HOWARTH et al., 1996).

**Tabela 3 - Escore histológico**

Achados Microscópicos	Escore			
	0	1	2	3
Atrofia das vilosidades				
Rompimento de bordas em escova e enterócitos de superfície				
Perda da arquitetura de criptas				
Formação de abcesso de criptas				
Infiltração de linfócitos				
Espessamento e edema da submucosa				
Espessamento e edema da camada muscular externa				

Fonte: adaptado de (HOWARTH et al., 1996)

**0:** dano mínimo, **3:** dano máximo

#### 4.8.2 Técnica combinada de Ácido Periódico-Schiff (PAS)

Cortes do intestino delgado (íleo) foram corados pela técnica combinada de Alcian Blue e Ácido Periódico Combinado de *Schiff* (PAS/AB) com adaptações da técnica descrita por (MCMANUS; MOWRY, 1960). A técnica tem como objetivo corar as células caliciformes, produtoras de mucopolissacarídeos. As lâminas foram desparafinadas e lavadas em água corrente por cinco minutos. Em seguida os cortes foram mergulhados em solução de equilíbrio (ácido acético 3%) por três minutos e lavados com solução de equilíbrio e água destilada. Na etapa seguinte, as lâminas

foram mergulhadas em solução aquosa de ácido periódico 0,5% por 5 minutos e incubadas em reativo de *Schiff* (*Merck Milipore*) por 10 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, contra coradas por Hematoxilina de *Harris* e lavadas novamente em água corrente por 15 minutos. Após a coloração, os cortes foram desidratados e as lâminas montadas em Entellan (*Merck Milipore*).

#### **4.8.3 Análises morfométricas**

Para a realização das análises morfométricas do íleo foram obtidas fotografias realizadas em microscópio *Olympus BX51* acoplado à câmera digital por meio do programa SPOT Advanced com aumento de 20X. Foram fotografados dez campos por lâmina. Em seguida foram realizadas as análises da altura das vilosidades, profundidade das criptas e quantificação das células calciformes.

A altura das vilosidades e profundidade das criptas foram realizadas medindo-se da base ao ápice e os dados foram expressos em micrômetros utilizando o programa *ImageJ* (versão 1.47f, *Wayne Rasband/National Institute of Health, USA*). A razão vilosidade/cripta foi então determinada.

#### **4.9 Células Calciformes**

A análise das células calciformes foi realizada pela avaliação da intensidade de *pixels* referentes à coloração da marcação PAS. Inicialmente, padronizou-se a captura da imagem, três campos microscópicos aleatórios com aumento de 200X, para cada um dos casos. Em seguida, as imagens foram convertidas para o formato de RGB 8 *bits* no *software* *ImageJ*® e com auxílio do *plugin colour deconvolution* foi obtido realce da coloração PAS positiva. Posteriormente, as áreas de interesse, correspondentes às células calciformes da mucosa intestinal, foram selecionadas e comparadas às imagens capturadas originalmente. A variação de intensidade foi avaliada na escala de *pixels*, na contagem de 0 (mais escuro) a 255 (mais claro). Os resultados foram expressos em média de intensidade de *pixels* (FERREIRA; RASBAND, 2012; SANTANA et al., 2006).

#### **4.10 Análise da expressão gênica de proteínas da junção firme**

A avaliação da expressão das proteínas da junção firme ocludina e Zonula occludens-1 (ZO-1) foi realizada em amostras de íleo coletadas e armazenadas em microtubos livres de RNase. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da análise.

Os tecidos foram submetidos a três etapas de análise: 1) Extração do RNA; 2) Síntese do cDNA; 3) Amplificação do cDNA pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real), de acordo com o método descrito por (VIEIRA et al., 2012). As análises foram realizadas no laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG sob a supervisão da Profa Jacqueline Isaura Alvarez Leite.

##### **4.10.1 Extração do RNA**

O RNA total foi extraído homogeneizando-se as amostras de íleo (50mg) com 0,5mL de reagente trizol® (Invitrogen/*Life Technologies*). Foram adicionados aos tubos 200 µL de clorofórmio, os tubos foram agitados vigorosamente por 30 segundos e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida foram centrifugados a 13.000 rpm a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 250 µL de isopropanol e misturadas por inversão durante um minuto. Subsequentemente, os tubos foram incubados a -80°C por 90 minutos para precipitação do RNA.

As amostras foram então centrifugadas a 13.000 rpm, a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet formado foi lavado com 500 µL e etanol (75%). As amostras foram centrifugadas novamente nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante foi descartado. Deixou-se o pellet formado secar a temperatura ambiente por 20 minutos. Após secagem o pellet foi ressuscitado em água e incubado em banho maria a 55°C por 10 minutos.

Espectrofotômetro foi utilizado para a determinação da concentração (ng/ µL) e da pureza do RNA, por meio da razão 260/280 (Spectrophotometer ND-1000). Os

materiais utilizados, incluindo microtubos, ponteiros e água, eram livres de RNase e DNase, conforme descrito por (FERREIRA et al., 2012).

#### **4.10.2 Síntese do cDNA**

O RNA extraído das amostras na etapa anterior foi transcrito em cDNA por meio da enzima transcriptase reversa (MMLV RT). O cDNA foi sintetizado utilizando-se 1 µg do RNA total diluído em 5 µL de água livre de RNase e DNase. Foi adicionado 0,5 µL (50 µM) de Oligo(dT) primer (Promega #C1101) e 1,25 µL de água. Após homogeneização com pipeta, os tubos foram colocados em termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) a 72°C por 5 minutos. Em seguida 3,25 µL do mix contendo: 0,5 µL de M-MLV RT (200U) (Promega #M1705), 2 µL de tampão M-MLV 5x, 0,5 µL (10mM) de dNTP Mix (Promega #U1515), 0,1 µL (40.000U/mL) de RNAsin (Ribonuclease inhibitor, Promega #N2511) e 0,25 µL de água foram adicionados. Os tubos foram novamente colocados no termociclador a 42°C por três horas e em seguida 72°C por 15 minutos.

As amostras foram então armazenadas a -20 °C para posterior amplificação pela técnica de PCR em tempo real, conforme descrito por (FERREIRA et al., 2012).

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

O cDNA sintetizado na etapa anterior foi amplificado pela técnica de *Real Time* PCR, utilizando-se primers específicos. As amostras foram diluídas em água livre de RNase (1:10) e 2,5µL da solução foi adicionado à 7,5µL da solução mix em placa de 96 poços específica para a técnica. O mix foi composto de 0,75µL de primer forward, 0,75µL de primer reverse, 1µL de água e 5µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems #4367659). A análise foi feita em equipamento específico (ABiPrism – 7900HT Sequence Detection System) e analisada no programa SDS 2.4. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e a quantidade de mRNA foi normalizada pelo GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Os valores foram expressos em quantidade de gene amplificado em comparação ao grupo controle ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). A tabela 4 mostra a sequência de nucleotídeos de cada primer utilizado, conforme descrito por (FERREIRA et al., 2012).

**Tabela 4 - Sequência dos nucleotídeos utilizados para o PCR em tempo real.**

Gene	Sequência <i>Foward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
ZO1	CCAGCTTATGAAAGGGTTGTTC	TCCTCTCTTGCCAACTTTTCTC
Ocludina	ATGTCCGGCCGATGCTCTC	TTTGGCTGCTCTTGGGTCTGTAT
GAPDH	ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA	CGCCCAAATCCGTCCACACCGA

#### 4.11 Avaliação de parâmetros imunológicos

##### 4.11.1 Análise do infiltrado inflamatório por meio da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da enzima MPO foi utilizada como índice indireto do recrutamento de neutrófilos nos tecidos. Fragmentos do íleo dos animais foram removidos, lavados com PBS, pesados (20mg) e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise. As amostras foram homogeneizadas em Buffer 1 gelado (NaCl 0,1M,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0,02M e  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,015M) na proporção de 1,9mL/100mg de tecido, em homogeneizador de tecidos (*Ultra-turrax IKA T10 basic*). Em seguida foram centrifugadas a 10.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionadas solução de NaCl 0,2% e solução de NaCl 1,6% com glicose 5% (proporção: 1,5mL/100mg de tecido) ao precipitado. As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente removido e ao precipitado foi adicionado Buffer 2 ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0,05M e HETAB 0,5%) em temperatura ambiente na proporção de 1,9mL/100mg de tecido. As amostras foram novamente homogeneizadas.

Alíquotas de 1 mL da suspensão foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas em água a temperatura ambiente, alternadamente por três vezes. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos e o sobrenadante foi reservado para o ensaio enzimático. O precipitado foi ressuscitado e a atividade da MPO foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450 nm utilizando tetrametilbenzidina (TMB) (1,6mM) (Sigma) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5mM). A leitura foi feita em leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.) e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias/mg de proteína. A dosagem

foi realizada no Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG.

#### **4.11.2 Análise do infiltrado inflamatório por meio da atividade enzimática da peroxidase de eosinófilos (EPO)**

A atividade da enzima EPO foi avaliada como quantidade relativa de eosinófilos no íleo. Fragmentos do íleo foram retirados, lavados com PBS e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise. A avaliação foi feita por meio de testes enzimáticos como descrito por (STRATH; WARREN; SANDERSON, 1985). Para cada 100 mg de tecido foi acrescentado 1,9 mL de PBS, pH 7,2 e em seguida foi feita homogeneização (*Ultraturrax IKA T10 basic*) as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos (*Eppendorf 5430 R*, São Paulo, SP, Brasil). O sobrenadante foi desprezado, e ao precipitado foi adicionada solução de NaCl 1,6% acrescida de glicose 5%. Novamente, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado remanescente foi novamente suspenso com 1,9 mL de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HETAB) 0,5% diluído em PBS para cada 100 mg de amostra. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para microtubo de 1,5 mL, as amostras foram homogeneizadas e congeladas em nitrogênio líquido, e descongeladas em água à temperatura ambiente, alternadamente, por três vezes. Após essa etapa, foi feita nova centrifugação (10.000 rpm, a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 10 minutos) e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático.

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, em cada poço foram adicionados 75  $\mu\text{L}$  de amostra ou branco (PBS/HETAB 0,5%) junto com 75  $\mu\text{L}$  do substrato o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) (Sigma) diluído em tampão Tris-HCl a 0,075 mM, em pH 8,0, acrescidos de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 6,6 mM. Posteriormente, a placa foi incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos ao abrigo da luz. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a 1M. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 492 nm (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias/mg de proteína. A dosagem foi realizada no Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG.

#### 4.11.3 Dosagem de proteína

A dosagem da concentração de proteína nos fragmentos do íleo foi feita de acordo com a metodologia descrita por Lowry (LOWRY et al., 1951). Para isso, em 250µL de amostra diluída (1:50) foram adicionados 250µL da solução A (uma parte de sulfato de cobre, uma parte de tartarato de sódio e 100 partes de carbonato de sódio) e 25µL de reagente de Folin-Ciocalteu diluído (1:2). Em seguida, as amostras foram agitadas em vórtex e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. As amostras (200µL) foram então adicionadas à placa de 96 poços e a absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 660nm (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.). A concentração de proteína em cada amostra foi calculada depois de obtida a fórmula pela curva padrão, feita com albumina.

#### 4.11.4 Dosagem de slgA

Para a dosagem de slgA o intestino delgado foi removido e todo o conteúdo luminal foi retirado, pesado e diluído com salina fosfatada PBS 0,1 M pH 7,2 suplementada com inibidor de protease (PBS adicionado de um coquetel de inibidores de protease: PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetônio 0,1 mM, EDTA 10 mM e 20 *Kallikrein Inhibitor* unidades de aprotinina A), na proporção de 2 mL da solução para cada 500 mg de fluido intestinal. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (5000 rpm, a 4°C, por 30 minutos) e o sobrenadante foi recolhido para a dosagem da imunoglobulina.

A determinação do nível de slgA foi realizada pelo método de ELISA, para isso a foi utilizado para o revestimento das microplacas anticorpos anti-IgA de camundongos desenvolvidos em cabra (M-8769, *Sigma*). Para a detecção da slgA foi utilizado anticorpo conjugado a peroxidase anti-IgA de camundongo (A-4789, *Sigma*). A concentração de slgA total foi determinada utilizando um padrão de IgA purificado (0106-01, *Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA*). As leituras foram realizadas, a 492 nm, em um leitor de microplacas (*Spectromax M3, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, USA*) e a concentração de slgA dada em µg/g de fluido intestinal.

#### 4.11.5 Dosagem de citocinas

Para a avaliação da expressão de citocinas (IL-10, IL-6) e TNF- $\alpha$ , 100 mg do íleo de cada animal foram coletados e homogeneizados em solução de extração de citocinas (PBS adicionado de um coquetel de inibidores de protease: PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetônio 0,1 mM, EDTA 10 mM e 20 *Kallikrein Inhibitor* unidades de aprotinina A), na proporção de 1 mL de solução para 100 mg de tecido, utilizando-se homogeneizador de tecidos (Ultra-Turrax, IKA T10 basic) (MARTINS et al., 2013). Em seguida, a solução foi centrifugada a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante imediatamente coletado e armazenado a -80°C para posterior dosagem. A quantificação de citocinas foi realizada pelo método de ELISA sanduíche e os kits para as dosagens foram obtidos da R&D Systems (DuoSet). Para a realização dos ensaios foram seguidas as instruções do fabricante.

#### 4.12 Análise de AGCC

As fezes dos animais foram coletadas após a eutanásia, diretamente do ceco dos animais para dosagem de AGCC e, em seguida, armazenadas em freezer -80°C até o momento da análise. As análises foram realizadas em duplicata, segundo proposto por (SMIRICKY-TJARDES et al., 2003). Para a extração, foi adicionado às amostras ácido m-fosfórico 25%, agitado e mantido em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 13.500 rpm por 30 minutos, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 13.200 rpm por 20 minutos e congelado a -20°C. Para a dosagem, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm e aplicadas no Cromatógrafo a Gás (SMIRICKY-TJARDES et al., 2003).

As análises dos AGCC acetato, propionato e butirato foram realizadas em Cromatógrafo a gás modelo CGMS – QP 5000 marca *Shimadzu* acoplado a um microcomputador equipado com detector para o registro da análise dos cromatogramas utilizando-se o programa *GC Solution*. Os respectivos ácidos foram separados e identificados em coluna capilar NUKOL (30 m x 0,25 mm x 0,01 mm).

Para a separação cromatográfica, 1 mL de amostra foi injetada com auxílio de seringa de 10 mL (*Hamilton*®) em sistema *Splitless* no modo SIM (Sistema de Monitoramento de Íons). O gás hélio foi utilizado como carreador, com velocidade linear programada para 38,5 cm/s. As temperaturas do injetor e do detector foram respectivamente de 200°C e 220°C. A programação da coluna com temperatura inicial a 80°C (mantida por 5 minutos), aumentando em 12°C por minuto até atingir 180°C e finalizando a 25°C por minuto até atingir 220°C (mantida por 20 minutos) totalizando 34,13 minutos de análise. A massa foi escaneada de 40 a 400 m/z. O fluxo da fase móvel na coluna foi de 1,1 mL/minuto. As amostras foram analisadas pela Profa. Dra. Maria do Carmo Gouveia Peluzio, do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

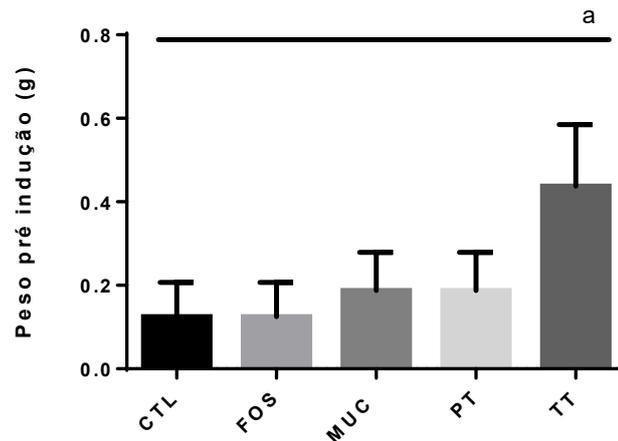
#### **4.13 Análises estatísticas**

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism, versão 6.0 (*GraphPad Software, USA*). Os resultados foram avaliados pelo teste de normalidade *Kolmogorov–Smirnov*, e se paramétricos, foram analisados por ANOVA *one-way* e pós teste de *Newman-Keuls*. Os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis* e pós teste de *Dunn's*. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados como diferença estatística significativa.

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 Variação ponderal e consumo alimentar**

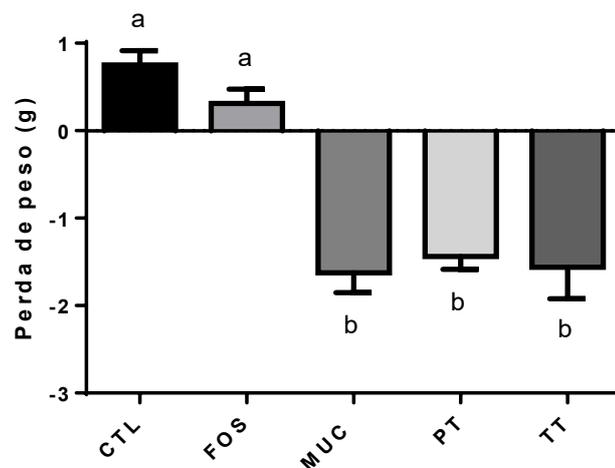
Não se observou diferença estatística no peso dos animais, antes da indução da mucosite, entre os grupos investigados ( $p > 0,05$ ). (Figura 8).



**Figura 8. Variação de peso antes da indução da mucosite (1º ao 6º dia).**

Dados são expressos como média  $\pm$  SEM (n=8). ( $p > 0,05$ ; one-way ANOVA e *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratamento, TT= Tratamento total.

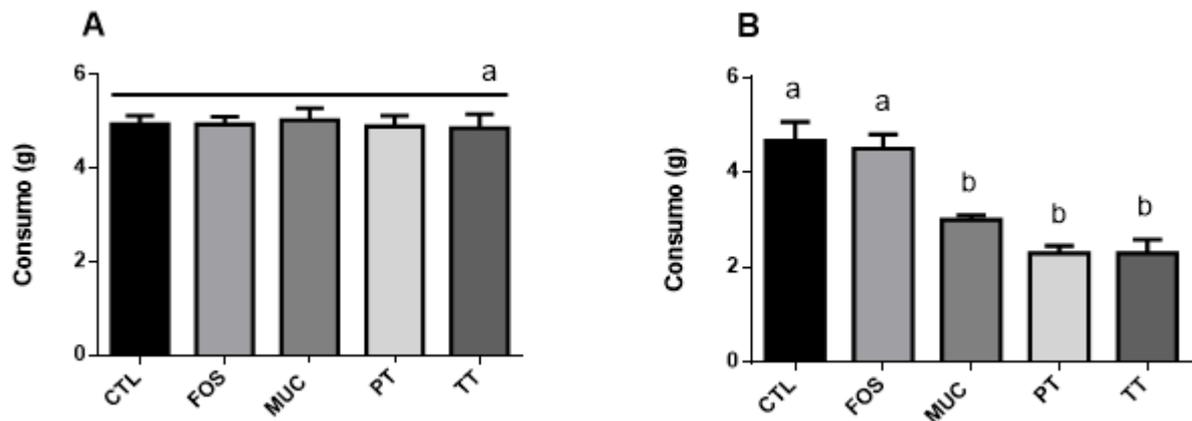
Após 72 horas da indução da mucosite foi observada perda significativa de peso nos animais do grupo MUC quando comparado aos animais dos grupos controle CTL e FOS ( $p < 0,05$ ) (Figura 9). Nos grupos PT e TT a perda de peso não foi minimizada pela a suplementação com FOS ( $p > 0,05$ ).



**Figura 9. Variação da perda de peso após a indução da mucosite (7º ao 10º dia).**

Dados são expressos como média  $\pm$  SEM (n=8). Letras diferentes indicam que há diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ; *one-way ANOVA* e *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratamento, TT= Tratamento total.

O consumo de ração foi monitorado durante os 10 dias do protocolo experimental. Antes da indução da mucosite não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no consumo de ração dos animais entre os grupos investigados (Figura 10 A). Após a indução da mucosite, entre os dias 7 ao 10, observou-se redução significativa do consumo alimentar dos grupos MUC, PT e TT comparados aos controles CTL e FOS ( $p < 0,05$ ) (Figura 10B).



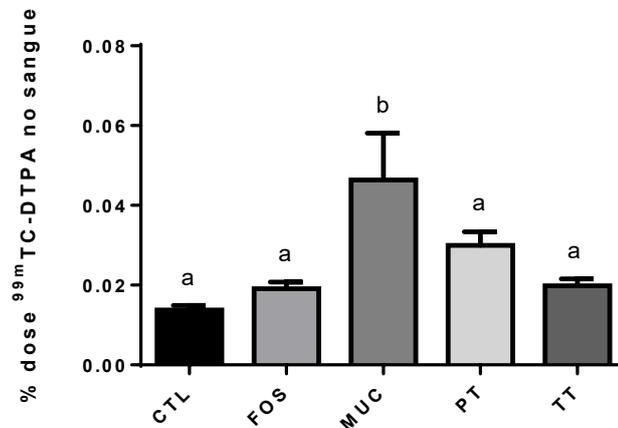
**Figura 10. Variação do consumo alimentar pré mucosite (1° ao 6° dia) e variação do consumo alimentar após a indução da mucosite (7° ao 10° dia).**

Dados expressos como média  $\pm$  SEM (n=8). Letras iguais indicam que não há diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ; *one-way ANOVA* e *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratamento, TT= Tratamento total.

## 5.2 Permeabilidade intestinal

A avaliação da permeabilidade intestinal (PI) foi realizada 72 horas após a indução da mucosite, no décimo dia do protocolo experimental. Foi verificada maior PI nos animais do grupo MUC em relação a todos os outros grupos ( $p < 0,05$ ). Os grupos PT e TT não apresentaram permeabilidade estatisticamente diferente quando

comparados aos grupos controles ( $p>0,05$ ), ou seja, apresentaram níveis fisiológicos de permeabilidade intestinal (Figura 11).



**Figura 11. Permeabilidade intestinal 72 horas após a indução da mucosite.**

Dados expressos como média  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). Letras diferentes indicam que há diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ; *one-way ANOVA* e *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratamento, TT= Tratamento total.

### 5.3 Avaliação da translocação bacteriana

A tabela 5 apresenta os resultados da translocação bacteriana (TB), que também foi avaliada 72 horas após a indução da mucosite. Nos grupos CTL e FOS foram observados baixa captação, por todos os órgãos investigados, de  $^{99m}\text{Tc-E.coli}$  compatíveis com níveis fisiológicos de TB. O grupo MUC apresentou taxas mais elevadas de TB para o sangue, fígado, baço, pulmão e linfonodos mesentéricos quando comparado aos grupos controle ( $p>0,05$ ). Os animais do grupo PT e TT apresentaram níveis de TB significativamente semelhantes aos controles para sangue, fígado e baço ( $p<0,05$ ). No pulmão os níveis de translocação foram intermediários enquanto nos linfonodos mesentéricos apresentaram níveis de TB semelhantes aos observados no grupo MUC (Tabela 5).

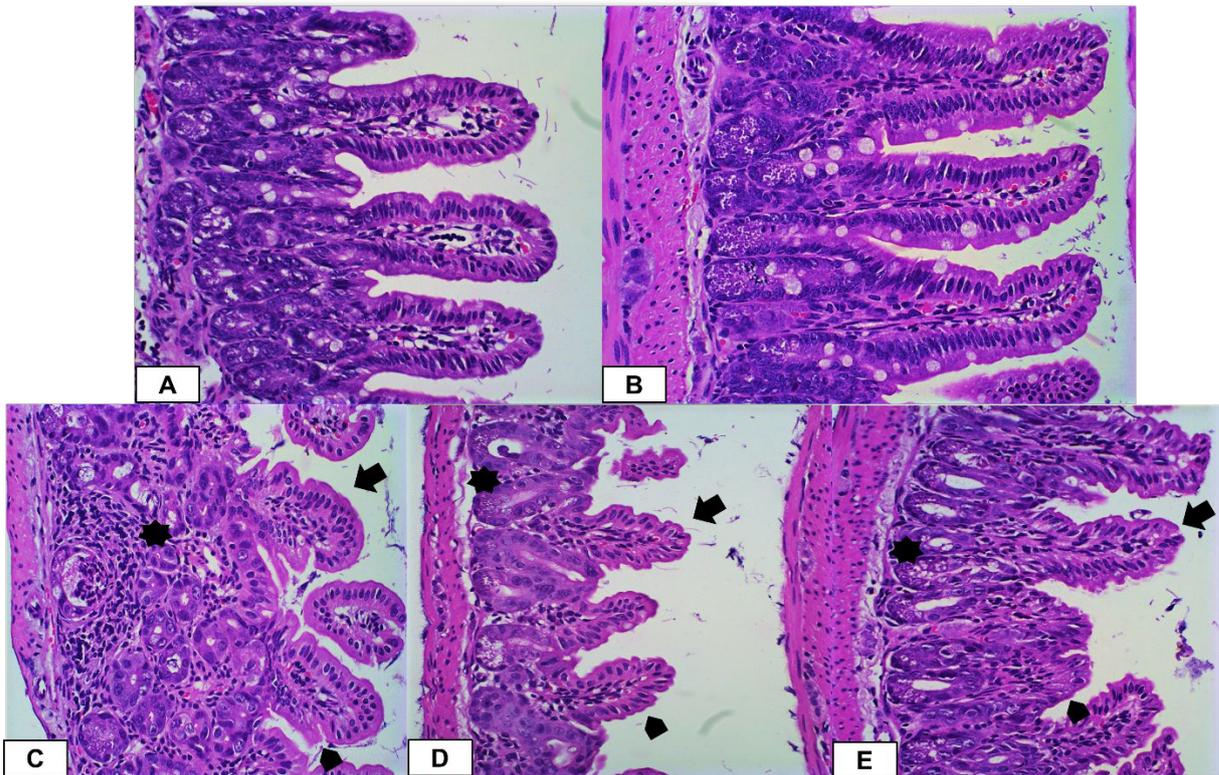
**Tabela 5 - Biodistribuição da <sup>99m</sup>Tc-E.coli**

Grupo/Tecido	CTL	FOS	MUC	PT	TT
<b>Sangue</b>	1300 <sup>a</sup> ± 94,84	831,3 <sup>a</sup> ± 253,1	1988 <sup>b</sup> ± 393,4	596,6 <sup>a</sup> ± 127,6	904,4 <sup>a</sup> ± 110,7
<b>Fígado</b>	1650 <sup>a</sup> ± 451,1	1913 <sup>a</sup> ± 614,5	6579 <sup>b</sup> ± 1639	3533 <sup>a</sup> ± 373,0	3273 <sup>a</sup> ± 478,2
<b>Baço</b>	381,7 <sup>a</sup> ± 74,74	715,6 <sup>a</sup> ± 223,4	3235 <sup>b</sup> ± 380,3	1024 <sup>a</sup> ± 138,5	1532 <sup>a</sup> ± 288,1
<b>Pulmão</b>	467,2 <sup>a</sup> ± 146,5	913,2 <sup>a</sup> ± 314,8	2964 <sup>b</sup> ± 481,1	2018 <sup>a,b</sup> ± 305,8	2124 <sup>a,b</sup> ± 650,5
<b>Linfonodo</b>	460,7 <sup>a</sup> ± 55,95	508,1 <sup>a</sup> ± 133,1	1849 <sup>b</sup> ± 304,4	1301 <sup>b</sup> ± 246,1	1346 <sup>b</sup> ± 203,8

Dados expressos como média ± SEM (n=10). Letras diferentes na mesma linha indicam que há diferenças estatisticamente significativas (p<0,05; *one-way* ANOVA e *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratamento, TT= Tratamento total.

#### 5.4 Análises histológicas

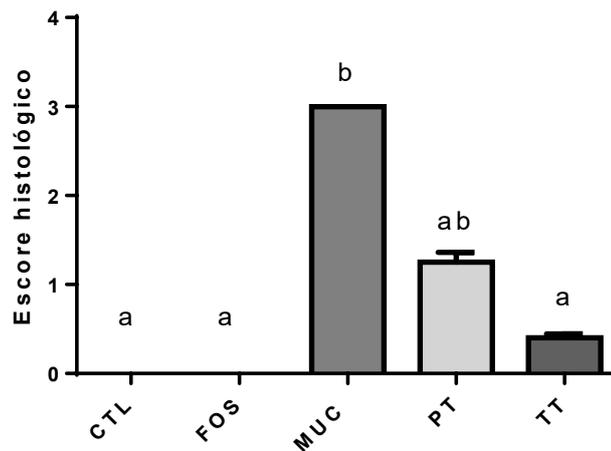
A figura 12 apresenta as imagens histológicas do íleo dos cinco grupos avaliados. Foram observados aspectos histológicos normais na mucosa intestinal dos animais dos grupos CTL e FOS (Figura 12 A e B). No grupo MUC observam-se vilosidades encurtadas, rompimento da borda em escova e perda da arquitetura das criptas (Figura 12 C). Camundongos pré-tratados (PT) com FOS apresentaram melhora parcial na integridade da mucosa, com menor encurtamento das vilosidades e maior conservação da arquitetura das criptas (Figura 12 D), já os animais do grupo TT apresentaram maior preservação do epitélio quando comparado ao grupo PT e MUC, inclusive apresentando preservação da borda em escova (Figura 12 E).



**Figura 12. Análise histológica do íleo**

Aspectos normais para os grupos CTL (A) e grupo FOS (B). Vilosidades encurtadas (setas), rompimento da borda em escova (cabeça de seta) e perda da arquitetura das criptas (asteriscos) estão presentes nos grupos MUC (C). Preservação parcial das vilosidades (setas) e arquitetura das criptas (asteriscos) são observados nos grupos PT (D), já no grupo TT (E) há uma maior preservação das vilosidades (setas), arquitetura das criptas (asteriscos) e preservação da borda em escova (ponta de seta). Coloração HE. CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratamento, TT= Tratamento total.

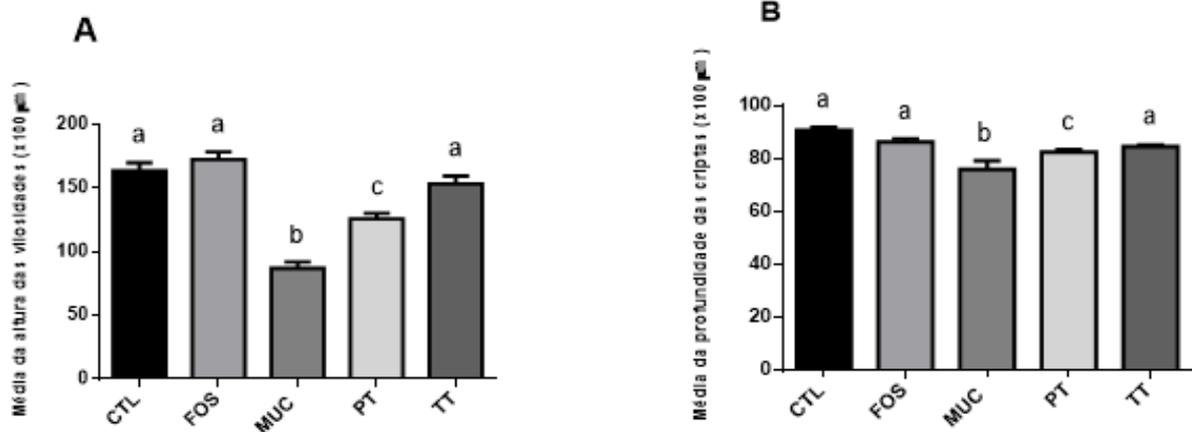
No sistema de escore foi observado escore 0 nos grupos CTL e FOS, indicando ausência de alterações na mucosa destes animais. No grupo MUC foi encontrado escore 3 indicando presença de inflamação, o que pode ser observado pelas vilosidades atrofiadas, perda da arquitetura das criptas e rompimento da borda em escova. No grupo PT foi encontrado escore intermediário (entre 1 e 2) e no grupo TT escore 1 (Figura 13).

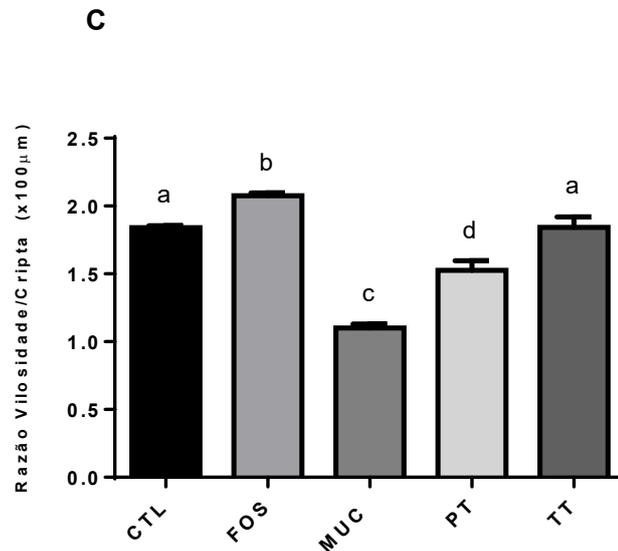


**Figura 13. Escore histológico**

Dados expressos como mediana  $\pm$  SEM (n=6). Letras diferentes indicam que há diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ); *Kruskal-Wallis ANOVA* e *Dunn's Test*). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratamento, TT= Tratamento total.

A análise morfométrica demonstra a redução significativa em todos os parâmetros (Figura 14 A, B e C) do grupo MUC em relação aos grupos CTL e FOS ( $p < 0,05$ ). O pré- tratamento e o tratamento total foram capazes de preservar parcialmente a manutenção da altura das vilosidades, profundidade das criptas e razão vilosidades/criptas ( $p < 0,05$ ) sendo que o grupo TT apresentou melhores resultados (Figura 14 A, B e C).



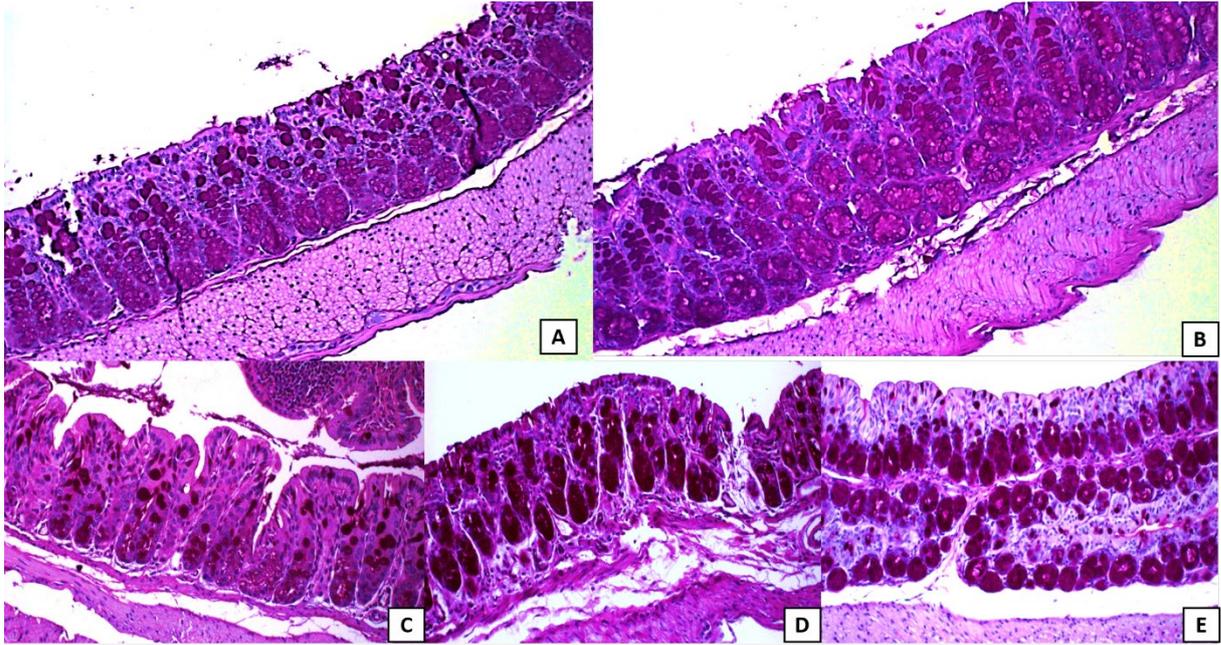


**Figura 14. Análise morfométrica.**

Média da altura das vilosidades (A), média da profundidade das criptas (B) e Razão Vilosidades/Criptas (C). Dados expressos em média  $\pm$  SEM (n=6). Letras diferentes indicam que há diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ; *one-way ANOVA* e *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratamento, TT= Tratamento total.

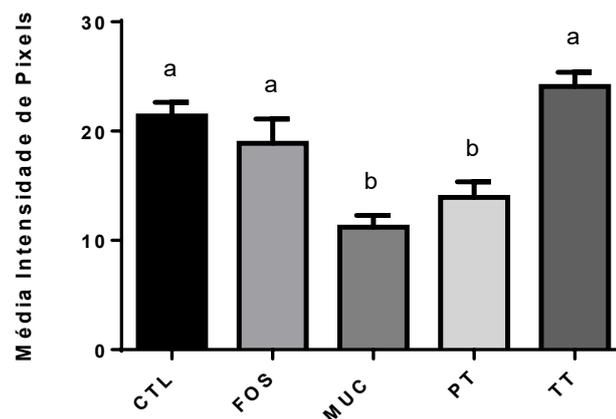
### 5.5 Análise da secreção de muco

O processo inflamatório induzido pelo quimioterápico reduziu significativamente a produção de muco nos animais do grupo MUC (Figura 15 C), quando comparado aos grupos CTL e FOS ( $p < 0,05$ ) (Figura 15 A e B). O pré-tratamento (Figura 15 D) não foi capaz de manter a produção de muco nos animais, já os animais do grupo TT mantiveram a produção de muco em níveis normais ( $p < 0,05$ ) (Figura 15 E).



**Figura 15 . Análise Histológica Muco**

Aspectos normais das células caliciformes e conteúdo de muco para os grupos CTL (A) e grupo FOS (B). Número de células caliciformes diminuídas e quantidade de muco menor nos grupos MUC (C) e PT (D). Preservação da quantidade de células caliciformes e quantidade de muco presente semelhante ao controle no grupo TT (E). Coloração PAS. CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratamento, TT= Tratamento total.



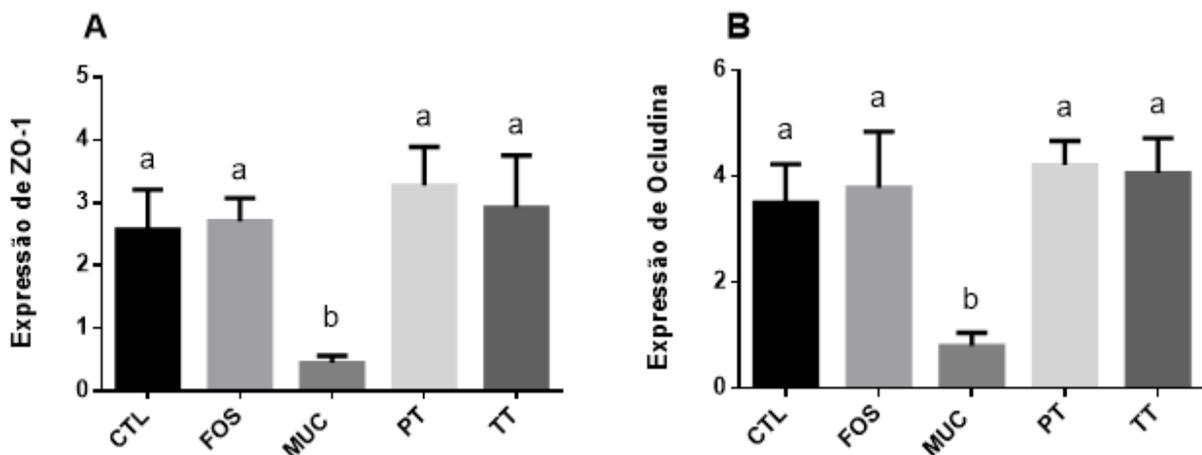
**Figura 16. Análise da secreção de muco**

Análise da secreção de muco. Dados expressos em média  $\pm$  SEM da intensidade de pixels ( $n=6$ ). Letras diferentes indicam que há diferenças ( $p<0,05$ ; *one-way ANOVA* e *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratamento, TT= Tratamento total.

## 5.6 Análise da expressão gênica de proteínas da junção firme

Na figura 17 A, observa-se diminuição na expressão gênica de ZO-1 do grupo MUC quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Nos grupos PT e TT a expressão desta proteína apresentou níveis semelhantes aos controles CTL e FOS ( $p > 0,05$ ).

A expressão de Ocludina (Figura 17 B) está diminuída no grupo MUC quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Nos grupos tratados PT e TT esta expressão não apresentou diferença quando comparado aos controles CTL e FOS ( $p > 0,05$ ).

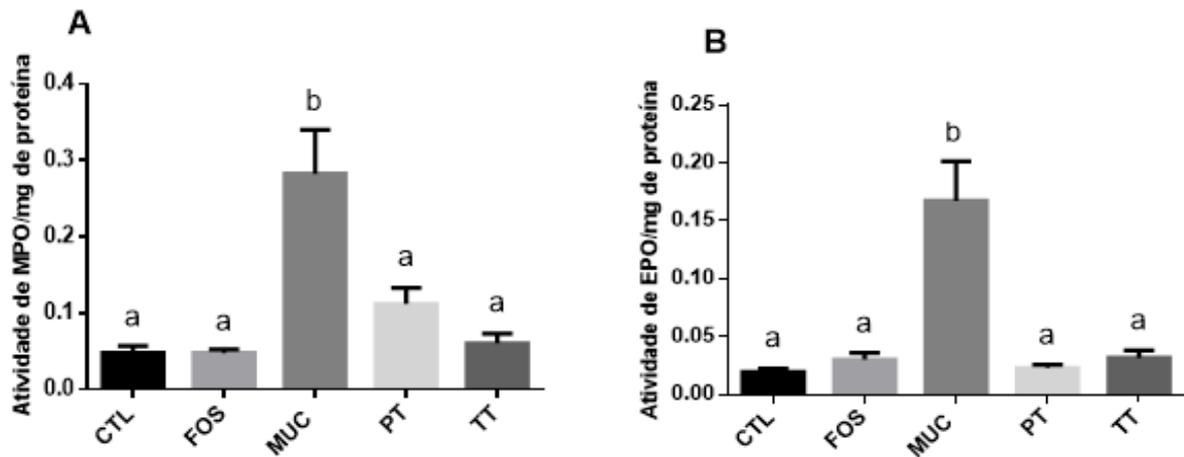


**Figura 17. Expressão gênica de Zonula occludens-1 e Ocludina no íleo.**

Expressão gênica de ZO-1 (A), expressão gênica de ocludina (B). Dados expressos em média  $\pm$  SEM ( $n=8$ ). Letras diferentes indicam que há diferenças ( $p < 0,05$ ; *one-way ANOVA* e *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratamento, TT= Tratamento total.

## 5.7 Avaliação do infiltrado inflamatório

As enzimas MPO e EPO foram avaliadas no íleo, para determinação indireta do infiltrado de neutrófilos e eosinófilos, respectivamente. A figura 18 A mostra a atividade de MPO aumentada no grupo MUC em relação a todos os outros grupos ( $p < 0,05$ ). Os demais grupos não apresentaram diferença estatística entre eles ( $p > 0,05$ ). A atividade de EPO (Figura 18 B) apresentou aumento em relação aos controles CTL e FOS ( $p < 0,05$ ), os grupos CTL, FOS, PT e TT não apresentaram diferença entre eles ( $p > 0,05$ ).

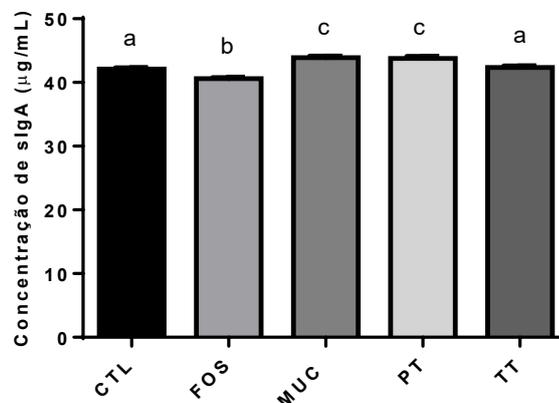


**Figura 18. Infiltrado inflamatório no íleo**

(A) Infiltrado de neutrófilos (MPO) e (B) Infiltrado de eosinófilos (EPO). Dados expressos em média  $\pm$  SEM de atividade das enzimas por absorbância (n=8). Letras diferentes indicam que há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ; *one-way ANOVA* e *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratamento, TT= Tratamento total.

### 5.8 Avaliação da sIgA intestinal

Ao analisar os níveis de sIgA foi observado aumento significativo no grupo MUC em relação ao CTL ( $p < 0,05$ ) e não houve diferença entre MUC e o grupo PT ( $p > 0,05$ ). O tratamento total, TT, foi capaz de manter os níveis de sIgA similares ao controle ( $p > 0,05$ ) (Figura 19).



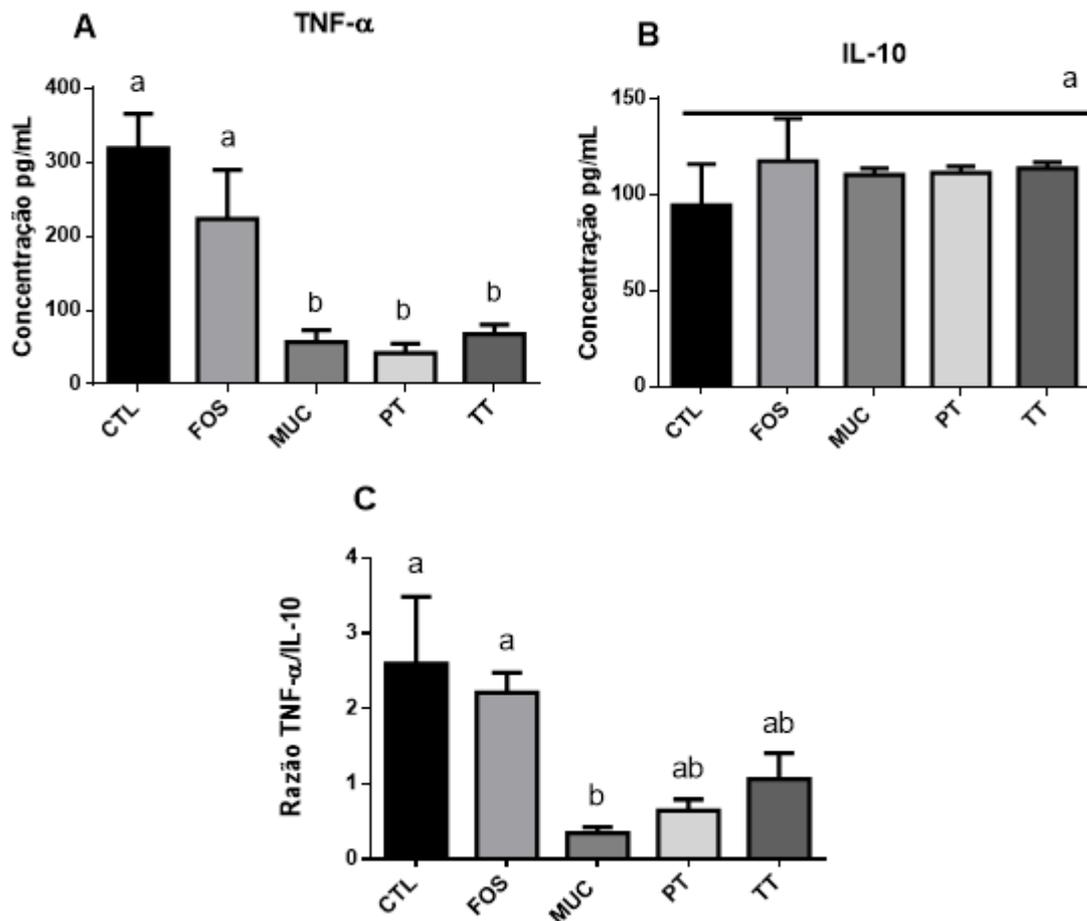
**Figura 19. Dosagem de sIgA intestinal**

Dados expressos em média  $\pm$  SEM (n=8). Letras diferentes indicam que há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ; *one-way ANOVA* e *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratamento, TT= Tratamento total.

### 5.9 Concentrações de IL-10 e TNF- $\alpha$ no íleo

A figura 20 apresenta as concentrações das citocinas intestinais TNF- $\alpha$  e IL-10, 72 horas após a administração do quimioterápico. Observou-se redução significativa na concentração de TNF- $\alpha$  em todos os grupos com mucosite (MUC, PT e TT) quando comparados aos controles CTL e FOS ( $p < 0,05$ ) (Figura 20 A). Não houve diferença estatística na concentração de IL-10 entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 18 B).

A razão TNF- $\alpha$ /IL-10 apresentou concentrações menores no grupo MUC quando comparado aos controles CTL e FOS ( $p < 0,05$ ). Os grupos PT e TT apresentam concentrações intermediárias ( $p > 0,05$ ) (Figura 20 C).



**Figura 20. Concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-10 e razão TNF- $\alpha$ /IL-10**

(A) Concentração de TNF- $\alpha$ , (B) concentração de IL-10 e (C) razão TNF- $\alpha$ /IL-10. Dados expressos em média  $\pm$  SEM (n=8). Letras diferentes indicam que há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ; *one-way ANOVA* e *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratamento, TT= Tratamento total.

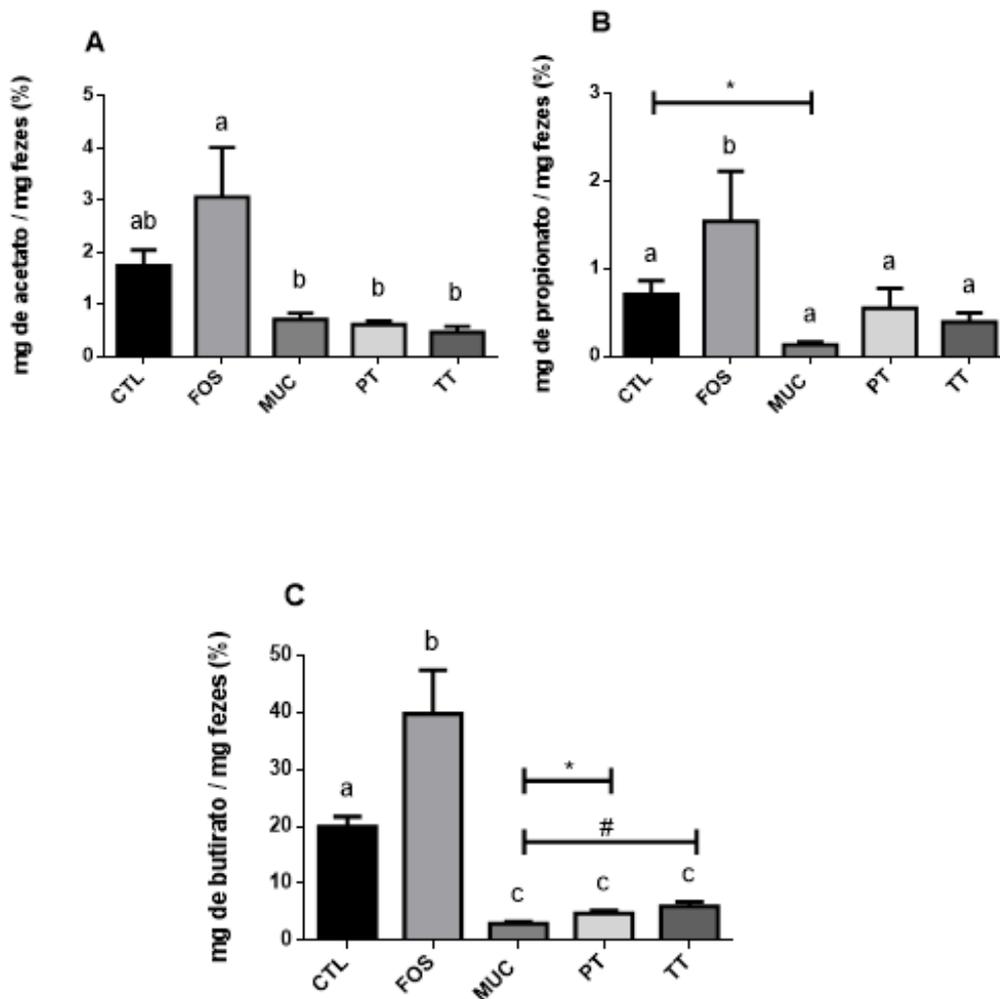
### 5.10 Dosagem de AGCC nas fezes

A figura 21 apresenta os resultados da dosagem de AGCC. A concentração de acetato (Figura 21 A) está aumentada no grupo FOS, quando comparado a CTL ( $p < 0,05$ ), os grupos MUC, PT e TT apresentam concentração reduzida quando comparado aos controles CTL e FOS ( $p < 0,05$ ).

A concentração de propionato (Figura 21 B) está aumentada no grupo FOS quando comparado aos outros grupos, CTL, MUC, PT e TT ( $p < 0,05$ ). Os grupos CTL, MUC,

PT e TT não apresentaram diferença estatística entre si ( $p > 0,05$ ), porém ao realizar teste T entre CTL e MUC foi encontrada diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Na figura 21 C, observa-se a dosagem de butirato, que está aumentada no grupo FOS comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Nos grupos com mucosite, MUC, PT e TT a concentração deste ácido graxo está diminuída comparado aos controles CTL e FOS. Ao se realizar teste T entre MUC e PT e MUC e TT, foi demonstrada diferença entre esses grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 21. Dosagem de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes.**

(A) Concentração de acetato, (B) concentração propionato e (C) concentração de butirato. Dados expressos em média  $\pm$  SEM ( $n=8$ ). Letras diferentes indicam que há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ; *one-way ANOVA* e *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*). As barras representam diferenças estaticamente significativa entre

grupos específicos realizada por Test T. CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratamento, TT= Tratamento total.

## 6. DISCUSSÃO

Mais da metade dos pacientes em quimioterapia fazendo uso de 5-FU desenvolvem mucosite. Esta enfermidade causa lesões nas células basais do trato gastrointestinal, resultando em danos a mucosa e intensa reação inflamatória com consequente ulceração, o que compromete a barreira intestinal. Também ocorre efeito deletério da microbiota levando a disbiose, há ainda o rompimento das junções firmes o que aumenta a PI favorecendo a translocação bacteriana (BASILE et al., 2019; DE MIRANDA et al., 2019; TANG et al., 2017).

Vários estudos têm demonstrado que os prebióticos aumentam a integridade da mucosa intestinal, preservando a altura das vilosidades, aumentando a produção e liberação de mucinas e melhorando a composição do biofilme que recobre a mucosa, demonstrando assim grande potencial para modular infecções intestinais (CAETANO et al., 2016; TREMAROLI; BÄCKHED, 2012; YASMIN et al., 2015). Os prebióticos tem recebido atenção por estimularem o sistema imune, o que contribui para redução da inflamação no epitélio intestinal e, conseqüentemente, propicia a redução da translocação bacteriana do lúmen para órgãos estéreis (GIBSON et al., 2010a). Além disso, os prebióticos destacam-se também como potentes moduladores da microbiota intestinal beneficiando a saúde do hospedeiro, atuando como fonte de alimento e estimulando o crescimento de diversas bactérias intestinais benéficas, cujos metabólitos, os AGCC, reduzem o pH luminal e, conseqüentemente reduzindo o crescimento de algumas bactérias patogênicas. O FOS é um dos prebiótico mais utilizados atualmente para a melhora do funcionamento intestinal por meio da modulação da microbiota (AZIMIRAD et al., 2016; CAETANO et al., 2016; GIBSON et al., 2010b; MAO et al., 2019).

O presente estudo teve como base os resultados publicados pelo nosso grupo de pesquisa (GALDINO et al., 2018), no qual a suplementação com FOS no pré-tratamento foi capaz de minimizar os efeitos da mucosite induzida por 5-FU em modelo experimental. Desta forma, foram propostos novos ensaios e uma nova modalidade de tratamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do pré-tratamento e do tratamento total sobre a mucosite intestinal.

No presente trabalho, observou-se que os camundongos dos grupos que receberam a injeção intraperitoneal de 5-FU (MUC, PT e TT) apresentaram diminuição da ingestão alimentar e significativa perda de peso corporal 72 horas após a indução da mucosite. Esses resultados estão de acordo com aqueles previamente encontrados por (GENEROSO et al., 2015; LEOCÁDIO et al., 2015; TRINDADE et al., 2018) que já haviam demonstrado redução no consumo alimentar e perda significativa de peso nos animais que receberam este quimioterápico. Também foi observado que o tratamento com FOS não foi capaz de prevenir a perda de peso e preservar o consumo alimentar, contribuindo para a perda de peso (DE BARROS et al., 2016; GALDINO et al., 2018; WANG; HAN; ZHANG, 2019). Antes da indução da mucosite, não foi observada perda de peso nem redução do consumo alimentar em nenhum dos grupos analisados.

Uma característica importante da mucosite são as ulcerações causadas na mucosa, o que gera degradação da barreira intestinal e consequente aumento da PI a agentes tóxicos presentes no lúmen (BARROS et al., 2018; RAO; SAMAK, 2013). A investigação da permeabilidade intestinal (PI) foi realizada no 10º dia do protocolo experimental. Para esta análise foi determinado o percentual de  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA presente no sangue dos animais. Este método utiliza a macromolécula DTPA, que raramente atravessa a barreira intestinal em condições fisiológicas. A ocorrência de rupturas no epitélio intestinal com afrouxamento das junções firmes, responsáveis pelo controle da permeabilidade paracelular, permite que o fármaco radiomarcado atravessasse estes espaços podendo assim ser identificado no sangue (ANDRADE et al., 2015; SHETH et al., 2010). O grupo MUC apresentou aumento da PI quando comparado aos demais grupos, estudos prévios do nosso grupo já haviam demonstrado aumento da PI 72 horas após a administração de 5-FU (BARROS et al., 2018; GENEROSO et al., 2015; TRINDADE et al., 2018). Este aumento está relacionado com os achados histológicos e de junções firmes que mostraram o comprometimento da barreira intestinal no grupo em questão.

Observaram-se níveis fisiológicos de PI nos grupos tratados PT e TT, semelhantes aos grupos CTL e FOS corroborando com os achados de (GALDINO et al., 2018). Estes dados são reforçados pela análise histológica do íleo, que mostra ausência de

alterações nos grupos CTL e FOS. Nos grupos PT e TT a recuperação da mucosa intestinal foi parcial, porém com maior preservação da altura das vilosidades e profundidade das criptas quando comparados ao grupo MUC. Além disso, pode-se dizer com base nas análises morfométricas que a ação trófica do FOS (Grupo TT) na mucosa foi melhor que PT. Desta forma, a administração do FOS apresenta melhor eficácia quando o tratamento não é interrompido, sendo capaz de continuar exercendo seu efeito através da fermentação pela microbiota, ainda que esta esteja alterada.

Quando ocorre a perda da integridade do epitélio intestinal, as bactérias comensais presentes no lúmen podem penetrar na mucosa podendo ocorrer translocação. Nestas circunstâncias, bactérias normalmente inócuas, como a *E. coli* não-patogênica, podem invadir a corrente sanguínea causando infecção sistêmica, esta invasão caracteriza a translocação bacteriana (TB) (BALZAN, 2007; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). A avaliação dos efeitos da suplementação com FOS na TB foi determinada pelo método de marcação da *E. coli* com radioisótopo  $^{99m}\text{Tc}$ . Essa técnica permite a detecção rápida e direta de fragmentos e células bacterianas, viáveis ou não, presentes em vários locais do organismo (GENEROSO et al., 2011; VIANA et al., 2010). Os dados encontrados indicam um aumento na TB do grupo MUC, demonstrado pela captação significativa de  $^{99m}\text{Tc}$ -*E. coli* no sangue, baço, fígado, pulmão e linfonodos mesentéricos (LNM) quando comparado aos grupos controle CTL e FOS. Dados semelhantes foram demonstrados por (BARROS et al., 2018) em modelo de mucosite induzida por 5-FU.

O pré-tratamento e o tratamento total com FOS foram capazes de reduzir a TB no sangue, fígado e baço em relação ao controle, resultado que está de acordo com os achados de PI e junções firmes. Demonstrando que a recuperação parcial da mucosa foi capaz de minimizar a translocação para estes órgãos. Entretanto, as duas modalidades de tratamento não preveniram a translocação para os LNM e níveis intermediários de TB foram encontrados nos pulmões. Dados têm demonstrado duas principais vias por onde podem ocorrer a translocação: via transcelular, através dos enterócitos e via paracelular através das junções firmes. Da mesma maneira existem duas vias principais em que as bactérias podem atingir a corrente sanguínea, pelo sistema venoso entérico, pela veia porta ou pela drenagem linfática entérica

(BALZAN, 2007; MAGNOTTI et al., 1998). A linfa mesentérica é filtrada e atinge a circulação sistêmica e a veia pulmonar sendo filtrada primeiramente nos pulmões (MAGNOTTI et al., 1998) isto pode explicar os achados de TB nos grupos PT e TT em que a presença de  $^{99m}\text{Tc-E. coli}$  nos LNMs está em quantidades semelhantes a MUC e em valores intermediários nos pulmões (GENDA et al., 2017) encontraram aumento da translocação bacteriana para os LNM, em modelo murino suplementado com FOS, sugerindo que esta translocação pode ocorrer devido ao aumento da permeabilidade no ceco e no cólon, no presente trabalho a histologia destes órgãos não foi avaliada.

Os dados encontrados de PI e TB estão em concordância com os resultados das análises histológicas do íleo visto que o grupo MUC apresenta evidente encurtamento das vilosidades e atrofia das criptas, com rompimento da borda em escova indicando escore histológico igual a 3. Do mesmo modo, as análises morfométricas mostraram que os animais do grupo MUC apresentaram todos os parâmetros reduzidos em relação ao controle. Esses achados encontram-se respaldados pela literatura conforme demonstrado por Hamouda *et al.* (2017) e (DE MIRANDA et al., 2019) em modelos experimentais de mucosite induzida por 5-FU (50 mg/kg por 6 dias). Observou-se que os animais dos grupos CTL e FOS apresentaram resultados dentro da normalidade para os parâmetros morfométricos e histológicos apresentando escore igual a 0. Ambos os tratamentos apresentaram benefícios na proteção do epitélio. Na análise da altura das vilosidades, profundidade das criptas e razão vilosidade/cripta os achados do grupo PT encontram-se reduzidos parcialmente em relação ao controle indicando escore entre 1 e 2. Entretanto, o grupo TT apresentou maior preservação do epitélio quando comparado aos grupos MUC e PT indicando escore histológico igual a 1. No grupo TT a maior preservação das vilosidades e das criptas é demonstrada pelos valores semelhantes ao controle. Ressalta-se que, até o presente momento não foram encontrados mais estudos que avaliaram a histologia em modelo de mucosite usando como tratamento a suplementação com FOS. A preservação parcial da arquitetura da mucosa e preservação das junções firmes contribuíram para diminuição da PI e TB nos grupos PT e TT. É provável que a diminuição da intensidade da inflamação como demonstrada pela diminuição de infiltrado de neutrófilos e eosinófilos também esteja relacionada a esse achado.

A análise da secreção de muco demonstrou que os animais com mucosite apresentaram redução da produção de muco em relação ao controle, resultado semelhante foi observado por (HONG et al., 2019) em indução de mucosite com 5-FU em ratos (LEFORESTIER et al., 2009) demonstrou que a suplementação com o prebiótico GOS em modelo animal foi capaz de aumentar a produção de muco em relação ao controle. Este resultado corrobora com o achado deste trabalho em que a produção de muco no grupo TT está aumentada em relação a MUC e similar a CTL e FOS. O pré-tratamento não foi capaz de manter a produção de muco em níveis fisiológicos, visto que a suplementação ocorreu apenas antes da indução da mucosite. Portanto, pode-se especular que para ocorrer efeito benéfico na manutenção da produção de muco o prebiótico deve estar presente antes e depois do início da doença (PHAM et al., 2018) em estudo *in vitro* demonstrou um aumento na produção de muco pelas células caliciformes que foram tratadas com xilooliogossacarídeos (XOS).

A integridade do espaço entre as células epiteliais é mantido pelas proteínas das junções firmes, que controlam a barreira intestinal paracelular. A degradação, ou até mesmo o relaxamento do citoesqueleto leva ao rompimento das junções firmes e, por conseguinte, o aumento da permeabilidade intestinal (PUROHIT et al., 2008; RAO; SAMAK, 2013). Os resultados obtidos na análise das junções firmes mostraram que a expressão de ZO-1 e ocludina no grupo MUC estão diminuídas, indicando que as lesões no epitélio destruíram parcialmente estas proteínas como demonstrado no trabalho de (BARROS et al., 2018) e (LI et al., 2017). As duas modalidades de tratamento PT e TT foram capazes de manter a expressão destas proteínas em níveis semelhantes aos controles, indicando que o FOS foi capaz de atenuar as lesões nas junções (RUSSO et al., 2012) demonstraram que a suplementação com prebióticos em indivíduos saudáveis foi capaz de aumentar os níveis de ZO-1. Já (SO et al., 2018) encontraram expressão de ocludina aumentada nos grupos com Síndrome do intestino irritável (SII) tratados com prebiótico. (MATSUMOTO et al., 2017) também encontraram expressão aumentada de ZO-1 em camundongos tratados com FOS em modelo de esteatose hepática não alcoólica. Em modelo animal suíno suplementado com FOS (ZHAO et al., 2019) demonstraram expressão aumentada de ZO-1 e ocludina. Os resultados encontrados neste trabalho de PI e TB encontram-se respaldados pela manutenção da expressão das proteínas de junções firmes a níveis

fisiológicos após a administração do FOS, uma vez que a PI apresentou padrão fisiológico e ocorreu redução da TB para vários órgãos.

Outro importante componente da barreira intestinal é a sIgA. A principal função da sIgA é aglutinar microrganismos e prevenir a aderência de bactérias patogênicas e vírus na superfície da mucosa, logo sua produção aumentada favorece a defesa do organismo no trato gastrointestinal (ITO et al., 2011; SCHOLTENS et al., 2008). No presente estudo foi verificado que a indução da mucosite aumentou a produção de sIgA no grupo MUC e PT comparados ao controle como demonstrado por (DE JESUS et al., 2019). O tratamento total foi capaz de manter os níveis de sIgA semelhantes ao controle. O aumento na secreção de sIgA foi demonstrado por (YAMAMOTO et al., 2016) em ratos suplementados com FOS. (KOMURA et al., 2014) demonstraram aumento significativo na secreção de sIgA na mucosa intestinal de ratos suplementados com FOS. (GENDA et al., 2017) demonstraram em seu estudo com ratos, que a ingestão de FOS por um curto período (7-9 dias) aumentou as concentrações de sIgA. Os níveis aumentados de sIgA no grupo MUC e PT podem ser explicados por uma resposta fisiológica do organismo para manter a homeostase da mucosa intestinal frente ao aumento da permeabilidade causada pela inflamação (GENDA et al., 2018). No grupo TT os níveis de sIgA estão semelhantes ao controle, indicando que o FOS foi capaz de manter a produção desta imunoglobulina em níveis fisiológicos.

FOS é capaz de fazer a mediação entre a estimulação da proliferação de bactérias produtoras de ácido lático e aumento da resposta de sIgA no intestino, dando suporte a hipótese de que a modificação no número de bactérias ácido-lácticos induzida por suplementação com prebióticos é necessária para mudanças na produção e secreção de IgA no lúmen intestinal (KOMURA et al., 2014; WILSON; WHELAN, 2017).

Os achados de histologia e junções firmes encontrados no presente estudo, mostraram que os tratamentos com FOS foram capazes de amenizar os efeitos inflamatórios na arquitetura da mucosa. Este fato explica a prevenção que o FOS apresentou na PI e TB devido à preservação da barreira intestinal. O FOS também manteve os níveis de sIgA e muco em níveis fisiológicos no grupo que recebeu o

tratamento total, indicando que o efeito causado ocorre na presença do prebiótico, visto que o mesmo resultado não foi encontrado no grupo PT.

A presença de infiltrado inflamatório na mucosa intestinal é característica comum da mucosite (SONIS, 2004). Este aumento tem sido relatado em diversos trabalhos que avaliaram a mucosite intestinal induzida por 5-FU como (DE BARROS et al., 2016; GALDINO et al., 2018; SOARES et al., 2008). Neutrófilos são as primeiras células efetoras recrutadas para o local da inflamação, onde internalizam, matam e digerem bactérias e fungos. Os neutrófilos também liberam grânulos em resposta a inflamação, dentre estes a mieloperoxidase (MPO) que tem sua atividade aumentada nas primeiras horas após administração de 5-FU (CRUVINEL et al., 2010; VINOLO et al., 2011). Neste estudo observou-se maior infiltrado de neutrófilos no íleo dos animais do grupo MUC, comparado aos controles como demonstrado por (DE MIRANDA et al., 2019) em modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-FU. Nos grupos PT e TT houve redução da infiltração, semelhantes aos controles, indicando que os tratamentos preveniram o recrutamento de neutrófilos como demonstrado por (GALDINO et al., 2018). A migração transcelular exacerbada de neutrófilos, durante a resposta a inflamação, pode danificar a integridade das células epiteliais o que também pode explicar as lesões encontradas no epitélio (MAEDA et al., 2010).

Os leucócitos desempenham papel fundamental na inflamação, induzindo a inflamação através da produção e liberação de grânulos, em sua maioria proteínas e a peroxidase de eosinófilos (EPO), que tem grande potencial citotóxico em parasitas (CRUVINEL et al., 2010). A EPO é bastante empregada para estudo indireto da atividade de eosinófilos em tecidos e seu aumento foi relatado em modelo de mucosite intestinal após administração de 5-FU por (LEOCÁDIO et al., 2015) e (DE BARROS et al., 2016). A presença de eosinófilos na mucosa intestinal em doenças inflamatórias intestinais está associada a condições clínicas desfavoráveis, como má-absorção, perda de peso e alterações na arquitetura da mucosa, com diminuição das criptas e achatamento das vilosidades.(VIEIRA et al., 2012) encontraram atividade de MPO e EPO aumentada em modelo de mucosite induzida por 5-FU. O infiltrado de eosinófilos apresentou resultados similares àqueles observados para os neutrófilos, com aumento apenas no grupo MUC. Ambos os tratamentos, PT e TT foram capazes de

minimizar o infiltrado de eosinófilos, corroborando com os achados de (GALDINO et al., 2018) e (TRINDADE et al., 2018) que também encontraram redução na concentração de EPO em modelo de mucosite induzida por 5-FU com uso de simbióticos como tratamento.

A mucosite intestinal induzida por quimioterapia desencadeia a produção de EROS que ativa o fator de transcrição inflamatório NF- $\kappa$ B, aumentando a produção de citocinas inflamatórias (MAEDA et al., 2010). A expressão de IL-10 não apresentou diferença entre os grupos estudados. O mesmo nível de expressão de IL-10 no grupo MUC em relação aos controles pode ser explicado como uma resposta do organismo ao processo inflamatório. (JOHNSON-HENRY et al., 2014) demonstraram que a suplementação com FOS foi capaz de manter os níveis de IL-10 similares ao controle. (CHEN et al., 2017) também não encontraram diferença nas concentrações de IL-10 entre os grupos, em estudo de modelo murino de SII tratado com prebiótico contendo FOS e GOS na dose de 1,26 mg/g de peso.

TNF-  $\alpha$  parece desempenhar um importante papel na regulação da barreira epitelial visto que neutraliza anticorpos restaurando a função de barreira (PUROHIT et al., 2008). A secreção de TNF- $\alpha$  se apresentou diminuída em todos os grupos com mucosite, (WILMS et al., 2016) em estudo para avaliação da permeabilidade intestinal em pacientes saudáveis, suplementados com probiótico mais FOS, não encontrou alterações na concentração de TNF- $\alpha$  entre o grupo controle e o grupo suplementado. (LEFORESTIER et al., 2009) também não encontraram alterações na produção desta citocina em camundongos suplementados com GOS. Porém ao se realizar o cálculo da razão entre TNF- $\alpha$  e IL-10, foram observados valores intermediários nos grupos PT e TT demonstrando ação de modulação do FOS na produção de citocinas. (VOGT et al., 2013) demonstraram que o efeito dos prebióticos na produção de citocinas depende da dose e do tamanho da cadeia do frutano utilizado. A razão entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pode ser utilizada para demonstrar o efeito regulatório do FOS no balanço das citocinas.

A produção de AGCC é uma via direta da ação do FOS e tem demonstrado importante papel na barreira intestinal. (VINOLO et al., 2009) demonstraram que o butirato e

propionato foram capazes de inibir a produção de citocinas pro-inflamatórias demonstrando efeito anti-inflamatório. Em relação à produção de AGCC, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram aumento da produção de acetato, propionato e butirato no grupo FOS quando comparado ao controle. (DAGUET et al., 2016) utilizando modelo SHIME® (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) e modelo celular encontraram resultado semelhante. A concentração de acetato encontrou-se diminuída no grupo MUC em relação ao controle. As duas modalidades de tratamento PT e TT não foram capazes de recuperar a produção de acetato para níveis fisiológicos. Os níveis de propionato encontrados são fisiológicos, tanto MUC, PT e TT mostraram os mesmos níveis observados para o CTL.

A análise do butirato demonstrou taxas reduzidas no grupo MUC em relação aos controles. Foi demonstrada diferença estatística entre MUC e PT e MUC e TT. *Matsumoto et. al.* (2017) demonstraram que camundongos com disbiose induzida por dieta deficiente em metionina e colina (DMC) que receberam 5% de FOS apresentaram aumento nos níveis de AGCC, acetato, propionato e butirato no grupo tratado com FOS, quando comparado ao controle DMC. (GÜRBÜZ et al., 2010) não encontraram diferença na produção de acetato, butirato e propionato em modelo animal suplementado com FOS. (SO et al., 2018) em estudo de revisão não encontrou diferença na concentração de acetato e propionato nos grupos suplementados com prebióticos comparados ao controle, já a concentração de butirato apresentou aumento significativo comparado ao controle. Os prebióticos estimulam principalmente bifidobactérias e lactobacilos, que produzem como metabólitos principais lactato e acetato (LOCKYER; STANNER, 2019). Mais de 90% dos AGCC produzidos no intestino são absorvidos no ceco e no epitélio colônico, assim níveis de AGCC nas fezes são um indicador pobre de fermentação de carboidratos, (KOLEVA et al., 2012) não encontraram diferença na produção de AGCC em modelo de colite em ratos, suplementados com FOS e inulina.

A produção de AGCC está intimamente relacionado a microbiota, (LI et al., 2017) demonstraram que a mucosite induzida por 5-FU alterou a composição da microbiota tanto quantitativa quanto qualitativamente. Nesse sentido a produção de AGCC pode

ter sido prejudicada pela disbiose causada pelo quimioterápico, apesar do tratamento com FOS.

## **7. CONCLUSÃO**

O pré-tratamento e o tratamento total com FOS, na mucosite experimental, apresentaram efeitos benéficos reduzindo o infiltrado inflamatório, com preservação parcial da arquitetura da mucosa intestinal e consequente redução da permeabilidade intestinal e, por conseguinte, da translocação bacteriana.

As modalidades de tratamento (PT e TT) promoveram a manutenção de níveis fisiológicos da expressão de proteínas de junções firmes (Zonulina e Ocludina) e melhor balanço entre as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10

O tratamento total apresentou melhores resultados comparado ao pré-tratamento em relação à produção de muco e a produção de sIgA.

Os resultados obtidos credenciam o emprego do FOS como estratégia alternativa para a prevenção e/ou tratamento da mucosite intestinal experimental, induzida por 5-FU.

## **8. PERSPECTIVAS**

- Determinar os efeitos do FOS na composição da microbiota intestinal em modelo experimental;
- Avaliar o efeito do FOS em modelo experimental envolvendo tumor e, ao mesmo tempo, o emprego do quimioterápico 5-FU.
- Estudar a possibilidade junto ao Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas da UFMG, de realizar ensaios clínicos em pacientes submetidos ao tratamento de câncer com quimioterapia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBARI, P. et al. Characterizing microbiota-independent effects of oligosaccharides on intestinal epithelial cells: insight into the role of structure and size. **Eur J Nutr**, [s. l.], v. 56, 2017.

AKRAM, W.; GARUD, N.; JOSHI, R. Role of inulin as prebiotics on inflammatory bowel disease. **Drug Discoveries & Therapeutics**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–8, 2019.

ALLAIRE, J. M. et al. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 39, n. 9, p. 677–696, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002>>

ANDRADE, M. E. R. et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. **Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. 1080–1087, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2015.01.012>>

AZIMIRAD, M. et al. The effects of feeding with synbiotic (*Pediococcus acidilactici* and fructooligosaccharide) enriched adult *Artemia* on skin mucus immune responses, stress resistance, intestinal microbiota and performance of angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Fish and Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 54, p. 516–522, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.001>>

BALZAN, S. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. **J Gastroenterol Hepatol**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 464–471, 2007.

BARRERA-BUGUEÑO, C. et al. Anxiogenic effects of a *Lactobacillus*, inulin and the synbiotic on healthy juvenile rats. **Neuroscience**, [s. l.], v. 359, p. 18–29, 2017. Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez27.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0306452217304700>>. Acesso em: 10 jul. 2019.

BARROS, P. A. V. et al. Conjugated linoleic acid prevents damage caused by intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in an experimental model. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 103, n. April, p. 1567–1576, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.133>>

BASILE, D. et al. Mucosal Injury during Anti-Cancer Treatment: From Pathobiology to Bedside. **Cancers**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 857, 2019.

CAETANO, B. F. R. et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a food supplement: Health-promoting benefits of fructooligosaccharides. **Nutrients**, [s. l.], v. 8, n. 7, 2016.

CATRY, E. et al. Targeting the gut microbiota with inulin-type fructans: preclinical demonstration of a novel approach in the management of endothelial dysfunction. **Gut microbiota**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 271–283, 2018.

CERDÓ, T. et al. **The role of probiotics and prebiotics in the prevention and treatment of obesity**, MDPI AG, 2019.

CEREDA, E.; CARACCIA, M.; CACCIALANZA, R. Probiotics and mucositis. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 399–404, 2018.

CHANG, C. T. et al. 5-fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- $\kappa$ B activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 1–8, 2012.

CHEN, Q. et al. A novel prebiotic blend product prevents irritable bowel syndrome in mice by improving gut microbiota and modulating immune response. **Nutrients**, [s. l.], v. 9, n. 12, 2017.

CHOQUE DELGADO, T. G. et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)-derived fructooligosaccharides improves the immune parameters in the mouse. **Nutrition Research**, [s. l.], v. 32, n. 11, p. 884–892, 2012.

COLLINS, S.; GREGOR, R. Distant Site Effects of Ingested Prebiotics. **Nutrients**, [s. l.], p. 1–20, 2016.

CRUVINEL, W. D. M. et al. Fundamentals of innate immunity with. **Bras J Rheumatol**, [s. l.], v. 55, n. 11, 2010.

CUI, M. et al. Faecal microbiota transplantation protects against radiation-induced toxicity. **EMBO Mol Med**, [s. l.], v. 9, p. 448–461, 2017. Disponível em: <<https://www.embopress.org/doi/pdf/10.15252/emmm.201606932>>. Acesso em: 10 jul. 2019.

DAGUET, D. et al. Arabinogalactan and fructooligosaccharides improve the gut barrier function in distinct areas of the colon in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 20, p. 369–379, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.005>>

DAVANI-DAVARI, D. et al. Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. **Foods**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 1–27, 2019. a.

DAVANI-DAVARI, D. et al. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. **Foods**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 92, 2019. b. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2304-8158/8/3/92>>. Acesso em: 10 jul. 2019.

DE BARROS, P. A. V. et al. Effect of Conjugated Linoleic Acid-enriched Butter After 24 hours of Intestinal Mucositis Induction. **Nutrition and Cancer**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2016.1225100>>

DE JESUS, L. C. L. et al. Protective effect of *Lactobacillus* in a model of 5 Fluorouracil-Induced intestinal mucositis .pdf. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 53, p. 197–207, 2019.

DE MIRANDA, J. A. L. et al. Protective effect of cashew gum (*Anacardium occidentale* L.) on 5-fluorouracil-induced intestinal Mucositis. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 1–17, 2019.

DE OLIVEIRA, A. J. B. et al. Structure and degree of polymerisation of

fructooligosaccharides present in roots and leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 129, n. 2, p. 305–311, 2011.

DE SANCTIS, V. et al. Lactobacillus brevis CD2 for Prevention of Oral Mucositis in Patients With Head and Neck Tumors: A Multicentric Randomized Study. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 39, p. 1935–1942, 2019. Disponível em: <<http://ar.iijournals.org/content/39/4/1935.full.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2019.

DEN BESTEN, G. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 54, n. 9, p. 2325–2340, 2013.

DENIPOTE, F. G.; MORAES, T. E. B. S. De; CARLOS, B. R. Probiotics and prebiotics in primary care for colon cancer . **Arquivos de gastroenterologia**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 93–98, 2010.

FERREIRA, T. M. et al. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. **Lipids**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 669–678, 2012.

FERREIRA, T.; RASBAND, W. **ImageJ User Guide ImageJ User Guide IJ 1.46r**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://fiji.sc/guide.git>>.

FOOD AND NUTRITION BOARD. **Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids**, 2002. Disponível em: <<http://www.nap.edu>>

GALDINO, F. et al. Pretreatment and treatment with fructo-oligosaccharides attenuate intestinal mucositis induced by 5-FU in mice. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 49, n. July, p. 485–492, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.09.012>>

GENDA, T. et al. Fructo-oligosaccharide-Induced Transient Increases in Cecal Immunoglobulin A Concentrations in Rats Are Associated with Mucosal Inflammation in Response to Increased Gut Permeability. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 147, n. 10, p. 1900–1908, 2017.

GENDA, T. et al. The impact of fructo-oligosaccharides on gut permeability and inflammatory responses in the cecal mucosa quite differs between rats fed semi-purified and non-purified diets. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, [s. l.], v. 64, n. 5, p. 357–366, 2018.

GENEROSO, S. D. V. et al. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. **Lipids in Health and Disease**, [s. l.], p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12944-015-0052-z>>

GENEROSO, S. V. et al. 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**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 261–269, 2011.

GIBSON, G. R. et al. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–19, 2010. a.

GIBSON, G. R. et al. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–19, 2010. b. Disponível em: <<http://www.atypon-link.com/IFIS/doi/abs/10.1616/1476-2137.15880>>

GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrgastro.2017.75>>. Acesso em: 15 jul. 2019.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 125, n. 6, p. 1401–1412, 1995.

GIDLEY, M. J.; YAKUBOV, G. E. Functional categorisation of dietary fibre in foods: Beyond “soluble” vs “insoluble”. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 86, p. 563–568, 2019.

GRAZIANI, C. et al. Intestinal permeability in physiological and pathological conditions: major determinants and assessment modalities. **European review for medical and pharmacological sciences**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 795–810, 2019.

GÜRBÜZ, E. et al. Effects of supplemental fructo-oligosaccharide and mannan-oligosaccharide on nutrient digestibilities, volatile fatty acid concentrations, and immune function in horses. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 39–44, 2010.

HAMER, H. M. et al. Review article: The role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 104–119, 2008.

HAMOUDA, N. et al. Apoptosis, Dysbiosis and Expression of Inflammatory Cytokines are Sequential Events in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Mice. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 121, n. 3, p. 159–168, 2017.

HONG, Z. et al. The protective effects of Aquilariae Lignum Resinatum extract on 5-Fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 54, n. August 2017, p. 308–317, 2019.

HOWARTH, G. S. et al. Milk Growth Factors Enriched from Cheese Whey Ameliorate Intestinal Damage by Methotrexate When Administered Orally to Rats. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 126, n. 10, p. 2519–2530, 1996.

ITO, H. et al. Degree of polymerization of inulin-type fructans differentially affects number of lactic acid bacteria, intestinal immune functions, and immunoglobulin a secretion in the rat cecum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 59,

n. 10, p. 5771–5778, 2011.

JOHANSSON, M. E. V et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Gut Microbes**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 51–54, 2010.

JOHNSON-HENRY, K. C. et al. Short-Chain Fructo-oligosaccharide and Inulin Modulate Inflammatory Responses and Microbial Communities in Caco2-bbe Cells and in a Mouse Model of Intestinal Injury. **Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 144, n. 11, p. 1725–1733, 2014. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/jn.114.195081>>

KOLEVA, P. et al. Chemically Defined Diet Alters the Protective Properties of Fructo-Oligosaccharides and Isomalto-Oligosaccharides in HLA-B27 Transgenic Rats. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 11, 2014.

KOLEVA, P. T. et al. Inulin and fructo-oligosaccharides have divergent effects on colitis and commensal microbiota in HLA-B27 transgenic rats. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 108, n. 09, p. 1633–1643, 2012. Disponível em: <<http://www.journals.cambridge.org/abstract>>

KOMURA, M. et al. A short-term ingestion of fructo-oligosaccharides increases immunoglobulin A and mucin concentrations in the rat cecum, but the effects are attenuated with the prolonged ingestion. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [s. l.], v. 78, n. 9, p. 1592–1602, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2014.925782>>

KYAZZE, G. et al. Direct fermentation of fodder maize, chicory fructans and perennial ryegrass to hydrogen using mixed microflora. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 99, n. 18, p. 8833–8839, 2008.

LALLA, R. V; T., S. S.; E., P. D. Management of Oral Mucositis in Patients Who Have Cancer. **Dental Clinics of North America**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 61–77, 2008.

LEFORESTIER, G. et al. Effects of galacto-oligosaccharide ingestion on the mucosa-associated mucins and sucrase activity in the small intestine of mice. **European Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 48, n. 8, p. 457–464, 2009.

LEOCÁDIO, P. C. L. et al. L-Arginine Pretreatment Reduces Intestinal Mucositis as Induced by 5-FU in Mice. **Nutrition and Cancer**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 486–493, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01635581.2015.1004730>>

LI, H.-L. et al. Alteration of Gut Microbiota and Inflammatory Cytokine/Chemokine Profiles in 5-Fluorouracil Induced Intestinal Mucositis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. October, p. 1–14, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00455/full>>

LIU, J. et al. Prebiotic effects of diet supplemented with the cultivated red seaweed *Chondrus crispus* or with fructo-oligo-saccharide on host immunity, colonic microbiota and gut microbial metabolites. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12906-015->

0802-5>

LOCKYER, S.; STANNER, S. Prebiotics – an added benefit of some fibre types. **Nutrition Bulletin**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 74–91, 2019.

LOGAN, R. M. et al. Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 239–251, 2009.

LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, G. D. P. H. P. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature.Com**, [s. l.], v. 3, n. May, p. 330–338, 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrc/journal/v3/n5/full/nrc1074.html>>

LOWRY, O. H. et al. The folin by oliver. **J. Biol. Chem**, [s. l.], v. 193, p. 265–275, 1951.

MAEDA, T. et al. Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, [s. l.], v. 65, n. 6, p. 1117–1123, 2010.

MAGNOTTI, L. J. et al. Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial cell permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock. **Annals of Surgery**, [s. l.], v. 228, n. 4, p. 518–527, 1998.

MAIOLI, T. U. Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. **Journal of negative results in biomedicine**, [s. l.], v. 13, p. 6, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4004512>>

MAO, W. et al. A new engineered endo-inulinase with improved activity and thermostability: Application in the production of prebiotic fructo-oligosaccharides from inulin. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 294, n. April, p. 293–301, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.062>>

MARTINS, F. S. et al. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 270–279, 2013.

MATSUMOTO, K. et al. Fructo-oligosaccharides and intestinal barrier function in a methionine–choline-deficient mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1–14, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0175406>>

MAZMANIAN, S. K. et al. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. **Cell**, [s. l.], v. 122, n. 1, p. 107–118, 2005.

MCMANUS, J. F. A.; MOWRY, R. W. Staining methods Histologic and histochemical. **Journal of Medical Education**, [s. l.], p. 406, 1960.

MILLER, V. et al. Fruit, vegetable, and legume intake, and cardiovascular disease and deaths in 18 countries (PURE): a prospective cohort study. **The Lancet**, [s. l.], v. 390, n. 10107, p. 2037–2049, 2017.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

NOBRE, C. et al. Process development for the production of prebiotic fructo-oligosaccharides by penicillium citreonigrum. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 282, n. January, p. 464–474, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.053>>

ORIÁ, R. B. et al. **INTEGRAÇÃO BÁSICO-CLÍNICA**. 1ª ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 2016.

PASCHOAL, V. **Nutrição Clínica Funcional: dos princípios à prática clínica**. São Paulo: VP Editora, 2008.

PENG, L. et al. Effects of butyrate on intestinal barrier function in a caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. **Pediatric Research**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 37–41, 2007.

PETERSON, L. W.; DAVID, A. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Publishing Group**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 141–153, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3608>>

PHAM, V. T. et al. The effects of fermentation products of prebiotic fibres on gut barrier and immune functions in vitro. **PeerJ**, [s. l.], v. 2018, n. 8, 2018.

PHAM, V. T.; MOHAJERI, M. H. The application of in vitro human intestinal models on the screening and development of pre-And probiotics. **Beneficial Microbes**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 725–742, 2018.

PUROHIT, V. et al. Alcohol, intestinal bacterial growth, intestinal permeability to endotoxin, and medical consequences: Summary of a symposium. **Alcohol**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 349–361, 2008.

QUIRINO, I. E. P. et al. The role of L-arginine and inducible nitric oxide synthase in intestinal permeability and bacterial translocation. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 392–400, 2013.

QUIRINO, I. E. P.; CORREIA, M. I. T. D.; CARDOSO, V. N. The impact of arginine on bacterial translocation in an intestinal obstruction model in rats. **Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 335–340, 2007. Disponível em: <<https://www-scienceirect.ez27.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0261561407000064>>. Acesso em: 10 jul. 2019.

RAJKUMAR, H. et al. Effect of Probiotic Lactobacillus salivarius UBL S22 and Prebiotic Fructo-oligosaccharide on Serum Lipids, Inflammatory Markers, Insulin Sensitivity, and Gut Bacteria in Healthy Young Volunteers. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 289–298, 2015. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1074248414555004>>

RAJU, J. et al. Fermentable Carbohydrates Differentially Affect Colon Tumor Formation in Azoxymethane-Induced Male Fischer 344 Rats. **The Journal of**

**Nutrition**, [s. l.], v. 146, n. 4, p. 737–744, 2015.

RAO, K. R.; SAMAK, G. Protection and Restitution of Gut Barrier by Probiotics: Nutritional and Clinical Implications. **Current Nutrition & Food Science**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 99–107, 2013.

RAO, R. K.; G., S. Protection and Restitution of Gut Barrier by Probiotics: Nutritional and Clinical Implications. **Current nutrition and food science**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 99–107, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3864899>>

RÍOS-COVIÁN, D. et al. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. FEB, p. 1–9, 2016.

RUSSO, F. et al. Inulin-enriched pasta improves intestinal permeability and modifies the circulating levels of zonulin and glucagon-like peptide 2 in healthy young volunteers. **Nutrition Research**, [s. l.], v. 32, n. 12, p. 940–946, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2012.09.010>>

SAKAI, H. et al. 5-Fluorouracil Induces Diarrhea with Changes in the Expression of Inflammatory Cytokines and Aquaporins in Mouse Intestines. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–11, 2013.

SAKAI, H. et al. Neutrophil recruitment is critical for 5-fluorouracil-induced diarrhea and the decrease in aquaporins in the colon. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 87, p. 71–79, 2014. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2014.05.012>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

SAKAI, H. et al. Neutrophil recruitment is critical for 5-fluorouracil-induced diarrhea and the decrease in aquaporins in the colon. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 87, p. 71–79, 2014. b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2014.05.012>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 442–457, 2005.

SANTANA, L. de Á. et al. Monitoramento do tratamento de úlceras de perna através do software imagej. **Anais**, [s. l.], 2006.

SCHNEEBERGER, K. et al. Intestinal epithelial cell polarity defects in disease: lessons from microvillus inclusion disease. **Disease Models & Mechanisms**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. dmm031088, 2018.

SCHOLTENS, P. A. M. J. et al. Fecal Secretory Immunoglobulin A Is Increased in Healthy Infants Who Receive a Formula with Short-Chain Galacto-Oligosaccharides and Long-Chain Fructo-Oligosaccharides. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 138, n. 6, p. 1141–1147, 2008.

SCULLY, C.; JOEL, E.; STEPHEN, S. Oral mucositis: A challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy. Part 2: Diagnosis and

management of mucositis. **Head and Neck**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 77–84, 2004.

SHETH, P. et al. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in oxidative stress-induced disruption of tight junctions. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 49, p. 49239–49245, 2010.

SMIRICKY-TJARDES, M. R. et al. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. **Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 81, n. 10, p. 2535–2545, 2003.

SMITH, C. L. et al. Lactobacillus fermentum BR11 and Fructo-Oligosaccharide Partially Reduce Jejunal Inflammation in a Model of Intestinal Mucositis in Rats. **Nutrition and Cancer**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 757–767, 2008.

SO, D. et al. Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: A systematic review and meta-analysis. **American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 107, n. 6, p. 965–983, 2018.

SOARES, P. M. G. et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 91–98, 2008.

SONG, Y.; GYARMATI, P. Bacterial translocation in acute lymphocytic leukemia. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 1–13, 2019.

SONIS, S. T. the Biologic Role for Nuclear Factor-Kappab in Disease and Its Potential Involvement in Mucosal Injury Associated With Anti-Neoplastic Therapy. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 380–389, 2002. Disponível em: <<http://cro.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/154411130201300502>>

SONIS, S. T. Pathobiology of mucositis. **Seminars in Oncology Nursing**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 11–15, 2004.

SONIS, S. T. et al. Perspectives on Cancer Therapy-Induced Mucosal Injury. **Supplement to Cancer Perspectives**, [s. l.], v. 100, n. 9, 2004.

SONIS, S. T. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 45, n. 12, p. 1015–1020, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.08.006>>

SPENCE, J. R.; LAUF, R.; SHROYER, N. F. Vertebrate intestinal endoderm development. **Developmental Dynamics**, [s. l.], v. 240, n. 3, p. 501–520, 2011.

STRATH, M.; WARREN, D. J.; SANDERSON, C. J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 83, n. 2, p. 209–215, 1985.

STRINGER, A. M. et al. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. **Experimental biology and medicine**, [s. l.], v. 234, n. 4, p. 430–441, 2009. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19176868>>

SVENSSON, U. ; HÅKANSSON, J. Safety of Food and Beverages: Safety of Probiotics and Prebiotics. In: **Encyclopedia of Food Safety**. [s.l.] : Elsevier, 2014. p. 441–446.

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 292, n. 1–2, p. 17–23, 2004.

TANG, Y. et al. Administration of probiotic mixture DM#1 ameliorated 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis and dysbiosis in rats. **Nutrition**, [s. l.], v. 33, p. 96–104, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2016.05.003>>

THORPE, D. W.; M., S. A.; J., G. R. Chemotherapy-induced mucositis: the role of the gastrointestinal microbiome and toll-like receptors. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, [s. l.], v. 238, n. 1, p. 1–6, 2013. Disponível em: <<http://ebm.sagepub.com/content/238/1/1.full>>

TOUCHEFEU, Y. et al. Systematic review: The role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis - Current evidence and potential clinical applications. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 409–421, 2014.

TREMAROLI, V.; BÄCKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, [s. l.], v. 489, n. 7415, p. 242–249, 2012.

TRINDADE, L. M. et al. Oral administration of Simbioflora® (synbiotic) attenuates intestinal damage in a mouse model of 5-fluorouracil-induced mucositis. **Beneficial Microbes**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 477–486, 2018. Disponível em: <<https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/BM2017.0082>>. Acesso em: 19 ago. 2019.

TSUDA, M. et al. Dietary Fructo-Oligosaccharides Attenuate Early Activation of CD4+ T Cells Which Produce both Th1 and Th2 Cytokines in the Intestinal Lymphoid Tissues of a Murine Food Allergy Model. **International Archives of Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 174, n. 3–4, p. 121–132, 2017.

VAN DER FLIER, L. G.; HANS, C. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. **Annual Review of Physiology**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 241–260, 2009. Disponível em: <<http://b-log-ia20.blogspot.com.br/2016/%0A%0A>>

VANDENPLAS, Y. et al. Probiotics and prebiotics in prevention and treatment of diseases in infants and children. **Jornal de Pediatria**, [s. l.], v. 87, n. 4, p. 292–300, 2011. Disponível em: <<http://www.jped.com.br/Redirect.aspx?varArtigo=2209>>

VANDEPUTTE, D. et al. Prebiotic inulin-type fructans induce specific changes in the human gut microbiota. **Gut**, [s. l.], p. gutjnl--2016--313271, 2017. Disponível em: <<http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2016-313271>>

VELEZ, E. et al. Study of the effect exerted by fructo-oligosaccharides from yacon

(*Smallanthus sonchifolius*) root flour in an intestinal infection model with *Salmonella* Typhimurium. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 109, n. 11, p. 1971–1979, 2013. Disponível em: <<http://www.journals.cambridge.org/abstract>>

VIANA, M. L. et al. Pretreatment with arginine preserves intestinal barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. **Nutrition**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 218–223, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.005>>

VEIRA, E. L. M. et al. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis ☆. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 430–436, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.01.007>>

VINOLO, M. A. R. et al. Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. **Clinical science (London, England : 1979)**, [s. l.], v. 117, n. 9, p. 331–338, 2009. Disponível em: <<http://www.clinsci.org/content/117/9/331.abstract>>

VINOLO, M. A. R. et al. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 849–855, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.07.009>>

VITETTA, L. et al. Probiotics, prebiotics and the gastrointestinal tract in health and disease. **Inflammopharmacology**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 135–154, 2014.

VOGT, L. et al. Immune Modulation by Different Types of b2,1-Fructans Is Toll-Like Receptor Dependent. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1–12, 2013.

VOGT, L. et al. Immunological Properties Of Inulin-Type Fructans. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], n. January, p. 37–41, 2015.

WANG, H.; S., G. M.; S., H. G. Prebiotics: a potential treatment strategy for the chemotherapy-damaged gut? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], n. November, p. 37–41, 2014.

WANG, Y.; HAN, Q.; ZHANG, H. Evaluation of the toxicity of 5-fluorouracil on three digestive enzymes from the view of side effects. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 220, 2019.

WATKINS, C. et al. Microbial Therapeutics Designed for Infant Health. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 4, n. October, p. 1–8, 2017.

WILMS, E. et al. Effects of supplementation of the synbiotic Ecologic® 825/FOS P6 on intestinal barrier function in healthy humans: A randomized controlled trial. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 1–16, 2016.

WILSON, B.; WHELAN, K. Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, [s. l.], v. 32, p. 64–68, 2017.

YAMAMOTO, Y. et al. The Salivary IgA Flow Rate Is Increased by High Concentrations

of Short-Chain Fatty Acids in the Cecum of Rats Ingesting Fructooligosaccharides. **Nutrients**, [s. l.], v. 8, p. 3–13, 2016.

YASMIN, A. et al. Prebiotics, gut microbiota and metabolic risks: Unveiling the relationship. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 17, p. 189–201, 2015.

YEUNG, C. Y. et al. Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 1–16, 2015.

YU, T. et al. Effects of Prebiotics and Synbiotics on Functional Constipation. **The American Journal of the Medical Sciences**, [s. l.], v. 353, n. 3, p. 282–292, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.amjms.2016.09.014>>

ZHANG, Q. Y. et al. Natural product interventions for chemotherapy and radiotherapy-induced side effects. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 9, n. NOV, 2018. a.

ZHANG, S. et al. Assessment of dose-response relationship of 5-fluorouracil to murine intestinal injury. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 106, n. 1095, p. 910–916, 2018. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.029>>

ZHANG, S. et al. Assessment of dose-response relationship of 5-fluorouracil to murine intestinal injury. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 106, p. 910–916, 2018. c. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332218337260>>. Acesso em: 3 out. 2018.

ZHAO, W. et al. Short-chain fructo-oligosaccharides enhances intestinal barrier function by attenuating mucosa inflammation and altering colonic microbiota composition of weaning piglets. **Italian Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 976–986, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1612286>>

ZHOU, Z. et al. Starch structure modulates metabolic activity and gut microbiota profile. **Anaerobe**, [s. l.], v. 24, p. 71–78, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.09.012>>

## ANEXOS

### ANEXO I – Certificado CEUA

 <b>UFMG</b>	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> <b>CEUA</b> COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Prezado(a):	
Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.	
<b>Protocolo CEUA:</b> 66/2018 <b>Título do projeto:</b> Efeito de imunomoduladores e anti-oxidantes sobre a homeostase intestinal em modelos experimentais <b>Finalidade:</b> Pesquisa <b>Pesquisador responsável:</b> Valbert Nascimento Cardoso <b>Unidade:</b> Faculdade de Farmácia <b>Departamento:</b> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas	
<b>Situação atual:</b> <a href="#">Decisão Final - Aprovado</a>	
Aprovado com recomendação na reunião do dia 21/05/2018. Validade: 21/05/2018 à 20/05/2023 Prezado(a) pesquisador(a) o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados.	
Belo Horizonte, 21/05/2018.	
Atenciosamente,	
Sistema Solicite CEUA UFMG <a href="https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/">https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/</a>	
Universidade Federal <a href="#">de Minas Gerais</a> Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/ceua">www.ufmg.br/bioetica/ceua</a> - <a href="mailto:ceua@prpq.ufmg.br">ceua@prpq.ufmg.br</a>	

## ANEXO II – Certificado de premiação



