

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



**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EFEITO DE *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 E SEUS  
PRODUTOS SECRETADOS NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA  
POR 5- FLUOUROURACIL**

ORIENTADA: **Viviane Lima Batista**  
ORIENTADOR: **Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**  
CO-ORIENTADORAS: **Prof. Dra. Pamela Mancha Agresti e Prof. Dra. Mariana  
Martins Drumond**

BELO HORIZONTE  
2021

**Viviane Lima Batista**

**EFEITO DE *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 E SEUS  
PRODUTOS SECRETADOS NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA  
POR 5- FLUOUOURACIL**

**Versão final**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título mestre em Genética

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Co-orientadoras: Prof. Dra. Pamela Mancha-Agresti e Prof. Dra. Mariana Martins Drumond

BELO HORIZONTE  
2021



- 043 Batista, Viviane Lima.  
Efeito de *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 e seus produtos secretados na mucosite intestinal induzida por 5- fluorouracil [manuscrito] / Viviane Lima Batista. – 2021.  
100 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo. Co-orientadoras: Prof. Dra. Pamela Mancha Agresti e Prof. Dra. Mariana Martins Drumond.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.
1. Genética. 2. Mucosite. 3. Fluoruracila. 4. Probióticos. 5. *Lactobacillus delbrueckii*. 6. Imunomodulação. 7. Anti-Inflamatórios. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Agresti, Pamela Mancha. III. Drumond, Mariana Martins. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 575



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

#### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO / TESE

<b>ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO</b>	<b>306/2021</b>
	<b>Entrada 1º/2019</b>
<b>VIVIANE LIMA BATISTA</b>	<b>CPF: 126.113.866-09</b>

Às nove horas do dia **31 de março de 2021**, reuniu-se remotamente, devido à pandemia de COVID-19, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Efeito de *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 e seus produtos secretados na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Vasco Ariston de Carvalho Azevedo	UFMG	28317122549	Aprovada
Pamela Del Carmen Mancha Agresti	UFMG	01668886642	Aprovada
Mariana Martins Drumond	CEFET-MG	05143203627	Aprovada
Flaviano dos Santos Martins	UFMG	04368402600	Aprovada
Angelica Thomaz Vieira	UFMG	05733835613	Aprovada
Ana Paula Trovatti Uetanabaro	UESC	84786787604	Aprovada

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

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

**Belo Horizonte, 31 de março de 2021.**

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo – Orientador (UFMG)

Pamela Del Carmen Mancha Agresti (UFMG)

Mariana Martins Drumond (CEFET-MG)

Flaviano dos Santos Martins (UFMG)

Angelica Thomaz Vieira (UFMG)

Ana Paula Trovatti Uetanabaro (UESC)

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Trovatti Uetanabaro, Usuário Externo**, em 31/03/2021, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flaviano dos Santos Martins, Professor do Magistério Superior**, em 31/03/2021, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARIANA MARTINS DRUMOND, Usuário Externo**, em 31/03/2021, às 11:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelica Thomaz Vieira, Professora do Magistério Superior**, em 31/03/2021, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pamela Del Carmen Mancha Agresti, Usuário Externo**, em 31/03/2021, às 13:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 31/03/2021, às 16:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0647341** e o código CRC **4975B7B5**.



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

### FOLHA DE APROVAÇÃO

"Efeito de *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 e seus produtos secretados na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil"

VIVIANE LIMA BATISTA

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador  
UFMG

Pamela Mancha Agresti  
UFMG

Mariana Martins Drumond  
CEFET-MG

Flaviano dos Santos Martins  
UFMG

Angelica Thomaz Vieira  
UFMG

Ana Paula Trovatti Uetanabaro  
UESC

Belo Horizonte, 31 de março de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Trovatti Uetanabaro, Usuário Externo**, em 31/03/2021, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flaviano dos Santos Martins, Professor do Magistério Superior**, em 31/03/2021, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARIANA MARTINS DRUMOND, Usuário Externo**, em 31/03/2021, às 11:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelica Thomaz Vieira, Professora do Magistério Superior**, em 31/03/2021, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pamela Del Carmen Mancha Agresti, Usuário Externo**, em 31/03/2021, às 13:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 31/03/2021, às 16:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0647388** e o código CRC **D86BB529**.

## DEDICATÓRIA



**"Acreditar é a força que nos permite subir os maiores degraus na escada da vida" (autor desconhecido)**



## AGRADECIMENTO

Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém, sou muito grata às adversidades que apareceram na minha vida, pois elas me ensinaram a tolerância, a simpatia, o autocontrole, a perseverança, me ensinaram a identificar meus pontos fracos e como eu devo me comportar mediante a diversas situações.

Agradeço primeiramente a **DEUS** pela fé que me permitiu chegar até aqui.

Agradeço ao Prof. **Dr. VASCO** por ter me aceitado no laboratório desde a iniciação científica e que até aqui foi um grande orientador na minha vida, obrigada por toda contribuição científica, incentivo e direcionamento nessa trajetória.

Agradeço as minhas Co-orientadoras **Dra. PAMELA** e **Dra. MARIANA**, por toda a orientação dada até aqui, os ensinamentos de bancada e por terem acreditado na minha capacidade de aprender, graças a vocês consegui explorar e vencer todos os obstáculos que apareceram nessa minha trajetória.

Agradeço aos membros do LGCM, em especial meus amigos **NINA, LUÍS, TALES, LAISA e FERNANDA**, obrigado pela amizade, pelos ensinamentos, por me acompanharem nos experimentos de final de semana, por ficarem até tarde no laboratório comigo, eu desejo a vocês tudo de maravilhoso que a vida possa oferecer, que vocês tenham uma carreira brilhante.

À Fernanda e Nathalia por todo o suporte quando precisei.

Ao prof. Ênio Ferreira pela colaboração nas análises histológicas.

À pós-graduação em genética.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

À minha FAMÍLIA por sempre ser meu alicerce, me incentivando a correr atrás dos meus sonhos, e ao André, por todo companheirismo, incentivo, amizade e amor. Amo vocês.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	iv
LISTA DE TABELAS E FÓRMULAS .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS .....	vi
RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	11
1. APRESENTAÇÃO .....	12
2. INTRODUÇÃO GERAL .....	13
CAPÍTULO I .....	15
1. Revisão: Probiotics, prebiotics, synbiotics, and paraprobiotics as a therapeutic alternative for intestinal mucositis .....	16
CAPÍTULO II .....	34
1. JUSTIFICATIVA .....	35
2. OBJETIVOS .....	36
3. METODOLOGIA .....	37
3.1 Linhagem bacteriana e padronização da curva de crescimento .....	37
3.2 Preparação de doses .....	38
3.3 Preparação do sobrenadante (SN) de CIDCA 133 .....	38
3.4 Animais e manejo .....	39
3.5 Delineamento experimental .....	39
3.6 Parâmetros analisados .....	40
3.6.1 Consumos hídrico, alimentar e perda de peso .....	40
3.6.2 Análises histopatológica e morfométrica .....	41
3.6.3 Atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) .....	42
3.6.4 Atividade da enzima Peroxidase Eosinofílica (EPO) .....	42
3.6.5 Análise da expressão gênica relativa .....	43
3.6.5.1 Extração do RNA e síntese do cDNA .....	43
3.6.5.2 PCR quantitativa (qPCR) .....	44
3.7 Análises estatísticas .....	45
4. RESULTADOS .....	46
4.1 Relação entre a curva de crescimento de CIDCA 133 e número de unidades formadoras de colônias (UFC) .....	46
4.2 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133, nas três variantes testadas não influenciam nos consumos hídrico e alimentar dos animais com mucosite intestinal .....	46
4.3 Administração oral de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133, nas três variantes testadas não foi capaz de reduzir a perda de peso dos animais com mucosite intestinal .....	48
4.4 Administração oral de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133, nas três variantes testadas não influencia no comprimento intestinal em animais com mucosite intestinal .....	49
4.5 Probiótico, paraprobiótico e posbiótico de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133, foram capazes de prevenir o aumento do infiltrado de neutrófilos em animais com mucosite intestinal .....	50
4.6 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133, probiótico, paraprobiótico e posbiótico foram capazes de prevenir o aumento da	

expressão gênica relativa das citocinas pro-inflamatórias (Tnf e Il12p40) e a diminuição de Il10 .....	51
4.7 Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis CIDCA 133, probiótico, paraprobiótico e posbiótico não foram capazes de prevenir a diminuição da expressão gênica dos genes codificadores das proteínas das junções firmes.....	52
4.8 Administração oral de Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis CIDCA 133, paraprobiótico e posbiótico foi capaz de melhorar os parâmetros morfométricos da mucosite intestinal .....	53
5. DISCUSSÃO .....	57
6. CONCLUSÃO .....	65
7. PERSPECTIVA .....	66
8. REFERÊNCIAS .....	67
9. ANEXOS .....	74
9.1 Protocolo CEUA.....	75
9.2 Créditos concluídos.....	77
9.3 Produção Científica .....	79
9.3.1 Capítulos de Livro .....	79
9.3.1.1 Publicado como primeira autora .....	79
9.3.1.2 Publicado como co-autora .....	80
9.3.1.3 Submetido como co-autora .....	81
9.3.2 Artigos científicos .....	82
9.3.2.3 Publicado como primeira autora .....	82
9.3.2.2 Publicado como co-autora .....	83
9.3.3 .3 Participação e organização de eventos .....	86
9.4 Currículo LATTES.....	90
9.5 Identificação por MALDI-TOF e sequenciamento do genoma completo de CIDCA 133.....	99
9.6 Análise das proteínas do sobrenadante de CIDCA 133 .....	90

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> DESENHO EXPERIMENTAL DO MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDO POR 5-FU .....	41
<b>FIGURA 2:</b> CURVA DE CRESCIMENTO E NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC/ mL) DE CIDCA 133 .....	47
<b>FIGURA 3:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO POR GAVAGEM DE CIDCA 133, PROBIÓTICO, PARAPROBIÓTICO E POSBIÓTICO NA VARIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR ANTES E APÓS A INDUÇÃO DA MUCOSITE .....	48
<b>FIGURA 4:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO POR GAVAGEM DE CIDCA 133, PROBIÓTICO, PARAPROBIÓTICO E POSBIÓTICO NA VARIAÇÃO DO CONSUMO HÍDRICO ANTES E APÓS A INDUÇÃO DA MUCOSITE .....	49
<b>FIGURA 5:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO POR GAVAGEM DE CIDCA 133, PROBIÓTICO, PARAPROBIÓTICO E POSBIÓTICO NA VARIAÇÃO DE PERDA DE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS COM MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU .....	50
<b>FIGURA 6:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO POR GAVAGEM DE CIDCA 133, PROBIÓTICO, PARAPROBIÓTICO E POSBIÓTICO NO COMPRIMENTO INTESTINAL DOS ANIMAIS COM MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FU .....	50
<b>FIGURA 7:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO POR GAVAGEM DE CIDCA 133, PROBIÓTICO, PARAPROBIÓTICO E POSBIÓTICO NA VARIAÇÃO DE PERDA DE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS COM MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU .....	51
<b>FIGURA 8:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO POR GAVAGEM DE CIDCA 133, PROBIÓTICO, PARAPROBIÓTICO E POSBIÓTICO NAS EXPRESSÕES GÊNICAS RELATIVAS DOS GENES DAS CITOCINAS PRO E ANTI-INFLAMATÓRIA .....	52
<b>FIGURA 9:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO POR GAVAGEM DE CIDCA 133, PROBIÓTICO, PARAPROBIÓTICO E POSBIÓTICO NAS EXPRESSÕES GÊNICAS RELATIVAS DOS GENES CODIFICADORES DAS PROTEÍNAS DAS JUNÇÕES FIRMES .....	53
<b>FIGURA 10:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO POR GAVAGEM DE CIDCA 133, PROBIÓTICO, PARAPROBIÓTICO E POSBIÓTICO NO ESCORE HISTOLÓGICO DE ANIMAIS COM MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU .....	54
<b>FIGURA 11:</b> ANÁLISES HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO ÍLEO DOS ANIMAIS COM MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU E TRATADOS PROBIÓTICO, PARAPROBIÓTICO E POSBIÓTICO .....	55
<b>FIGURA 12:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO POR GAVAGEM DE CIDCA 133, PROBIÓTICO, PARAPROBIÓTICO E POSBIÓTICO NA EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DE MUC2 .....	56

## LISTA DE TABELAS E FÓRMULAS

<b>FÓRMULA 1:</b> FÓRMULA PARA CÁLCULO DA DENSIDADE ÓPTICA INICIAL DE CIDCA 133 PARA CONFECCÇÃO DAS DOSES ( $DO_{600nm}$ ) .....	38
<b>FÓRMULA 2:</b> FÓMULA PARA O CÁLCULO DO NÚMERO DE UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS (UFC/mL) DE CIDCA 133 .....	39
<b>TABELA 1:</b> GRUPOS EXPERIMENTAIS, TRATAMENTOS REALIZADOS E CONCENTRAÇÃO DO FÁRMACO 5-FU ADMINISTRADA NOS ANIMAIS DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS. ....	41
<b>TABELA 2:</b> PARÂMETROS SEMIQUANTITATIVOS PARA DETERMINAÇÃO DOS ESCORES HISTOPATOLÓGICOS DO ÍLEO RELACIONADOS À PROGRESSÃO DOS DANOS OCASIONADOS PELA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU .....	42
<b>TABELA 3:</b> SEQUÊNCIA DE PRIMERS UTILIZADOS PARA O ENSAIO DA RT- QPCR .	45
<b>TABELA 4:</b> LISTA DE CRÉDITOS REALIZADOS NA PÓS-GRADUAÇÃO DE GENÉTICA, PUBLICAÇÕES, PARTICIPAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS .....	72



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANOVA:</b>	Análise de Variância
<b>CAPES:</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CEBIO:</b>	Centro de Bioterismo
<b>CEUA:</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais
<b>CIDCA 133:</b>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133
<b>CIDCA:</b>	Centro de Investigação e Desenvolvimento em Criotecnologia de Alimentos
<b>Cldn:</b>	Claudina
<b>CNPq:</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>dATP:</b>	Trifosfato de desoxiadenosina
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DO:</b>	Densidade óptica
<b>dTTP:</b>	Trifosfato de timidina
<b>F11r:</b>	Molécula de adesão juncional
<b>FAPEMIG:</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais
<b>FdUMP:</b>	Fluorodeoxiuridina monofosfato
<b>FdUTP:</b>	Fluorodeoxiuridina trifosfato
<b>FU:</b>	Fluorouracil
<b>FUTP:</b>	5 fluorouridina trifosfato
<b>g:</b>	Grama
<b>GAPDH:</b>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
<b>HTAB:</b>	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
<b>i.p:</b>	Injeção intraperitoneal
<b>ICB:</b>	Instituto de Ciências Biológicas
<b>IL:</b>	Interleucina
<b>KCl:</b>	Cloreto de potássio
<b>kDa:</b>	Kilodalton
<b>Kg:</b>	Kilograma
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:</b>	Fosfato de potássio monobásico
<b>LGCM:</b>	Laboratório de Genética Celular e Molecular
<b>M:</b>	Molar
<b>mL:</b>	Mililitro
<b>mM:</b>	Milimolar

<b>MRS:</b>	Meio de cultura de Man, Rosoga e Sharpe.
<b>MUC:</b>	Mucosite
<b>MUC2:</b>	Mucina 2
<b>MWCO:</b>	<i>do português</i> , peso molecular de corte
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:</b>	Fosfato de sódio dibásico
<b>NaCl:</b>	Cloreto de sódio
<b>Nos 2:</b>	Atividade de óxido nítrico
<b>OMS:</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OPD:</b>	O-fenilendiamina
<b>PCR:</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>Ph:</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>RNA:</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS:</b>	Espécie reativa de oxigênio
<b>Rpm:</b>	Rotação por minuto
<b>SN:</b>	Sobrenadante
<b>TGI:</b>	Trato gastrointestinal
<b>TMB:</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TNF:</b>	Fator de necrose tumoral
<b>U:</b>	Unidade
<b>UV:</b>	Ultravioleta
<b>UFC:</b>	Unidade formadora de colônia
<b>UFMG:</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>µL:</b>	Microlitro



## RESUMO

O 5 fluourouracil (5FU) é um agente quimioterápico usado para o tratamento de diversos tipos de câncer, o mecanismo de ação inespecífico deste fármaco leva o desenvolvimento de efeitos colaterais, sendo a mucosite intestinal o mais prevalente. A modulação da microbiota pode contribuir com a proteção da barreira epitelial e homeostase intestinal, e o uso de probióticos tem sido estudado devido ao seu potencial terapêutico na mucosite. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 demonstrou potencial probiótico tanto *in vivo* como *in vitro*. O presente trabalho avaliou o potencial probiótico da linhagem *L. delbrueckii* CIDCA 133, na sua forma viável, inativada por calor (paraprobiótico) e de seus produtos secretados (posbióticos) em um modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-FU. Camundongos BALB/c foram divididos em 6 grupos (n=6), sendo eles: I-CLT (controle negativo), II- MUC (mucosite), III- MUC+MRS (mucosite tratado com caldo MRS), IV- MUC+CIDCA 133 VIÁVEL (mucosite+probiótico), V- MUC+CIDCA 133 INATIVADA POR CALOR (mucosite+paraprobiótico), VI- MUC+SOBRENADANTE (mucosite+posbiótico). Os animais receberam, intragastricamente, 300 µL de: solução salina (grupos I e II); meio MRS (grupo III); 10<sup>9</sup> UFC do probiótico (grupo IV); 10<sup>9</sup> UFC do paraprobiótico (grupo V) e; 300 µL do sobrenadante (posbiótico) (grupo VI), durante 13 dias. Os grupos II ao VI no 10º dia de experimentação receberam injeção intraperitoneal (ip) de 5-FU (300 mg/kg). Os animais foram eutanasiados, 72 horas após a indução da inflamação. Os resultados demonstram que o probiótico, paraprobiótico e posbiótico foram capazes de diminuir o infiltrado inflamatório de neutrófilos e expressão gênica da citocina pro-inflamatória IL12p40, além de, aumentar a expressão gênica relativa de Claudina (Cldn2). A suplementação com o probiótico e paraprobiótico também foram capazes de regular negativamente a expressão gênica relativa de Tnf e positivamente a de Il10. No entanto, apenas a administração do probiótico foi capaz de diminuir o recrutamento de eosinófilos. Bem como, o paraprobiótico foi capaz diminuir a expressão gênica de Il1b e prevenir o encurtamento das vilosidades. Com base nesses resultados, o presente trabalho demonstrou que CIDCA 133 probiótico, paraprobiótico e posbiótico foram capazes de atenuar parcialmente os parâmetros inflamatórios e histopatológicos da mucosite intestinal induzida pelo antineoplásico 5-FU, no entanto, novos estudos devem ser conduzidos, visando elucidar os mecanismos relacionados aos efeitos benéficos encontrados no presente trabalho.

**Palavras-chave:** Mucosite; 5-FU; probiótico; paraprobiótico; posbiótico; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133; imunomodulação; atividade anti-inflamatória.



## ABSTRACT

The 5-fluorouracil (5FU) is a chemotherapeutic agent used for the treatment of several types of cancer, the nonspecific mechanism of action of the drug leads to the development of side effects, with intestinal mucositis being the most prevalent. Modulation of the microbiota may contribute to the protection of the epithelial barrier and intestinal homeostasis, and the use of probiotics has been studied due to its therapeutic potential in mucositis. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 has demonstrated probiotic potential both in vivo and in vitro. The present study evaluated the probiotic potential of the *L. delbrueckii* CIDCA 133 strain, in its viable form, inactivated by heat (paraprobiotic) and its secreted products (postbiotics) in an experimental model of 5-FU-induced intestinal mucositis. For this, BALB/c mice (n=6/group) were divided, as follows: I-CTL (negative control), II-MUC (positive control), III-MUC+MRS (culture medium control), IV-MUC+CIDCA 133 viable (probiotics), V- MUC+CIDCA 133 heat-inactivated (paraprobiotics), and VI- MUC+ SN CIDCA 133 viable (postbiotics). The animals were treated by gavage with saline solution (group I and II), MRS (group III), CIDCA 133 viable  $10^9$  UFC/mL (group IV), CIDCA 133 heat-inactivated  $10^9$  CFU/mL (group V), and SN of CIDCA 133 viable (group VI) for 13 days. Intestinal mucositis was induced in groups II to VI with a single intraperitoneal injection of 5-FU (300 mg/kg) at 10<sup>o</sup> day of experimentation and was euthanized 72 hours later. The results demonstrate that probiotic, paraprobiotic and postbiotic were able to decrease the neutrophil inflammatory infiltrate and gene expression of the pro-inflammatory cytokine IL12p40, in addition to increasing the relative gene expression of Claudine (Cldn2). Supplementation with probiotics and paraprobiotics were also able to negatively regulate the relative gene expression of Tnf and positively that of IL10. However, only the administration of probiotics was able to decrease the recruitment of eosinophils. Similarly, only administration of probiotics was able to prevent increased inflammatory infiltrate of eosinophils, and only paraprobiotics prevents the increase of IL1b and the shortening of villus. Based on these results, the present study demonstrated that CIDCA 133 probiotic, paraprobiotic and postbiotic were able to partially attenuate the inflammatory and histopathological parameters of the intestinal mucositis induced by antineoplastic 5-FU, however, new studies should be conducted to elucidate the mechanisms related to the beneficial effects found in the present study.

**Key words:** Mucositis; 5-FU; probiotic; paraprobiotic; postbiotic; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133; immunomodulation; anti-inflammatory activity.

## 1. APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob orientação do Professor Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo (LGCM – UFMG) e coorientação das Profs. Dras. Pamela Del Carmem Mancha Agresti (FAMINAS-BH) e Mariana Martins Drumond (CEFET-MG). Contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Este manuscrito apresenta uma introdução geral, seguida do primeiro capítulo, que contém, um artigo de revisão, o qual, aborda a administração dos diferentes “bióticos” (probióticos, prebióticos, simbióticos, paraprobióticos e posbióticos) como alternativas terapêuticas para amenizar os danos à mucosa intestinal induzidos pelo quimioterápico 5-FU. Também discute os mecanismos de ação desses compostos no trato gastrointestinal (TGI), bem como sua relação com a microbiota. Essa revisão foi publicada em 17 de setembro de 2020, na revista *Frontiers in Microbiology* (doi.org/10.3389/fmicb.2020.544490), fator de Impacto 4,2.

O segundo capítulo apresenta a justificativa, motivada pelo impacto significativo da mucosite intestinal na clínica médica e a escassez de tratamentos eficazes contra este efeito colateral. Em seguida encontram-se os objetivos do trabalho, cujo principal foi avaliar o potencial terapêutico da linhagem *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133, probiótico, paraprobiótico e posbiótico na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Subsequente, encontra-se a metodologia detalhada, bem como os resultados obtidos, seguidos da discussão. Por fim, a conclusão e perspectiva do presente trabalho, seguindo-se as referências bibliográficas utilizadas no manuscrito e, por fim, os anexos, nos quais, encontram-se as produções científicas desenvolvidas e o currículo lattes construído durante o mestrado.

## 2. INTRODUÇÃO GERAL

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2018) atestam que o câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo ficando apenas atrás das doenças cardiovasculares (OMS, 2020). Apesar desta estatística preocupante, o câncer, quando diagnosticado precocemente, é passível de tratamento tendo grandes chances de evoluir para cura. O tratamento pode ser feito através do uso de quimioterápicos, radioterapia, cirurgia ou transplante de medula óssea e a escolha da melhor forma de tratamento depende do tipo de câncer e também do comprometimento físico e imunológico do paciente acometido pela patologia (IARC, 2020; OMS, 2020).

A quimioterapia antineoplásica consiste no uso de drogas que destroem as células inibindo seu crescimento, o que impede seu aumento em número e conseqüentemente sua disseminação (Guichard et al., 2017; Shields, 2017). O arsenal terapêutico mais utilizado inclui: oxaliplatina, irinotecano, capecitabina, cisplatina, metotrexato, 5 fluorouracil (5-FU), FOLFIRI (associação de 5-FU, irinotecano e leucovorina), entre outros (Nussbaumer et al., 2011; Cassidy and Syed, 2017; Guichard et al., 2017).

O 5-FU tem sido usado principalmente no tratamento de diversos tipos avançados de câncer colorretal, bem como câncer de cabeça e pescoço, mama, estômago e alguns tipos de câncer de pele (Longley et al., 2003; Martins and Wagner, 2013; Cassidy and Syed, 2017; Guichard et al., 2017). Sua ação antineoplásica se baseia principalmente em seus três metabólitos secundários que causam danos às células em nível genômico, culminando em morte celular. Dentre esses metabólitos destaca-se o Fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), que se liga à enzima timidilato sintase (TS), causando um desequilíbrio no pool de nucleotídeos, que por sua vez diminui a concentração de desoxinucleotídeos (dTTP e dATP), nucleotídeos estes essenciais para o reparo do DNA. O Fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP), por sua vez se liga ao DNA inibindo a sua replicação e transcrição, e, finalmente o 5 fluorouridina trifosfato (FUTP) que é capaz de se ligar ao RNA levando-o à perda de função (Longley et al., 2003; Sonis, 2004b; Miura et al., 2010).

No entanto, seu inespecífico mecanismo de ação ocasiona uma série de efeitos colaterais sendo a mucosite intestinal um dos efeitos mais prevalentes, acometendo entre 80-100% dos pacientes tratados com altas doses do referido fármaco (Kim et al., 2015). Sendo, portanto, um grave problema na clínica médica, uma vez que afeta a qualidade de vida dos pacientes, influenciando diretamente na continuidade do tratamento oncológico (Kim et al., 2015).

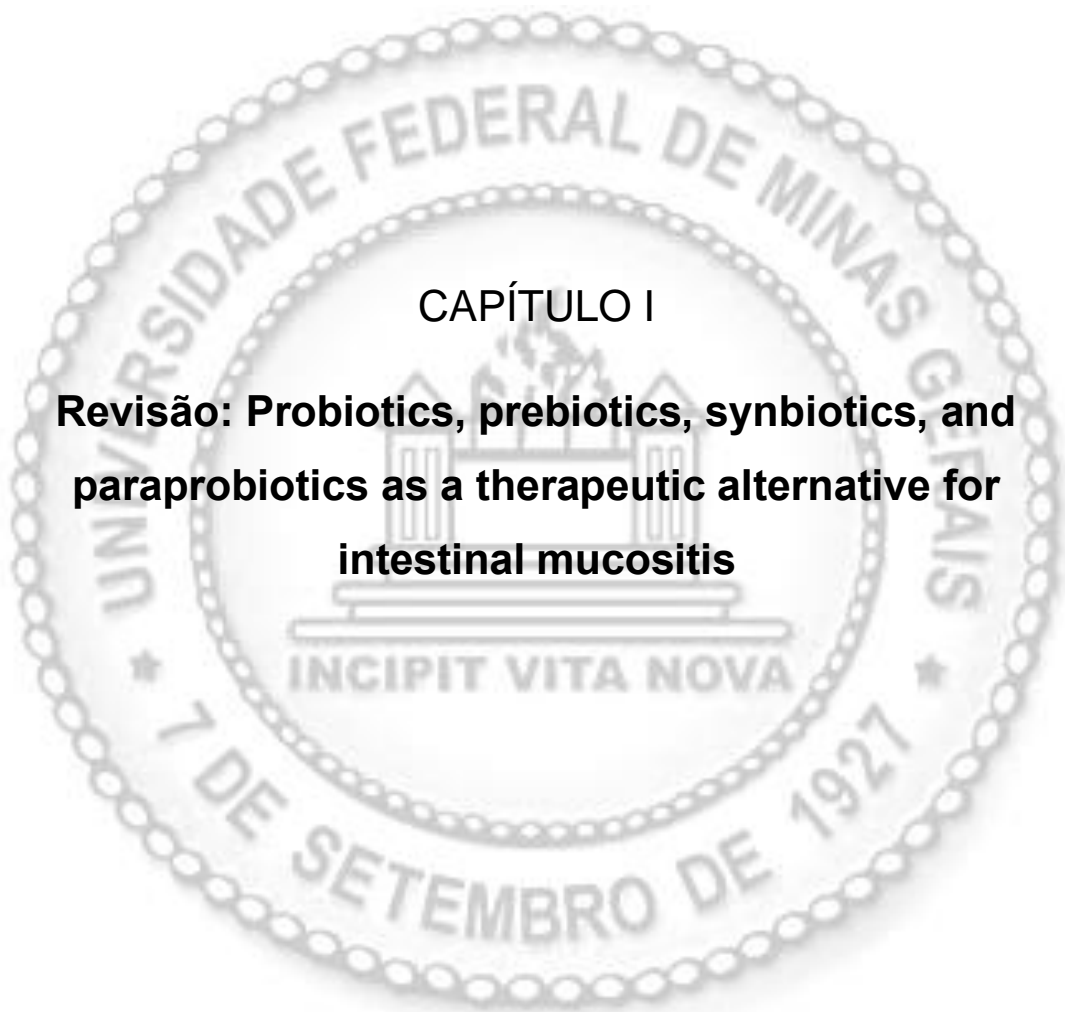
A mucosite intestinal é caracterizada por uma lesão inflamatória ulcerativa que acomete todo o TGI, sendo a boca e o intestino delgado, os órgãos mais acometidos e assim,

leva ao desenvolvimento de sintomas como diarreia, dor abdominal, sangramento, fadiga, entre outros (Sonis, 2004b; Touchefeu et al., 2014; Kim et al., 2018).

Dentro desse contexto, têm se buscado alternativas terapêuticas como forma de amenizar, prevenir ou até mesmo tratar a mucosite intestinal. Entre essas alternativas 5 destacam-se os “bióticos” como alternativa promissora para a atenuação dos sintomas da mucosite, para melhorar a qualidade de vida dos pacientes que sofrem desse processo inflamatório. Os probióticos, em geral, apresentam propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, e, quando consumidos, podem exercer seus efeitos benéficos no TGI (Hemarajata and Versalovic, 2013a; Justino et al., 2015; Oh et al., 2017). Pesquisas 10 demonstram que além dos organismos vivos, organismos inativados, e posbióticos têm se mostrado capazes de exercer ação probiótica, apresentando, também, efeitos imunomoduladores tanto no TGI, como em outros órgãos (Aguilar-Toalá et al., 2018; Cuevas-González et al., 2020).

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 é uma cepa com potencial probiótico 15 pertencentes a coleção de culturas do Centro de Investigação e Desenvolvimento em Criotecologia de Alimentos (CIDCA) da Universidade Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, Argentina. Foi isolada de lei cru de vaca, no qual, estudos *in vitro* mostram que, CIDCA 133 apresenta resistência a altas concentrações de ácido e sais biliares, critério importante para a seleção de microrganismos para formulação probiótica (KOCIUBINSKI et al., 1999), 20 apresentou antagonismo ao crescimento de diversos microrganismos patogênicos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, ambos envolvidos no processo de deterioração de alimentos (KOCIUBINSKI et al., 1996, 1999). Já a co-incubação de CIDCA 133 com células eucarióticas infectadas com *Bacillus cereus* e *Citrobacter rodentium*, reduziu os níveis da citocina IL8, com aumento dos níveis de TNF (Rolny et al., 2016a), bem como aumentaram a 25 fagocitose e a atividade antimicrobiana das células infectadas (Hugo et al., 2017). Os estudos *in vivo* mostram que o leite fermentado por CIDCA 133 é capaz de atenuar os sintomas da mucosite intestinal induzida pelo antineoplásico 5-FU, através da recuperação da arquitetura do epitélio, prevenção da degeneração das células caliciformes, redução do infiltrado de células polimorfonucleares, com redução da secreção de IgA e aumento da permeabilidade 30 intestinal (De Jesus et al., 2019).

Nesse contexto, com intuito de compreender melhor o mecanismo de ação de CIDCA 133 relatada em sua forma viável, como também, encontrar uma alternativa terapêutica que apresente vantagens em segurança ao administrado em indivíduos imunocomprometidos, como na mucosite intestinal, este trabalho se propôs a avaliar o efeito terapêutico de *L.* 35 *delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133, na sua forma viável, inativada por calor e de seus metabólitos secretados em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5 fluorouracil.



## CAPÍTULO I

**Revisão: Probiotics, prebiotics, synbiotics, and  
paraprobiotics as a therapeutic alternative for  
intestinal mucositis**

## **1. Revisão: Probiotics, prebiotics, synbiotics, and paraprobiotics as a therapeutic alternative for Intestinal Mucositis.**

Esse capítulo apresenta uma revisão sobre o uso de probióticos, prebióticos, simbióticos, paraprobióticos e posbióticos no tratamento da mucosite intestinal. Na revisão da literatura encontram-se tópicos descritivos sobre o mecanismo de ação do 5-FU no TGI e seus efeitos sobre a microbiota intestinal. Além disso, descrevem-se os conceitos de cada um dos bióticos citados, seguidos do mecanismo de ação e atuação na prevenção da mucosite intestinal. Por fim, apresenta um compilado de trabalhos envolvendo esses bióticos no tratamento da mucosite intestinal. O artigo foi publicado em 17 de setembro de 2020, na revista *Frontiers in Microbiology* (doi.org/10.3389/fmicb.2020.544490), fator de impacto 4.2.





# Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis

Viviane Lima Batista<sup>1</sup>, Tales Fernando da Silva<sup>1</sup>, Luis Cláudio Lima de Jesus<sup>1</sup>, Nina Dias Coelho-Rocha<sup>1</sup>, Fernanda Alvarenga Lima Barroso<sup>1</sup>, Laisa Macedo Tavares<sup>1</sup>, Vasco Azevedo<sup>1</sup>, Pamela Mancha-Agresti<sup>1,2\*</sup> and Mariana Martins Drumond<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, <sup>2</sup>Faculdade de Minas, FAMINAS-BH, Belo Horizonte, Brazil, <sup>3</sup>Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG), Departamento de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, Brazil

## OPEN ACCESS

**Edited by:**  
Konstantinos Papadimitriou,  
University of Peloponnese, Greece

**Reviewed by:**  
Netasa Goić,  
University of Belgrade, Serbia  
Eric Claessen,  
Vrije Universiteit Amsterdam,  
Netherlands  
Jia Yin,  
Hunan Normal University, China

**\*Correspondence:**  
Pamela Mancha-Agresti  
p.mancha.agresti@gmail.com  
Mariana Martins Drumond  
mmdrumond@gmail.com

**Specialty section:**  
This article was submitted to  
Food Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 21 March 2020  
**Accepted:** 24 August 2020  
**Published:** 17 September 2020

**Citation:**  
Batista VL, da Silva TF,  
de Jesus LCL, Coelho-Rocha ND,  
Barroso FAL, Tavares LM, Azevedo V,  
Mancha-Agresti P and Drumond MM  
(2020) Probiotics, Prebiotics,  
Synbiotics, and Paraprobiotics as  
a Therapeutic Alternative for Intestinal  
Mucositis.  
*Front. Microbiol.* 11:544490.  
doi: 10.3389/fmicb.2020.544490

Intestinal mucositis, a cytotoxic side effect of the antineoplastic drug 5-fluorouracil (5-FU), is characterized by ulceration, inflammation, diarrhea, and intense abdominal pain, making it an important issue for clinical medicine. Given the seriousness of the problem, therapeutic alternatives have been sought as a means to ameliorate, prevent, and treat this condition. Among the alternatives available to address this side effect of treatment with 5-FU, the most promising has been the use of probiotics, prebiotics, synbiotics, and paraprobiotics. This review addresses the administration of these "biotics" as a therapeutic alternative for intestinal mucositis caused by 5-FU. It describes the effects and benefits related to their use as well as their potential for patient care.

**Keywords:** lactic acid bacteria, chemotherapy, intestinal inflammation, treatment, mucositis

## INTRODUCTION

Cancer is a disease characterized by uncontrolled proliferation of cells with cellular differentiation properties, having the capacity to invade tissues and organs and spread to other regions of the body, causing metastases (World Health Organization [WHO], 2018). This disease is the second leading cause of death globally, according to the World Health Organization, accounting for an estimated 9.6 million deaths in 2018; lung (1.76 million deaths), colorectal (862,000 deaths), stomach (783,000 deaths), liver (782,000 deaths), and breast cancer (627,000 deaths) are the most common types and have the highest mortality rates (World Health Organization [WHO], 2018).

Despite the high incidence and mortality rates, when identified early, cancer is a potentially curable and treatable disease. Treatment may be done through surgery, chemotherapy, radiotherapy, or bone marrow transplantation, depending on the type of cancer, degree of tumor aggressiveness, as well as the patient's physical and immunological status. It is often necessary to combine more than one type of treatment to achieve satisfactory results (World Health Organization [WHO], 2018).

Antineoplastic chemotherapy consists of the use of drugs that destroy cancer cells, inhibit their growth, and prevent their spread by targeting DNA or critical processes involved in cell division (Guichard et al., 2017; Shields, 2017). The traditional chemotherapeutics are classified according to their mechanisms of action, including antimetabolites, microtubule-targeting agents, topoisomerases, and antibiotics (Shields, 2017). The therapeutic arsenal mostly used in the

treatment of neoplasms include oxaliplatin, irinotecan, capecitabine, cisplatin, methotrexate, 5-fluorouracil (5-FU), and FOLFIRI (an association of 5-fluorouracil, irinotecan, and leucovorin), among others (Nussbaumer et al., 2011; Cassidy and Syed, 2017; Guichard et al., 2017).

The medication 5-FU is highlighted among the chemotherapeutic alternatives and has been mainly used in the treatment of advanced types of cancer, such as colorectal cancer, as well as malignant head and neck cancer, breast, stomach, and some skin cancers (Longley et al., 2003; Martins and Wagner, 2013; Cassidy and Syed, 2017; Guichard et al., 2017). This drug is an analog of uracil and thymine (Figure 1), which is metabolized in the liver, producing many metabolites. One of them binds to and inhibits the enzyme thymidylate synthase and, consequently, ends up interfering with DNA synthesis and cell division (see the *Mechanism of Action of 5-FU* section). On the other hand, this drug can act by the incorporation of its metabolites into the DNA and/or RNA of these cells (Sonis, 2004), which impedes their normal functioning and induces apoptosis (Longley et al., 2003; Miura et al., 2010).

However, 5-FU's non-specific mechanism of action results in side effects such as nausea, cardiotoxicity, leukopenia, alopecia, myelosuppression, diarrhea, and oral and intestinal mucositis (Duncan and Grant, 2003; Soveri et al., 2014; Thomas et al., 2016; Cinausero et al., 2017). Intestinal mucositis is the most prevalent side effect of 5-FU therapy (50–80% of reported cases) and one of the main limiting factors for continuing treatment (Kim et al., 2015).

Mucositis is an inflammation of the gastrointestinal tract (GIT), with symptoms that include diarrhea, abdominal pain, bleeding, fatigue, malnutrition, electrolyte imbalance, and infections, causing complications that may be life threatening (Sonis, 2004; Toucheffeu et al., 2014; Kim S. et al., 2018). The cytotoxic effects of 5-FU in the GIT cells are a severe problem for oncological therapeutics, as they decrease the patient's ability to tolerate treatment, affecting the quality of life, directly influencing the success of therapy (Jamali et al., 2018).

Within this context, therapeutic alternatives have been sought as a means to prevent or ameliorate intestinal mucositis. Among these alternatives, the most promising are the use of probiotics [*live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host*] (FAO/WHO, 2001), prebiotics [*a substrate that is selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit*] (Gibson et al., 2017), synbiotics [*a mixture of probiotics and implantation of live microbial dietary supplements in the GIT, by selectively stimulating the growth and/or activating the metabolism of one or a limited number of health-promoting bacteria, and thus improving host welfare*] (Gibson and Roberfroid, 1995), paraprobiotics, and postbiotics, which can be defined as non-viable microorganisms, cell fractions or cell metabolites, bacteriocins, organic acids, and enzymes (Rad et al., 2020).

In this review, we address the evidence for the suitability of probiotics, prebiotics, synbiotics, and paraprobiotics as a therapeutic alternative for intestinal mucositis caused by the antineoplastic drug 5-FU.

## MECHANISM OF ACTION OF 5-FU

The drug 5-FU is an antimetabolite analogous to uracil, which differs by the substitution of a hydrogen atom with fluorine at the fifth position of the uracil molecule. Developed in the 1950s and introduced in cancer therapy to inhibit cell division and proliferation of cancer cells, this substance is among the class of antineoplastic drugs with a vast spectrum of action in oncological practice, being widely used for the treatment of a variety of tumors (Thomas et al., 2016; Kato et al., 2017).

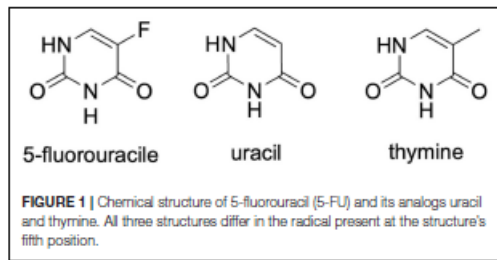
To control the abnormal proliferation of cancer cells, 5-FU enters into the cells through facilitated transport, which is the same mechanism involved in its intracellular conversion into active metabolites [fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP), fluorodeoxyuridine triphosphate (FdUTP), and 5-fluorouridine triphosphate (FUTP)]. These metabolites may exhibit three different mechanisms of action: (1) FdUMP inhibits the activity of the enzyme thymidylate synthase causing an imbalance in the pool of nucleotides, consequently decreasing the concentration of the deoxynucleotides dTTP and dATP, essential for DNA repair; (2) FdUTP binds to the DNA structure, inhibiting its synthesis, blocking cell division; and (3) FUTP can be incorporated into RNA, damaging it, leading to functional loss and cell death (Longley et al., 2003; Zhang et al., 2008; Miura et al., 2010; Figure 2).

Clinical evidence of patients undergoing oncologic therapy with 5-FU shows that the effects of this chemotherapy vary among users. From 20 to 40% of the patients treated with the standard dose of this drug (10–15 mg/kg body weight, for 3–4 days intravenously) develop some degree of mucositis, and about 80–100% of the patients treated with high doses (350–500 mg/kg body weight) develop GIT problems (Crombie and Longo, 2016; Cinausero et al., 2017).

## EFFECTS OF 5-FU ON THE GASTROINTESTINAL TRACT

In addition to having a digestive and nutrient absorption role, the GIT mucosa acts as a physical and immunological barrier, having the ability to defend the body against potentially harmful agents that can trigger inflammatory responses in the intestine (Salvo Romero et al., 2015; König et al., 2016). The intestinal barrier is categorized according to the various levels of protection, as well as the location and nature of its cellular and extracellular components (Vancamelbeke and Vermeire, 2017). These include mainly the mucus layer associated with the commensal microbiota of the gut, antimicrobial peptide and immunoglobulin A (IgA) secretion, the monolayer of specialized epithelial cells (enterocytes, Paneth cells, goblet cells, stem cells, and enteroendocrine cells), and the lamina propria, a specialized connective tissue in which innate and adaptive immune cells reside, such as T cells, B cells, dendritic cells (DCs), macrophages, neutrophils, eosinophils, and the newly discovered innate lymphoid cells (ILCs) (Vancamelbeke and Vermeire, 2017).



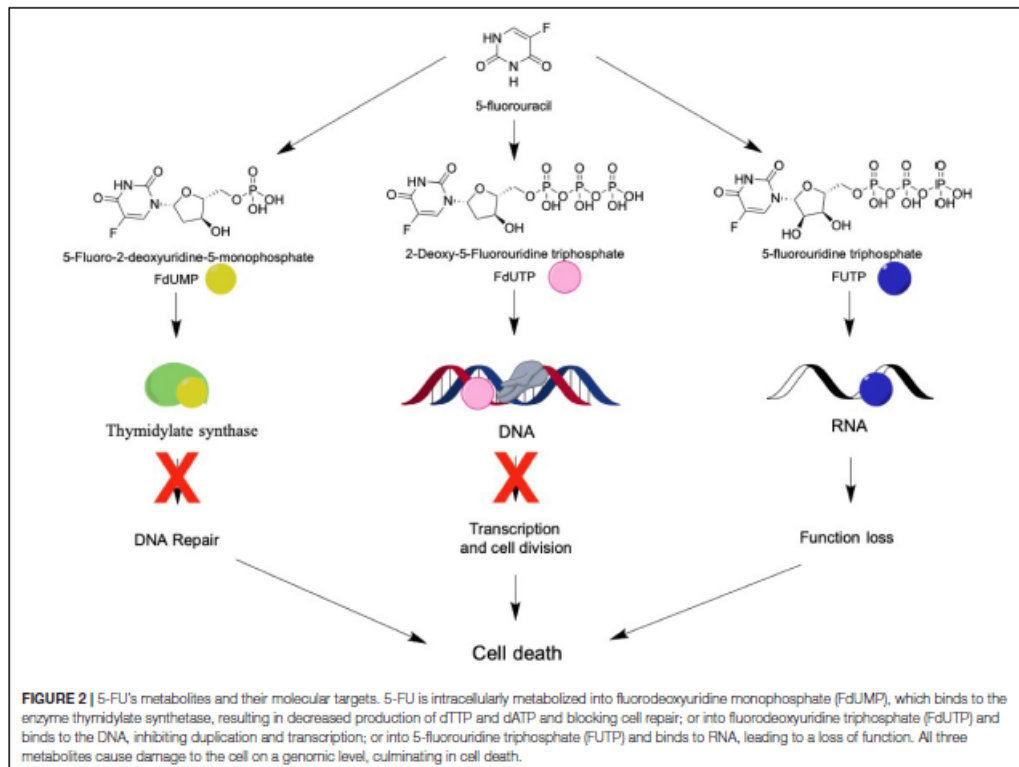


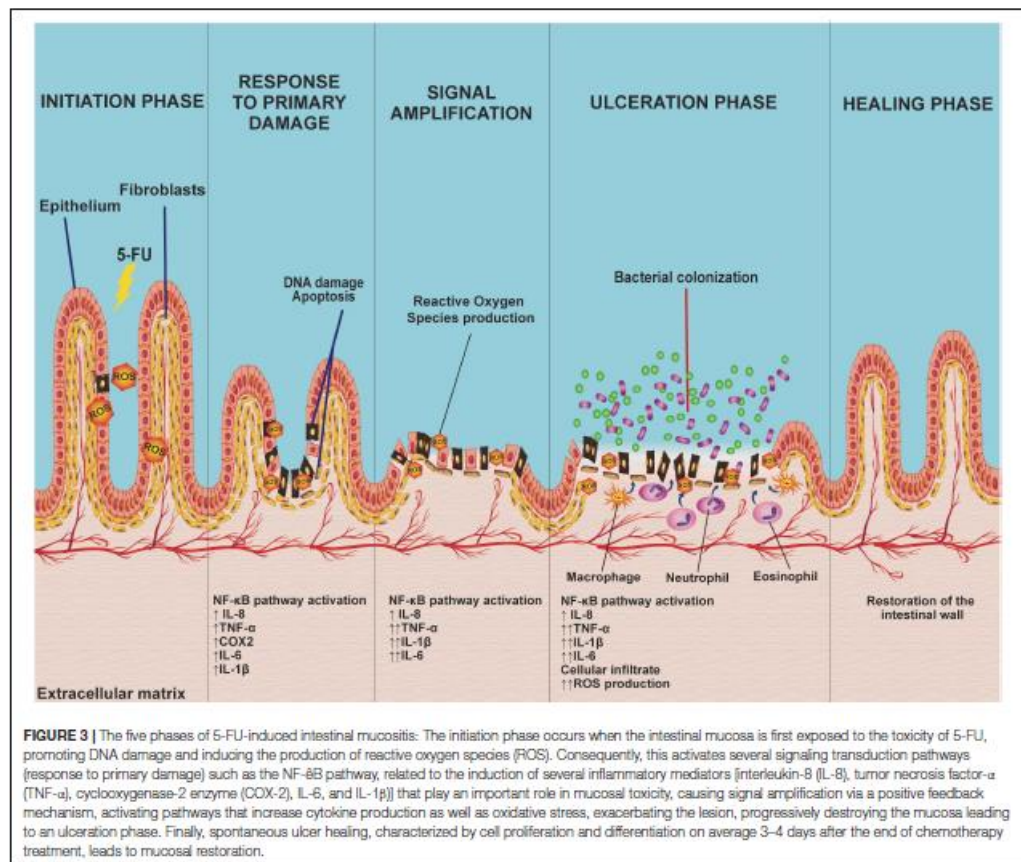
Although the intestinal barrier plays an essential role in the body's homeostasis, it is susceptible to 5-FU oncologic therapy (Yu, 2013). The intestinal mucositis caused by 5-FU mainly affects the small intestine (duodenum, jejunum, and ileum), characterized by inflammation, loss of intestinal structure and functionality, villous atrophy, goblet and Paneth cell degeneration, reduction in mucin secretion, increased intestinal permeability, cell death, polymorphonuclear cell infiltration, and increased production of proinflammatory cytokines, such

as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), mucosal tissue exposed to infection, and alteration of the intestinal microbiota composition (Chang et al., 2012; Lee, 2014).

The pathology of mucositis can be divided into five phases (initiation, response to primary damage, signal amplification, ulceration, and healing) (Sonis, 2004; Figure 3). The *initiation phase* occurs when the intestinal mucosa is exposed to 5-FU, which promotes DNA/RNA damage, either because it binds directly to these biomolecules or through the oxidative stress caused by reactive oxygen species (ROS) production. These factors induce tissue damage (Sonis, 2004; Villa and Sonis, 2015; Cereda et al., 2018), which activates several signal transduction pathways, such as nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway signaling. This situation leads to the induction of various inflammatory mediators, such as IL-8, TNF- $\alpha$ , cyclooxygenase-2 enzyme (COX-2), IL-6, and IL-1 $\beta$ , among others, that are responsible for mucosal toxicity (Sonis, 2004; Cinausero et al., 2017).

The recruitment of these proinflammatory cytokines acts indirectly on *signal amplification* (amplification phase) via a positive feedback mechanism, activating pathways that increase





proinflammatory cytokine production (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6), as well as oxidative stress. The increase in the production of these factors initiates a cascade of reactions that leads to the activation of matrix metalloproteinases, resulting in tissue damage or an increase in TNF- $\alpha$  production, exacerbating the initial lesion (Sonis, 2004).

The progressive destruction of the mucosa culminates in an *ulceration phase*, which occurs when loss of integrity and function of the epithelium occurs. At this stage, there are symptomatic lesions that, apart from being prone to pathogenic bacterial colonization, stimulate the activation and infiltration of defense cells, including macrophages, neutrophils, and eosinophils, in the intestinal mucosa. These cells increase the production of oxidant compounds, resulting in an increase in the depth of intestinal ulcers, consequently increasing bacterial translocation (Villa and Sonis, 2015; Cinausero et al., 2017; Cereda et al., 2018).

Finally, the *healing phase* is characterized by cell proliferation and differentiation. This phase occurs, on average, 3–4 days after

the last chemotherapy treatment, leading to restoration of the mucosa (Sonis, 2004; Villa and Sonis, 2015).

## EFFECTS OF 5-FU ON INTESTINAL MICROBIOTA

In addition to causing structural damage to the intestinal epithelium, the mucositis caused by chemotherapeutic agents has a crucial influence on the intestinal microbiota (van Vliet et al., 2010). The GIT has a complex ecological population, constituted by more than a thousand different species of microorganisms, though their distribution varies along the GIT (Mowat and Agace, 2014; Rajilić-Stojanović and de Vos, 2014); low concentrations and bacterial diversity (up to  $10^3$  CFU/ml) are found in the upper GIT (stomach, duodenum, jejunum, and proximal ileum) (Walter and Ley, 2011). A larger number of bacteria ( $10^9$ – $10^{12}$  CFU/ml) reside

in the lower compartments of the GIT (distal ileum and colon), which constitutes, to date, the habitat with the highest known microbial density (Mowat and Agace, 2014; Jandhyala et al., 2015; Thursby and Juge, 2017). Due to the low oxygen tension in the colon, the most prevalent bacterial groups consist of anaerobic species, such as *Clostridia*, *Enterobacteria*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, *Fusobacteria*, *Lactobacilli*, *Peptococci*, *Peptostreptococci*, *Prevotellaceae*, *Roseburia*, *Ruminococci*, and *Verrucomicrobia* (Simon and Gorbach, 1982; Bäckhed et al., 2005; Mowat and Agace, 2014).

The intestinal microbiota acts through several mechanisms to maintain the homeostasis of the organism, living in mutualism with the host, benefiting from the nutrient-rich environment offered by the organism and, in exchange, performing innumerable beneficial functions, including elimination of pathogens, production of vitamins and short-chain fatty acids (SCFA), as well as modulation of the enteric and systemic immune systems (Lane et al., 2017; Thursby and Juge, 2017). However, when this mutualism becomes unbalanced, the intestinal microbiota can contribute to the onset of infectious diseases, chronic inflammation, and autoimmune diseases (de Oliveira et al., 2017).

The commensal microbiota, such as *Bifidobacterium infantis* and *Bacteroides thetaiotaomicron*, have been shown to decrease NF- $\kappa$ B activation, decreasing levels of endotoxins and of plasma proinflammatory cytokines (Stringer et al., 2009). Studies have demonstrated that treatment with 5-FU alters the relative abundance of several genera of the intestinal microbiota, such as *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, and *Escherichia* (Stringer et al., 2009). Thus, disrupted homeostasis of the intestinal microbiota can affect the mucosal immune system due to an imbalance between the production of pro- and anti-inflammatory mediators, resulting in intestinal inflammation (Autenrieth and Baumgart, 2017; Holleran et al., 2017).

Given the possibility that intestinal mucositis is closely related to intestinal microbiota dysbiosis (von Bültzingslöwen et al., 2003; Yu, 2018), probiotic microorganisms have been presented as an alternative treatment due to their beneficial properties in the GIT. Given these characteristics, several studies have shown that probiotics can be an effective therapeutic alternative for the reduction of antineoplastic-induced intestinal mucositis.

## PROBIOTICS

In order, to be considered a probiotic and be able to exert health benefits for the host, microorganisms must have some specific attributes, such as being capable of remaining viable during transport and storage, and tolerating the low pH of the gastric lumen and the action of bile, and pancreatic and intestinal secretions. Many probiotics are able to colonize the GIT and stimulate the immune system (Wang M. et al., 2016; Mokoena, 2017). Furthermore, resistance to antibiotics in probiotic strains should be analyzed in order to assess their safety, as well as the level and the source of this resistance (Zhang et al., 2018). Intrinsic resistance is unlikely to spread horizontally between bacteria (Mathur and Singh, 2005), while acquired

resistance could be transferred to other organisms, including pathogens, representing a potential risk to the health of the host (van Reenen and Dicks, 2011). The most well-studied and characterized probiotics belong to the lactic acid bacteria (LAB) group. However, other microorganisms also present probiotic properties, such as some *Saccharomyces* spp., and bacteria of the genera *Bifidobacterium* and *Faecalibacterium* (Pot et al., 2013; Bastos et al., 2016; Chang et al., 2019).

LAB mainly include the genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, and *Streptococcus*, among others, and constitute a group of Gram-positive microorganisms, anaerobic or aerotolerant, non-spore forming, resistant to low pH, and able to produce lactic acid as the final product of the fermentation of carbohydrates (Wang Y. et al., 2016; Mokoena, 2017; Plavec and Berlec, 2019). Furthermore, these bacteria have been used for a long time in several industrial processes for the production of fermented foods, such as cheese, yogurts, etc. (Soccol et al., 2010), and they frequently present probiotic properties. Additionally, these organisms have been explored for protein heterology production and as live delivery systems for gene and biotherapeutic vaccines, with potential applications for the treatment and prevention of various pathological conditions, in both human and veterinary medicine (Carvalho et al., 2017; Gomes-Santos et al., 2017; LeCureux and Dean, 2018; Kuczkowska et al., 2019).

## MECHANISMS OF ACTION OF PROBIOTICS

Studies have shown that benefits for human health are attributed to consumption of probiotics, mainly for GIT diseases (Fedorak et al., 2015; Acucio et al., 2017), though also for other diseases, including osteoporosis (Collins et al., 2018), cancer (Zaharuddin et al., 2019), obesity and type 2 diabetes (Saez-Lara et al., 2015; Wang et al., 2017; Hsieh et al., 2018), depression (Wallace et al., 2020), and atopic dermatitis (Rather et al., 2016). In this context, the main mechanisms of action described for these microorganisms in the host include: (i) colonization and regulation of a dysbiotic intestinal microbiota (Shi et al., 2017); (ii) protection of the epithelial barrier by maintaining tight junction integrity (Blackwood et al., 2017); (iii) induction of mucin production (Aliakbarpour et al., 2012) and B-cell-secreting IgA, which are important defense mechanisms necessary to maintain epithelial integrity and to protect the intestine from the external environment; (iv) increasing adherence to the intestinal mucosa and inhibiting of concomitant pathogen adherence based on competition for available nutrients and sites of mucosal adhesion (Collado et al., 2010; Monteagudo-Mera et al., 2019); (v) competitive exclusion of pathogenic microorganisms, such as *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* (Halder et al., 2017; Plaza-Díaz et al., 2017); (vi) production of antimicrobial substances such as acetic and lactic acids, and bacteriocins, which have strong inhibitory effects against Gram-negative bacteria and have been considered as the main antimicrobial compounds produced by probiotics against pathogens (Alakomi et al., 2000; De Keersmaecker et al., 2006; Makras et al., 2006; Bermudez-Brito et al., 2012; Mokoena, 2017;

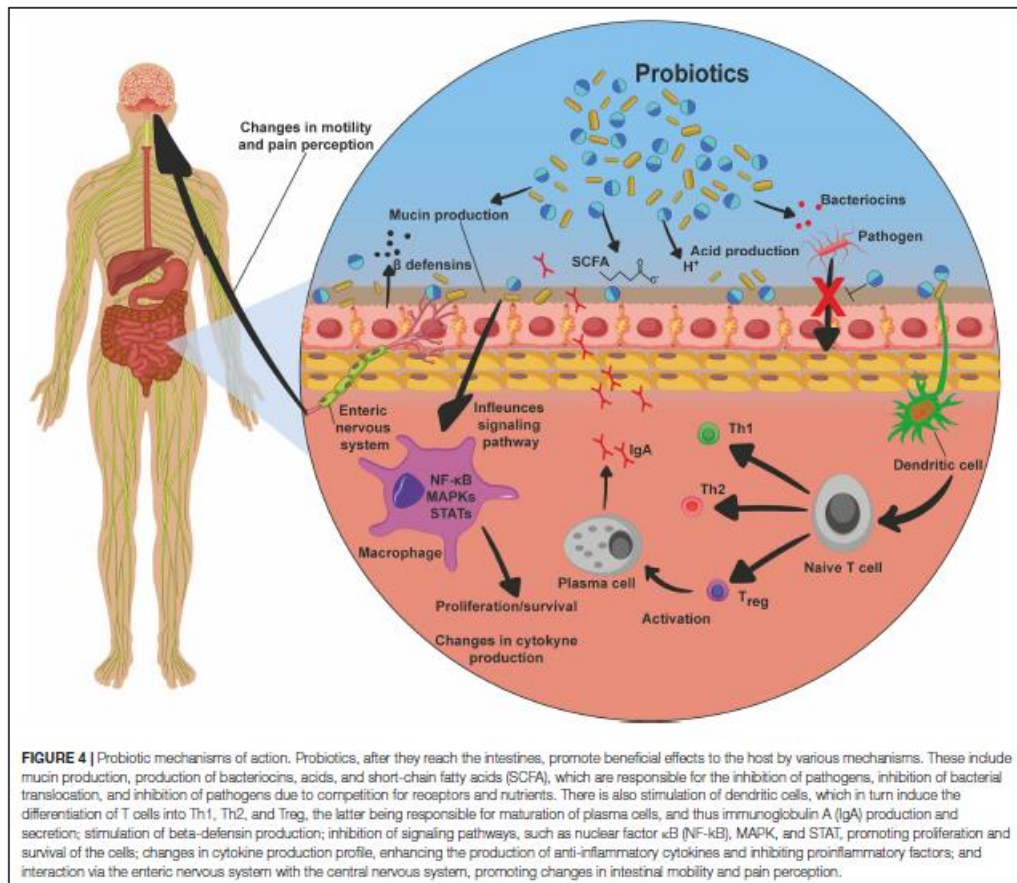
Gaspar et al., 2018; Castilho et al., 2019); (vii) production and secretion of metabolites of SCFAs with anti-inflammatory properties, such as acetate, propionate, and butyrate, which exert beneficial effects on intestinal and immune cells, being important compounds for cell proliferation, cell differentiation, and gene expression, and they are signaling molecules of immunological pathways; butyrate is the primary energy source of colonocytes, and it has an epithelial barrier function; SCFAs can also induce expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10, inhibiting inflammatory responses (Parada Venegas et al., 2019); (viii) inhibition of the activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway (Kaci et al., 2011; Gao et al., 2015); (ix) interaction with the gut-brain axis via the production of metabolites such as  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) (Kim N. et al., 2018); and (x) modulation of the host's innate and/or adaptive immune system responses through interaction with epithelial cells, dendritic cells, monocytes, macrophages, and lymphocytes (Azad et al., 2018).

In addition, probiotics can act by inducing host autophagy to attenuate oxidative stress-induced intestine injury (Wu et al., 2019; **Figure 4**).

Thus, due to the numerous possible pathways in which probiotics could be involved, their study as therapeutics of various diseases, especially those related to the GIT, is of particular importance.

## EFFECTS OF PROBIOTICS ON INTESTINAL MUCOSITIS

The proposed mechanisms of action for the beneficial effects of probiotic microorganisms in diseases affecting the GIT are diverse, heterogeneous, strain specific, and depend on the quantity of probiotics used (Plaza-Díaz et al., 2017). Since the immunomodulatory and anti-inflammatory effects



reported for LAB, as well as other probiotics, are strain dependent, it is necessary to identify and characterize species and strains with probiotic potential and investigate their effects on different targets or diseases (Plaza-Díaz et al., 2017). **Table 1**

presents the main findings for the effects of probiotics on intestinal mucositis.

In this context, studies conducted *in vitro* using Caco-2 cells (Fang et al., 2014) and *in vivo* with rats and mice

**TABLE 1** | Effects of probiotics, prebiotics, synbiotics, and paraprobiotics in intestinal mucositis.

	Effects of intestinal mucositis	References
<b>Probiotics strain</b>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Inhibited nuclear factor $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (NF- $\kappa$ B) pathway signaling Regulated levels of the proinflammatory cytokines [tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), and the C-X-C motif chemokine ligand (CXCL)]	Justino et al., 2015
<i>Lactobacillus acidophilus A4</i>	Reversed gastrointestinal dysmotility, increased gastric emptying and intestinal transit Stimulated the overexpression of mucin genes (MUC2 and MUC5AC) Reduced myeloperoxidase (MPO) activity Reduced expression of proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$	Oh et al., 2017
<i>Lactobacillus casei</i> variety <i>rhamnosus</i> (Lcr35)	Reduced production of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-6). Attenuated the loss of goblet cells, decreased Firmicutes and increased Bacteroidetes Reduced the frequency of diarrhea Restored villus/crypt ratio	Yeung et al., 2015; Chang et al., 2018
<i>Bifidobacterium bifidum</i> G9-1	Attenuated histopathological alteration, with decrease cell infiltrate in crypts Regulated intestinal microbiota (decrease Firmicutes and increase Bacteroidetes abundance) Reduced the concentrations of proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ and MPO activity Reduced diarrhea and interrupt weight loss	Kato et al., 2017
<i>Bifidobacterium infantis</i>	Improved the histologic parameters, ameliorating mucosal damage Reduced Th1 and Th17 cells, and increased CD4 + CD25 + Foxp3 + Tregs response	Mi et al., 2017
Association: ( <i>B. breve</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , and <i>Streptococcus thermophilus</i> )	Reduced neutrophil infiltration, proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-4, and IL-6), and intestinal permeability Restored of the intestinal epithelium architecture	Tiang et al., 2017
Association: ( <i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , and <i>B. lactis</i> )	Prevented epithelial injury in intestinal mucositis, with an increase in the villus/crypt ratio Reduced the malondialdehyde (MDA), MPO, TNF- $\alpha$ , and IL-6 levels Increased glutathione (GHS) levels in the duodenum and jejunum sections	Quaresma et al., 2019
Association: Whey protein isolate, to skim milk fermented by <i>L. casei</i> and <i>Propionibacterium freudentreichii</i>	Ameliorated histological scores and prevented villus shortening Reduced weight loss and degeneration of goblet cells	Cordeiro et al., 2018
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133	Prevented body mass loss Inhibited length reduction of the intestine caused by 5-fluorouracil (5-FU) Restored histopathological damage Reduced inflammatory parameters: neutrophil, eosinophil, leukocyte infiltrate reduction, and immunoglobulin A (IgA) secretion Reduced intestinal permeability	De Jesus et al., 2019
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Reduced cells apoptosis and inflammatory factors (nitrite concentration, neutrophil infiltrate TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ cytokines, and CXCL-1 chemokine) Improved the intestinal functions such as gastric emptying, gastrointestinal transit, absorption, and intestinal permeability Modulated the expression of TLR2, TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B extracellular signal, regulated kinase 1/2 (ERK1/2), phospho-p38 MAPK, phospho-c-Jun N-terminal kinase (phospho-JNK) in jejunum/ileum and in Caco2 cells	Justino et al., 2015, 2020
<b>Prebiotics</b>		
Fructooligosaccharide (FOS)	Reduced MPO activity in jejunum section Decreased inflammatory infiltrate and preserved intestinal epithelium Attenuated weight loss and increased catalase levels	Smith et al., 2008; Galdino et al., 2018
<b>Synbiotics</b>		
Simbioflora <sup>®</sup>	Attenuated weight loss Improved histology of the intestinal mucosa and preserved epithelial architecture Reduced eosinophil infiltrate Decreased intestinal permeability Increased the production of extracellular factors, such as SCFA (acetate and butyrate)	Trindade et al., 2018
<b>Paraprobiotics</b>		
<i>L. rhamnosus</i> inactivated by heat	Prevented the expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) Regulated the expression of TNF- $\alpha$ , IL-12	Fang et al., 2014

have demonstrated strain-dependent effects of probiotics for the prevention/treatment of experimental mucositis induced by 5-FU, proving to be an effective therapeutic alternative for the treatment of this disease. Thus, they could be used in parallel with chemotherapy to promote the attenuation of gastrointestinal toxicity caused by cancer drugs, which is promising for improving the quality of life of patients undergoing chemotherapy treatment (Mi et al., 2017; Chang et al., 2018).

*Lactobacillus acidophilus* can decrease intestinal damage caused by 5-FU (applied at a dose of 450 mg/kg) by inhibiting the signaling of the NF- $\kappa$ B pathway, reducing levels of proinflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and the C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL-1); reversion in gastrointestinal dysmotility and increased gastric emptying and intestinal transit were observed (Justino et al., 2015). This probiotic was able to reduce inflammation and normalize bowel function in mice (Justino et al., 2015). Additionally, Oh et al. (2017) demonstrated that *L. acidophilus* A4 decreased the severity of intestinal mucositis induced by 5-FU (150 mg/kg) by stimulating overexpression of mucin genes (MUC2 and MUC5AC), reducing myeloperoxidase (MPO) activity, and inhibiting expression of proinflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , in mice (Oh et al., 2017).

*Lactobacillus casei* variety *rhamnosus* (Lcr35, Antibiophilus<sup>®</sup>, France) reduced the production of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , and IL-6), attenuated the loss of goblet cells, reduced the frequency of diarrhea, and restored the villus/crypt ratio, demonstrating an anti-inflammatory effect on tissue damage caused in the intestinal mucosa by administering 5-FU (30 mg/kg) for 5 days (Yeung et al., 2015). The protective effect of Lcr35 ( $1 \times 10^7$  CFU) was also demonstrated in a colorectal cancer model; Balb/c mice were treated with a chemotherapeutic association called FOLFOX (30 mg/kg of 5-FU; 10 mg/kg of leucovorin, and 1 mg/kg of oxaliplatin) during 5 days (Chang et al., 2018). Lcr35 treatment was able to attenuate intestinal mucosa damage through regulation of the expression of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-10) induced by FOLFOX in the jejunum segment and also affected the gut microbiota composition, decreasing *Firmicutes* and increasing *Bacteroidetes* abundance (Chang et al., 2018). Thus, Lcr35 is a promising therapeutic strategy for the prevention or management of chemotherapy-induced intestinal mucositis (Chang et al., 2018).

A component in the intestinal microbiota, *Bifidobacterium bifidum* G9-1 (BBG9-1), has been widely used as a treatment for diarrhea and constipation, as well as for intestinal mucositis induced by 5-FU (50 mg/kg/6 days) (Kato et al., 2017). This probiotic can reduce diarrhea and interrupt weight loss, as well as being able to attenuate villus shortening and goblet cell degeneration. It can decrease inflammatory infiltrate in crypt cells, reduce MPO activity, reduce TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels, and also regulate the intestinal microbiota (decrease *Firmicutes* and increase *Bacteroidetes* abundance), demonstrating its ability to reduce the severity of 5-FU-induced intestinal mucositis (Kato et al., 2017).

Mi et al. (2017) demonstrated that *B. infantis* ( $1 \times 10^9$  CFU/11 days) administration, in a synergic colorectal

cancer treatment model with 5-FU (75 mg/kg/3 days) and oxaliplatin (8 mg/kg/3 days), was able to reduce the deleterious effects to the intestinal mucosa induced by chemotherapy. This probiotic improved the histology parameters, ameliorating the mucosal damage by decreasing Th1 and Th17 cells, and increasing the CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs response (Mi et al., 2017).

A combination of probiotic strains also demonstrated effectiveness in the reduction of intestinal damage induced by 5-FU chemotherapy. DM#1 mixture (*B. breve* DM8310, *L. acidophilus* DM8302, *L. casei* DM8121, and *Streptococcus thermophilus* DM8309) administration improved the restoration of the epithelial architecture, reduced neutrophil infiltration, reduced proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6), and decreased intestinal permeability in mice treated with 5-FU (30 mg/kg/5 days) (Tang et al., 2017). Another study using a probiotic mix (*L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, and *B. lactis*) showed that the mixture was able to prevent epithelial injury in intestinal mucositis induced by 5-FU (450 mg/kg), with an increase in the villus/crypt ratio and reduced malondialdehyde (MDA), MPO, TNF- $\alpha$ , and IL-6 levels in all small intestinal segments (duodenum, jejunum, and ileum) (Quaresma et al., 2019). In addition, administration of the probiotic mix resulted in an increase in glutathione (GSH) levels in the duodenum and jejunum sections and attenuated the delay in gastric emptying (Quaresma et al., 2019).

The therapeutic effects of probiotics also have been demonstrated for fermented products, which can be consumed by cancer patients. Milk fermented by *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 ( $7.5 \times 10^7$  CFU) attenuated the damage caused to the intestinal mucosa by 5-FU (300 mg/kg), both in the recovery of the architecture of the epithelium, including prevention of goblet cell degeneration, and reduction of the polymorphonuclear cell infiltrate, with reduced IgA secretion and intestinal permeability (De Jesus et al., 2019).

A mulberry leaf extract fermented by *L. acidophilus* A4 strain stimulated overexpression of mucin genes (MUC2 and MUC5AC), promoted reduction of MPO, inhibited expression of proinflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , and reduced the loss of intestinal barrier function generated by 5-FU (150 mg/kg) administration (Oh et al., 2017).

The role of whey protein isolate (WPI) added to skim milk fermented by *Lactobacillus casei* BL23 (*L. casei* BL23) or by *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA138 (*P. freudenreichii* 138) was studied in a 5-FU-induced mucositis mouse model (Cordeiro et al., 2018). Milk fermented by both bacteria was sufficient to reduce weight loss, reduce histological scores, and prevent villus shortening and degeneration of goblet cells. WPI addition to fermented milk improved the effects of these probiotics, compared to when they were administered alone (Cordeiro et al., 2018).

In addition to bacteria, yeasts can also have a beneficial effect on gastrointestinal mucositis. In this context, Porto et al. (2019) showed the effect of *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 alone or after enrichment with selenium, for intestinal mucositis treatment. This probiotic composition was able to preserve intestinal architecture and reduce nitrite concentration,

lipid peroxidation, intestinal permeability, and inflammatory parameters, protecting mice against pathological consequences caused by 5-FU administration (Porto et al., 2019).

The probiotic, thermophilic, non-pathogenic yeast, *Saccharomyces boulardii*, was also tested for intestinal mucositis treatment; the histopathological changes caused by 5-FU were significantly reduced, including cell apoptosis and inflammatory parameters (nitrite concentration, neutrophil infiltrate, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  cytokines, and CXCL-1 chemokine). This probiotic organism also improved the intestinal functions, such as gastric emptying, gastrointestinal transit, absorption, and intestinal permeability (Justino et al., 2015).

The effects of *S. boulardii* were evaluated by *in vitro* (Caco-2 cells treated with 1 mM 5-FU/24 h) and *in vivo* assays [Swiss mice treated with *S. boulardii* ( $1 \times 10^9$  CFU/kg/3 days), mucositis induction by 5-FU (450 mg/kg)] (Justino et al., 2020). *S. boulardii* was able to modulate TLR2, TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B, ERK1/2, phospho-p38, phospho-JNK, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and CXCL-1 expression, in these two different experimental models.

Based on the above studies, probiotics could be an effective therapeutic alternative for attenuating, preventing, and treating 5-FU-induced intestinal mucositis, although clinical studies will be required to test their safety and usefulness for treatment.

## PREBIOTICS, SYMBIOTICS, PARAPROBIOTICS, AND POSTBIOTICS

The use of probiotics to treat intestinal mucositis is widely reported; however, research has also demonstrated the importance of fiber consumption to improve their benefit for the intestinal microbiota. These fibers are used by the microbiota organisms during the fermentation process, resulting in the production of various compounds, such as SCFAs, which are able to modulate the function of immune cells in the intestine, showing mainly anti-inflammatory effects (Tan et al., 2014; Luu and Visekruna, 2019).

To classify dietary fibers as prebiotic, it is necessary to satisfy six basic criteria: (i) they must be resistant to gastric acidity, hydrolysis by mammalian enzymes, and gastrointestinal absorption, (ii) they should not be digested in the upper gastrointestinal tract, (iii) they should be fermented in the colon by beneficial bacteria, (iv) they should be beneficial to the host's health, (v) they should stimulate the growth of probiotics, and (vi) they should withstand food processing conditions while remaining unchanged (Wang, 2009; Markowiak and Ślizewska, 2017; Cerdó et al., 2019).

Prebiotics may be added to food or may be obtained through consumption of natural products, such as fruit, vegetables, cereals, and other edible plant products in which carbohydrate availability is high (Markowiak and Ślizewska, 2017). A wide variety of compounds have the potential to be classified as prebiotics. Most are non-digestible oligosaccharides extracted from plants, including fructooligosaccharide (FOS) (L'homme et al., 2003), galactooligosaccharide (GOS) (Ziegler et al., 2007), mannanoligosaccharide (MOS), and xylooligosaccharide

(XOS) (Playne and Crittenden, 2002), oligofructose, and inulin (Roberfroid, 2007).

Prebiotic compounds stimulate growth, activating metabolism and promoting protection of bacteria that are beneficial to the host organism (e.g., saccharolytic bacteria, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus*). Prebiotic fermentation by indigenous microbiota can modulate the composition and the function of these microorganisms (Gibson and Roberfroid, 1995; Slavin, 2013; Davani-Davari et al., 2019). Furthermore, prebiotic fermentation can benefit the host through production of some compounds, such as SCFAs and lactic acid, produced by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp., which cause a reduction in the intestinal pH, inhibiting the development of gastrointestinal pathogens (Gibson and Wang, 1994; Bovee-Oudenhoven et al., 2003; Amani Denj et al., 2015). Prebiotics are also able to exert beneficial effects via mucin production by providing fermentable compounds that contribute to a lower incidence of bacterial translocation (Satchithanandam et al., 1990; Schley and Field, 2002).

Another mechanism proposed for prebiotics is their interaction with carbohydrate receptors (mannose, fucose and C-type lectin receptors, and galectins) on immune cells [phagocytes, natural killer (NK) cells, DCs]. The production of metabolites (e.g., folate and riboflavin, vitamins, and SCFAs) during their fermentation by gut microbiota showcases antimicrobial activity and maintains a healthy gut barrier (Hosono et al., 2003; Roller et al., 2004; Furusawa et al., 2013; Comstock et al., 2014; Levit et al., 2018; Enam and Mansell, 2019).

As prebiotics stimulate probiotic action, the symbiotic concept was created to overcome difficulties faced by probiotics in the GIT, demonstrating that this association (prebiotics + probiotics) intensifies their individual beneficial effects (Markowiak and Ślizewska, 2017).

Information on prebiotic stimulation of known probiotic strains leads to the choice of the ideal microorganism-substrate symbiotic pairs; the consumption of appropriately selected probiotics and prebiotics can increase the beneficial effects of each. Symbiotics have beneficial synergistic effects, greater than those observed for individual administration of prebiotics and probiotics (Geier et al., 2006).

The main criteria for symbiotic formulation should be a selection of appropriate probiotic and prebiotic pairs; the prebiotic should selectively stimulate the growth of probiotic microorganisms, having a beneficial effect on health, with no or limited stimulation of other microorganisms. The main probiotic species and prebiotics used in symbiotic formulations include, respectively, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacteria* spp., *S. boulardii*, and *B. coagulans*, and FOS, GOS, and XOS. The health benefits from the administration of symbiotics to humans include: (i) increased levels of *lactobacilli* and *bifidobacteria* and balanced gut microbiota, (ii) improvement of immunomodulating ability, (iii) prevention of bacterial translocation; and (iv) improvement of liver function and reduction of incidence of nosocomial infections in surgical patients (Pandey et al., 2015; Markowiak and Ślizewska, 2017). Evidence shows that physical and chemical changes in the colon and intestinal microbiota caused by symbiotic

consumption, such as increased production of SCFAs and an increase in antitumor or antimutagenic compounds, can provide protection against rectal colon cancer, as they result in an improved immune response due to changes in the microbiota (Machado et al., 2014).

The studies listed above show the advantages of using live organisms; however, despite the fact that probiotics have proven benefits for the health of the host, current research emphasizes that the living organisms are not necessary for probiotic action; their different components, such as carbohydrates, proteins, lipids, vitamins, organic acids, cell wall components, and other complex molecules, generated after cell death, also have health benefits (Cuevas-González et al., 2020). The administration of non-viable organisms and their secreted products can present advantages in safety, reducing the possibility of infection and microbial translocation, which have been reported after the administration of probiotics to immunocompromised individuals (Aguilar-Toalá et al., 2018; Cuevas-González et al., 2020).

In this context, the terms “paraprobiotics” and “postbiotics” have been defined to refer to inactivated organisms and their metabolites. The difference between them is that paraprobiotics, also known as “non-viable probiotics” refer to inactivated cells, while postbiotics refer to soluble factors, which can be products (or metabolic byproducts) secreted by viable bacteria or released after their lysis (Cuevas-González et al., 2020). It is already possible to find products on the market that contain inactivated bacteria (e.g., Lactéol Fort® from PUMC Pharmaceutical Co., Ltd. and Fermenti Lattici Tindalizzati® from Frau, AF United Spa) (Taverniti and Guglielmetti, 2011).

Microorganisms can be inactivated through ultrasound (Ojha et al., 2016), high temperatures (Chuang et al., 2007), UV radiation (Lopez et al., 2008), and other options. However, it is necessary to evaluate some details to choose the best inactivation method, as well as to evaluate the effects on microbial structure and components (Ananta and Knorr, 2009; Taverniti and Guglielmetti, 2011).

The mechanism of action of paraprobiotics is not yet fully understood, but it is known that they are capable of acting in immunomodulation (Adams, 2010). *L. rhamnosus* GG (LGG), inactivated by UV radiation (Lopez et al., 2008) or heat killed (Li et al., 2009), has shown interesting results. UV-inactivated LGG is as effective as living LGG in downregulating the IL-8 response in Caco-2 cells; IL-8 is a proinflammatory chemokine released by intestinal cells (Lopez et al., 2008). Heat-killed LGG was tested in an infant rat model with LPS-induced inflammation and both live and inactivated strains administered enterally ( $10^8$  CFU/kg); both were able to decrease proinflammatory mediators induced by LPS and to positively regulate anti-inflammatory mediators in the liver, plasma, and lung (Li et al., 2009).

The strains *L. acidophilus* A2, *L. gasseri* A5, and *L. salivarius* A6 inactivated by heat, in an *in vitro* experiment, were both able (at  $10^5$  CFU/ml) to stimulate splenocyte and dendritic cell proliferation and production of IL-10, IL-12-p70, and IFN- $\gamma$ . Likewise, *L. salivarius* was able to activate splenocytes and dendritic cells in mice to induce T cells toward a Th1 immune response. It was concluded that heat-inactivated bacteria can

play an important role in modulating the immune response (Chuang et al., 2007).

A comparison was made of the *in vitro* potential of viable *L. rhamnosus*, the same bacteria inactivated by heat and the culture supernatant, for inducing the synthesis of cytokines by macrophages. Viable and heat-inactivated *L. rhamnosus* were able to induce the production of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-10, demonstrating a capability to exert an immunoregulatory effect on macrophages (Jorjão et al., 2015).

Postbiotics is another term that emerged after it was found that not only live probiotic bacteria are capable of promoting health benefits. Postbiotics comprise all products obtained from the metabolic processes of live bacteria or released after bacterial lysis, with biological benefits for the host (Tsilingiri and Rescigno, 2013). These products include cell surface proteins (surface-layer proteins), cell-free supernatants (CFS), cell lysates, bacteriocins, enzymes such as glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD), peptides, teichoic acids, exopolysaccharides, B-group vitamins, secreted polysaccharides, organic acids (lactate), and SCFAs (acetate, propionate, and butyrate) (Tsilingiri and Rescigno, 2013).

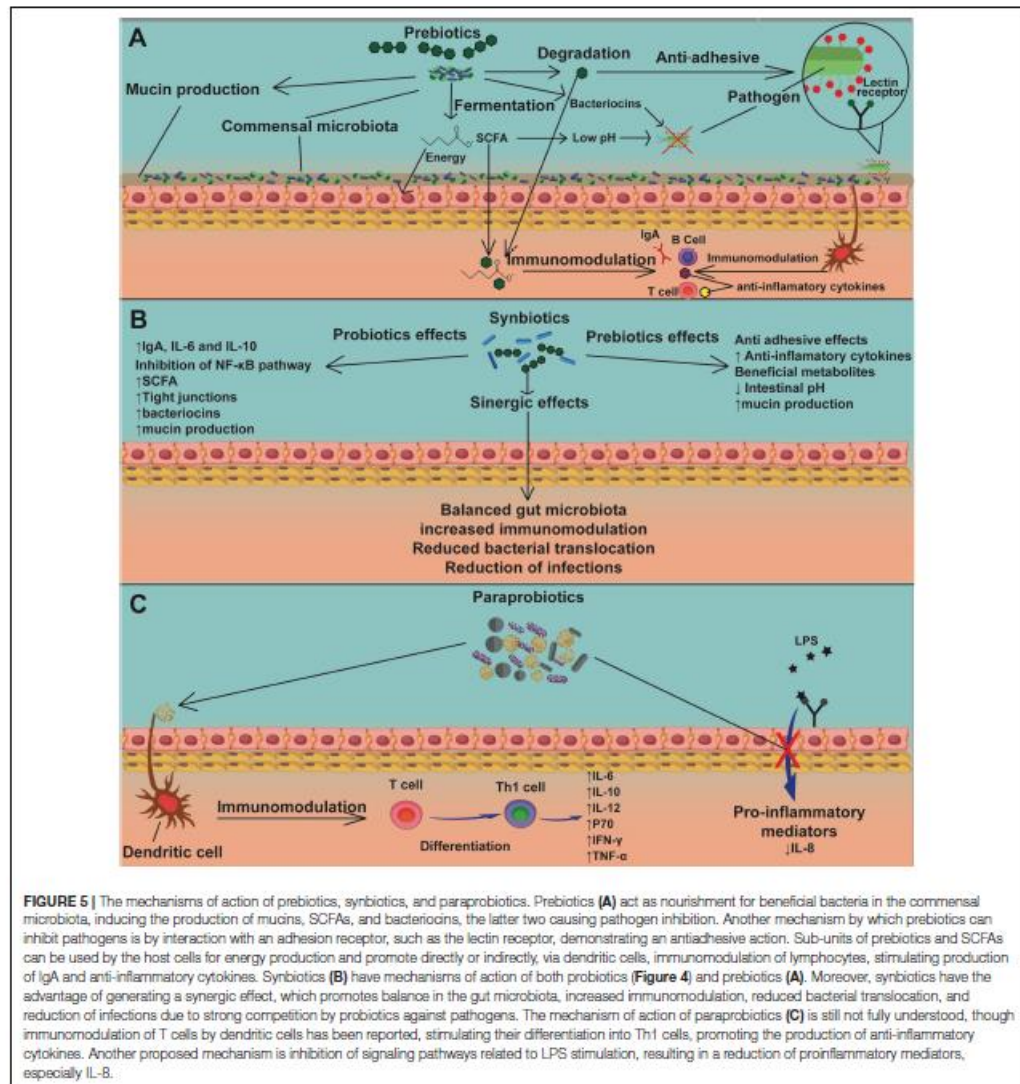
Postbiotic mechanisms of action have not been fully elucidated; nonetheless, there is evidence that they promote antioxidant (Xu et al., 2011; Xing et al., 2015) and antiproliferative effects (Escamilla et al., 2012; Chuah et al., 2019), stimulating antipathogenic, immunomodulatory, and anti-inflammatory properties (Wang et al., 2018; Gao et al., 2019).

## PREBIOTICS, SYNBIOTICS, AND PARAPROBIOTICS IN INTESTINAL MUCOSITIS

A few studies describe the action of prebiotics (Figure 5A), synbiotics (Figure 5B), and paraprobiotics (Figure 5C) on intestinal mucositis. Table 1 presents the main findings of their effects in intestinal mucositis. FOS supplement (3 and 6%) was administered to evaluate the effect on 5-FU (150 mg/kg)-induced intestinal mucositis in a murine model (Smith et al., 2008; Galdino et al., 2018). FOS was able to reduce MPO activity in a jejunum section. This was the only parameter that showed a significant reduction (Smith et al., 2008). In addition, beneficial effects of FOS (6%) administration in an experimental model of intestinal mucositis induced by 5-FU (300 mg/kg) were observed (Galdino et al., 2018). There was a decrease in inflammatory infiltrate, partial preservation of the intestinal epithelium, attenuation in body weight loss, and increased catalase levels, showing that supplementation with FOS could be an important adjuvant for the prevention and treatment of intestinal mucositis (Galdino et al., 2018).

Regarding the effects of synbiotics on intestinal mucositis, a commercial product called Simbioflora®, which is a synbiotic compound composed of 5.5 g of FOS plus four probiotic strains, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, and *B. lactis*, was evaluated (Trindade et al., 2018). This synbiotic was able to attenuate weight loss, decrease intestinal permeability,





reduce eosinophil infiltrate, and also improve the histology of the intestinal mucosa, with preservation of the epithelial architecture, when compared to the administration of the isolated prebiotics (Trindade et al., 2018). In addition, it was found that this synbiotic increases the production of extracellular factors, such as SCFAs (acetate and butyrate), which could contribute to the observed immunomodulating activity (Trindade et al., 2018).

The effects of paraprobiotics on mucositis were demonstrated by Fang et al. (2014). To examine the immunomodulatory properties of *L. rhamnosus*, the bacteria were inactivated by heat and evaluated in an *in vitro* model of intestinal mucositis using Caco-2 cells (Fang et al., 2014). This revealed that heat does not affect the cell integrity of this bacterial species, maintaining its rod-shaped structure intact, considerably reducing the expression of monocyte

chemoattractant protein 1 (MCP-1), and regulating the expression of TNF- $\alpha$  and IL-12. The same results were obtained with live bacteria, revealing that this bacterial species conserved intact probiotic properties after heat inactivation, making it a promising candidate for further studies (Fang et al., 2014).

In a study of the postbiotic effect on 5-FU-induced intestinal mucositis, Prisciandaro et al. (2011) found that *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) supernatant partially protected the mouse intestine from 5-FU damage (150 mg/kg) (Prisciandaro et al., 2011). It was observed that this postbiotic was able to help avoid histological damage (villus height and crypt depth) and prevented a decrease in acidic mucin-producing goblet cells. Another study showed that oral butyrate supplementation (9 mM) was able to reduce the damage to the intestinal mucosa caused by this antineoplastic agent (200 mg/kg). Reduction in histological damage, ulceration, and amelioration in intestinal permeability were observed. The gene expression of the tight junction protein ZO-1 (zonulin) was increased, and proinflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-6, were reduced (Ferreira et al., 2012).

The supernatant of mulberry leaf extract fermented by *L. acidophilus* A4 was able to reduce gene expression of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and myeloperoxidase (MPO), and stimulate overexpression of mucin genes (MUC2 and MUC5AC), thus reducing the severity of intestinal mucositis induced by 5-FU (150 mg/kg) (Oh et al., 2017). Additionally, *Lactobacillus plantarum* supernatant inhibited the expression of the specific markers CD44, CD133, CD166, and ALDH1 of 5-FU-resistant colorectal cancer cells (CRC) (HT-29 and HCT116) (An and Ha, 2016). The combination therapy of this postbiotic and 5-FU induced an anticancer mechanism by inactivating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling of chemoresistant CRC cells and led to cell death by inducing caspase-3 activity. These results suggest that probiotic secretory substances can regulate cell proliferation in colorectal cancer and may be a therapeutic alternative for treating chemoresistant colorectal cancer (An and Ha, 2016).

To date, there have been few rigorous investigations examining the effect of prebiotics on 5-FU-induced intestinal mucositis. Knowing its potential in the intestinal mucosa, their supplementation with probiotics may be an attractive therapeutic alternative to ameliorate symptoms caused by mucositis, as well as other diseases involving the GIT.

Despite the significant impact of mucositis and advances in research to understand this pathology, existing therapies are mainly limited to clinical management of symptoms, aiming at electrolyte replacement, oral rehydration, and the use of adjuvant agents, such as loperamide octreotide, sucralfate enemas, sulfasalazine, and hyperbaric oxygen, to reduce fluid loss and decrease intestinal motility and diarrhea associated with mucositis, which are important debilitating symptoms (Van Sebille et al., 2015; Ribeiro et al., 2016). Given that it is necessary to find more effective therapeutic alternatives to combat intestinal mucositis, the "biotics" are strong candidates.

## FINAL CONSIDERATIONS

The antineoplastic drug 5-FU is an essential and useful option for cancer treatment; however, its side effects, especially mucositis, can complicate treatment continuity and may lead to death. Effective measures to combat these symptoms, improving the quality of life of cancer patients, are crucially needed.

The probiotics have been investigated in various studies because of their beneficial properties for the GIT, including attenuation of dysbiosis. Several probiotic bacteria studied in intestinal mucositis murine models were able to attenuate and prevent intestinal histological damage, and also decrease weight loss and proinflammatory cytokine secretions, proving to be quite efficient in ameliorating the side effects to the intestine caused by 5-FU.

Though they can improve the health of the host, administration of viable microorganisms to immunosuppressed individuals still leads to controversial clinical findings. Paraprobiotics could be an effective alternative to address this concern, since microbial cells are dead or inactivated, thus avoiding risks associated with their administration to immunocompromised individuals.

Prebiotics are also described in the literature for their regulatory ability, acting to modify the commensal microbiota to a beneficial state. However, there are a few studies evaluating their potential for helping avoid intestinal mucositis. The existing studies demonstrate that prebiotics, when associated with a probiotic, are more efficient than when they are used separately, attenuating the symptoms of mucositis and improving to almost normal status the histology of the GIT.

Therefore, probiotics, prebiotics, synbiotics, paraprobiotics, and postbiotics may be useful alternatives for the treatment of intestinal mucositis induced by 5-FU. However, further studies are needed to elucidate all of the mechanisms of action of these bacteria and prebiotics to evolve into human clinical trials.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

VB, TS, LT, LJ, FB, and NC-R wrote the original draft of the manuscript. VA, MD, and PM-A reviewed and revised the manuscript, obtained funding, and supervised the project. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This work was financially supported by grants from the Brazilian funding agencies, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG) and Center of Microscopy at the Universidade Federal de Minas Gerais (<http://www.microscopia.ufmg.br>) for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy.

## REFERENCES

- Acurcio, L. B., Sandes, S. H. C., Bastos, R. W., Sant'anna, F. M., Pedroso, S. H. S. P., Reis, D. C., et al. (2017). Milk fermented by *Lactobacillus* species from Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Benef. Microbes* 8, 579–588. doi: 10.3920/BM2016.0163
- Adams, C. A. (2010). The probiotic paradox: Live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr. Res. Rev.* 23, 37–46. doi: 10.1017/S095442241000090
- Aguilar-Toalá, J. E., García-Varela, R., García, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Córdoba, B., et al. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends Food Sci. Technol.* 75, 105–114. doi: 10.1016/j.tifs.2018.03.009
- Alakomi, H.-L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., and Helander, I. M. (2000). Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2001–2005. doi: 10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000
- Aliakbarpour, H. R., Chamani, M., Rahimi, G., Sadeghi, A. A., and Quejue, D. (2012). The *Bacillus subtilis* and Lactic Acid Bacteria Probiotics Influences Intestinal Mucin Gene Expression, Histomorphology and Growth Performance in Broilers. *Asian Austr. J. Anim. Sci.* 25, 1285–1293. doi: 10.5713/ajas.2012.12110
- Amani Denj, K., Razeghi Ma, M., Akrami, R., Ghobadi, S., Jafarpour, S. A., and Mirbeygi, S. K. (2015). Effect of Dietary Probiotic Mannan Oligosaccharide (MOS) on Growth Performance, Intestinal Microflora, Body Composition, Haematological and Blood Serum Biochemical Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Juveniles. *J. Fish. Aquat. Sci.* 10, 255–265. doi: 10.3923/jfas.2015.255.265
- An, J., and Ha, E.-M. (2016). Combination Therapy of *Lactobacillus plantarum* Supernatant and 5-Fluorouracil Increases Chemosensitivity in Colorectal Cancer Cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1490–1503. doi: 10.4014/jmb.1605.05024
- Ananta, E., and Knorr, D. (2009). Comparison of inactivation pathways of thermal or high pressure inactivated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 by flow cytometry analysis. *Food Microbiol.* 26, 542–546. doi: 10.1016/j.fm.2009.01.008
- Autenrieth, D., and Baumgart, D. (2017). Mikrobiom und entzündliche Darmkrankungen. *DMW Dtsch. Medizinische Wochenschrift* 142, 261–266. doi: 10.1055/s-0042-111608
- Azad, M. A. K., Sarker, M., and Wan, D. (2018). Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles. *Biomed Res. Int.* 2018:8063647. doi: 10.1155/2018/8063647
- Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., and Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915–1920. doi: 10.1126/science.1104816
- Bastos, R. W., Pedroso, S. H. S. P., Vieira, A. T., Moreira, I. M. C., França, C. S., Cartelle, C. T., et al. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 treatment reduces intestinal damage in a murine model of irinotecan-induced mucositis. *Benef. Microbes* 7, 549–558. doi: 10.3920/BM2015.0190
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., and Gil, A. (2012). Probiotic Mechanisms of Action. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 160–174. doi: 10.1159/000342079
- Blackwood, B. P., Yuan, C. Y., Wood, D. R., Nicolas, J. D., Grothaus, J. S., and Hunter, C. J. (2017). Probiotic *Lactobacillus* Species Strengthen Intestinal Barrier Function and Tight Junction Integrity in Experimental Necrotizing Enterocolitis. *J. Probiotics Heal.* 5:159. doi: 10.4172/2329-8901.1000159
- Bovee-Oudenhoven, I. M. J., ten Bruggencate, S. J. M., Lettink-Wissink, M. I. G., and van der Meer, R. (2003). Dietary fructo-oligosaccharides and lactulose inhibit intestinal colonisation but stimulate translocation of *salmonella* in rats. *Gut* 52, 1572–1578. doi: 10.1136/gut.52.11.1572
- Carvalho, R. D. D. O., do Carmo, F. L. R., de Oliveira Junior, A., Langella, P., Chatel, J.-M., Bermúdez-Humarán, L. G., et al. (2017). Use of Wild Type or Recombinant Lactic Acid Bacteria as an Alternative Treatment for Gastrointestinal Inflammatory Diseases: A Focus on Inflammatory Bowel Diseases and Mucositis. *Front. Microbiol.* 8:800. doi: 10.3389/fmicb.2017.00800
- Cassidy, S., and Syed, B. A. (2017). Colorectal cancer drugs market. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 525–526. doi: 10.1038/nrd.2017.59
- Castilho, N. P. A., Colombo, M., Oliveira, L. L., de Todorov, S. D., and Nero, L. A. (2019). *Lactobacillus curvatus* UVF-NPAC1 and other lactic acid bacteria isolated from calabresa, a fermented meat product, present high bacteriocinogenic activity against *Listeria monocytogenes*. *BMC Microbiol.* 19:63. doi: 10.1186/s12866-019-1436-1434
- Cerdó, T., García-Santos, J. A., Bermúdez, M. G., and Campoy, C. (2019). The role of probiotics and prebiotics in the prevention and treatment of obesity. *Nutrients* 11:635. doi: 10.3390/nu11030635
- Cereida, E., Caraccia, M., and Caccialanza, R. (2018). Probiotics and mucositis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 21, 399–404. doi: 10.1097/MCO.0000000000000487
- Chang, C.-J., Lin, T.-L., Tsai, Y.-L., Wu, T.-R., Lai, W.-F., Lu, C.-C., et al. (2019). Next generation probiotics in disease amelioration. *J. Food Drug Anal.* 27, 615–622. doi: 10.1016/j.jfda.2018.12.011
- Chang, C. T., Ho, T. Y., Lin, H., Liang, J. A., Huang, H. C., Li, C. C., et al. (2012). 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- $\kappa$ B activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. *PLoS One* 7: e31808. doi: 10.1371/journal.pone.0031808
- Chang, C. W., Liu, C. Y., Lee, H. C., Huang, Y. H., Li, L. H., Chia, J. S. C., et al. (2018). *Lactobacillus casei* Variety *rhamnosus* Probiotic Preventively Attenuates 5-Fluorouracil/Oxaliplatin-Induced Intestinal Injury in a Syngeneic Colorectal Cancer Model. *Front. Microbiol.* 9:983. doi: 10.3389/fmicb.2018.00983
- Chuah, L.-O., Foo, H. L., Loh, T. C., Mohammed Alitheen, N. B., Yeap, S. K., Abdul Mutalib, N. E., et al. (2019). Postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* strains exert selective cytotoxicity effects on cancer cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 19:114. doi: 10.1186/s12906-019-2528-2
- Chuang, L., Wu, K. G., Pai, C., Hsieh, P. S., Tsai, J. J., Yen, J. H., et al. (2007). Heat-killed cells of *Lactobacilli* skew the immune response toward T helper 1 polarization in mouse splenocytes and dendritic cell-treated T cells. *J. Agric. Food Chem.* 55, 11080–11086. doi: 10.1021/jf071786o
- Cinausero, M., Aprile, G., Ermacora, P., Basile, D., Vitale, M. G., Fanotto, V., et al. (2017). New frontiers in the pathobiology and treatment of cancer regimen-related mucosal injury. *Front. Pharmacol.* 8:354. doi: 10.3389/fphar.2017.00354
- Collado, M. C., Guemonde, M., and Salminen, S. (2010). Probiotics in Adhesion of Pathogens. *Bioact. Food Prom. Health* 2010, 353–370. doi: 10.1016/B978-0-12-374938-3.0002322
- Collins, F., Rios-Arce, N. D., Schepper, J. D., Parameswaran, N., and McCabe, L. R. (2018). The Potential of Probiotics as a Therapy for Osteoporosis. *Bugs Drugs* 5, 213–233. doi: 10.1128/microbiolspec.BAD-0015-2016
- Comstock, S. S., Wang, M., Hester, S. N., Li, M., and Donovan, S. M. (2014). Select human milk oligosaccharides directly modulate peripheral blood mononuclear cells isolated from 10-d-old pigs. *Br. J. Nutr.* 111, 819–828. doi: 10.1017/S0007114513003267
- Cordeiro, B. F., Oliveira, E. R., Da Silva, S. H., Savassi, B. M., Acurcio, L. B., Lemos, L., et al. (2018). Whey Protein Isolate-Supplemented Beverage, Fermented by *Lactobacillus casei* BL23 and *Propionibacterium freudenreichii* 138, in the Prevention of Mucositis in Mice. *Front. Microbiol.* 9:2035. doi: 10.3389/fmicb.2018.02035
- Crombie, J., and Longo, D. L. (2016). *Principles of Cancer Treatment*. Netherland: Elsevier.
- Cuevas-González, P. F., Liceaga, A. M., and Aguilar-Toalá, J. E. (2020). Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Res. Int.* 136:109502. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109502
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S., et al. (2019). Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* 8:92. doi: 10.3390/foods8030092
- De Jesus, I. C. L., Drumond, M. M., de Carvalho, A., Santos, S. S., Martins, F. S., Ferreira, E., et al. (2019). Protective effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* CIDCA 133 in a model of 5-Fluorouracil-Induced intestinal mucositis. *J. Funct. Foods* 53, 197–207. doi: 10.1016/j.jff.2018.12.027
- De Keersmaecker, S. C. J., Verhoeven, T. L. A., Desair, J., Marchal, K., Vanderleyden, J., and Nagy, I. (2006). Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 259, 89–96. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00250.x

- de Oliveira, G. L. V., Leite, A. Z., Higuchi, B. S., Gonzaga, M. L., and Mariano, V. S. (2017). Intestinal dysbiosis and probiotic applications in autoimmune diseases. *Immunology* 152, 1–12. doi: 10.1111/imm.12765
- Duncan, M., and Grant, G. (2003). Mucositis-Causes and Possible Treatments. *Arim. Pharmacol. Ther.* 18, 853–874. doi: 10.1046/j.0269-2813.2003.01784.x
- Enam, F., and Mansell, T. J. (2019). Prebiotics: tools to manipulate the gut microbiome and metabolome. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 46, 1445–1459. doi: 10.1007/s10295-019-022032204
- Escamilla, J., Lane, M. A., and Maitin, V. (2012). Cell-Free Supernatants from Probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG Decrease Colon Cancer Cell Invasion In Vitro. *Nutr. Cancer* 64, 871–878. doi: 10.1080/01635581.2012.700758
- Fang, S., Bin Shih, H. Y., Huang, C. H., Li, L. T., Chen, C. C., and Fang, H. W. (2014). Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG upregulate gene expression of pro-inflammatory cytokines in 5-fluorouracil-pretreated Caco-2 cells. *Support. Care Cancer* 22, 1647–1654. doi: 10.1007/s00520-014-2137-z
- FAO/WHO (2001). *Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics*. Argentina: WHO.
- Fedorak, R. N., Feagan, B. G., Hotte, N., Leddin, D., Dieleman, L. A., Petrunia, D. M., et al. (2015). The probiotic VSL#3 has anti-inflammatory effects and could reduce endoscopic recurrence after surgery for Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 928–935.e2. doi: 10.1016/j.cgh.2014.10.031
- Ferreira, T. M., Leonel, A. J., Melo, M. A., Santos, R. R. G., Cara, D. C., Cardoso, V. N., et al. (2012). Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. *Lipids* 47, 669–678. doi: 10.1007/s11745-012-36803683
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., et al. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504, 446–450. doi: 10.1038/nature12721
- Galdino, F. M. P., Andrade, M. E. R., de Barros, P. A. V. S., V., Alvarez-Leite, J. I., Almeida-Leite, C. M., et al. (2018). Pretreatment and treatment with fructo-oligosaccharides attenuate intestinal mucositis induced by 5-FU in mice. *J. Funct. Foods* 49, 485–492. doi: 10.1016/j.jff.2018.09.012
- Gao, J., Li, Y., Wan, Y., Hu, T., Liu, L., Yang, S., et al. (2019). A Novel Postbiotic From *Lactobacillus rhamnosus* GG With a Beneficial Effect on Intestinal Barrier Function. *Front. Microbiol.* 10:477. doi: 10.3389/fmicb.2019.00477
- Gao, S., Li, D., Liu, Y., Zha, E., Zhou, T., and Yue, X. (2015). Oral immunization with recombinant hepatitis E virus antigen displayed on the *Lactococcus lactis* surface enhances ORF2-specific mucosal and systemic immune responses in mice. *Int. Immunopharmacol.* 24, 140–145. doi: 10.1016/j.intimp.2014.10.032
- Gaspar, C., Donders, G. G., Palmeira-de-Oliveira, R., Queiroz, J. A., Tomaz, C., Martínez-de-Oliveira, J., et al. (2018). Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. *AMB Express* 8:153. doi: 10.1186/s13568-018-0679-z
- Geier, M. S., Butler, R. N., and Howarth, G. S. (2006). Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer? *Cancer Biol. Ther.* 5, 1265–1269. doi: 10.4161/cbt.5.10.3296
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., et al. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 491–502. doi: 10.1038/nrgastro.2017.75
- Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401–1412. doi: 10.1093/jn/125.6.1401
- Gibson, G. R., and Wang, X. (1994). Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 412–420. doi: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb03443.x
- Gomes-Santos, A. C., Oliveira, R. P., de Moreira, T. G., Castro-Junior, A. B., Horta, B. C., Lemos, L., et al. (2017). Hsp65-Producing *Lactococcus lactis* Prevents Inflammatory Intestinal Disease in Mice by IL-10- and TLR2-Dependent Pathways. *Front. Immunol.* 8:30. doi: 10.3389/fimmu.2017.00030
- Guichard, N., Guillaume, D., Bonnabry, P., and Heury-Souverain, S. (2017). Antineoplastic drugs and their analysis: a state of the art review. *Analyst* 142, 2273–2321. doi: 10.1039/c7an00367f
- Halder, D., Mandal, M., Chatterjee, S., Pal, N., and Mandal, S. (2017). Indigenous Probiotic *Lactobacillus* Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria. *Biomedicines* 5:31. doi: 10.3390/biomedicines5020031
- Holleran, G., Lopetuso, L. R., Ianaro, G., Pecere, S., Pizzoferrato, M., Petito, V., et al. (2017). Gut microbiota and inflammatory bowel disease: so far so gut! *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 63, 373–384. doi: 10.23736/S1121-421X.17.0233862388
- Hosono, A., Ozawa, A., Kato, R., Ohnishi, Y., Nakashi, Y., Kimura, T., et al. (2003). Dietary Fructooligosaccharides Induce Immunoregulation of Intestinal IgA Secretion by Murine Peyer's Patch Cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 758–764. doi: 10.1271/bbb.67.758
- Hsieh, M.-C., Tsai, W.-H., Jheng, Y.-P., Su, S.-L., Wang, S.-Y., Lin, C.-C., et al. (2018). The beneficial effects of *Lactobacillus reuteri* ADR-1 or ADR-3 consumption on type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Sci. Rep.* 8:16791. doi: 10.1038/s41598-018-3501435011
- Jamali, J., Dayo, A., Adeel, A., Qureshi, Y., Khan, T., and Begum, S. (2018). A survey on gastrointestinal adverse drug reactions of Doxorubicin and Cyclophosphamide combination therapy. *J. Pak. Med. Assoc.* 68, 926–928.
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., and Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* 21, 8836–8847. doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8787
- Jorjão, A. L., De Oliveira, F. E., Vieira, M., Leão, P., Antonio, C., Carvalho, T., et al. (2015). ATCC 7469 May Induce Modulatory Cytokines Profiles on Macrophages RAW 264. *Scien. World J.* 2015:716749.
- Justino, P. F. C., Franco, A. X., Pontier-Bres, R., Monteiro, C. E. S., Barbosa, A. L. R., Souza, M. H. L. P., et al. (2020). Modulation of 5-fluorouracil activation of toll-like/MyD88/NF- $\kappa$ B/MAPK pathway by *Saccharomyces boulardii* CNCM 1-745 probiotic. *Cytokine* 125:154791. doi: 10.1016/j.cyt.2019.154791
- Justino, P. F. C., Melo, L. F. M., Nogueira, A. F., Moraes, C. M., Mendes, W. O., Franco, A. X., et al. (2015). Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 75, 559–567. doi: 10.1007/s00280-014-2663-x
- Kaci, G., Lakhdari, O., Doré, J., Ehrlich, S. D., Renault, P., Blottière, H. M., et al. (2011). Inhibition of the NF- $\kappa$ B Pathway in Human Intestinal Epithelial Cells by Commensal *Streptococcus salivarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4681–4684. doi: 10.1128/AEM.030213010
- Kato, S., Hamouda, N., Kano, Y., Oikawa, Y., Tanaka, Y., Matsumoto, K., et al. (2017). Probiotic *Bifidobacterium bifidum* G9-1 attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice via suppression of dysbiosis-related secondary inflammatory responses. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 44, 1017–1025. doi: 10.1111/1440-1681.12792
- Kim, H. J., Kim, J. H., Moon, W., Park, J., Park, S. J., Song, G. A., et al. (2015). Rebamipide Attenuates 5-Fluorouracil-Induced Small Intestinal Mucositis in a Mouse Model. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 179–183. doi: 10.1248/bpb.14-00400
- Kim, N., Yun, M., Oh, Y. J., and Choi, H.-J. (2018). Mind-altering with the gut: Modulation of the gut-brain axis with probiotics. *J. Microbiol.* 56, 172–182. doi: 10.1007/s12275-018-80328034
- Kim, S., Chun, H., Choi, H., Kim, E., Keum, B., Seo, Y., et al. (2018). Ursodeoxycholic acid attenuates 5-fluorouracil-induced mucositis in a rat model. *Oncol. Lett.* 16, 2585–2590. doi: 10.3892/ol.2018.8893
- König, J., Wells, J., Cani, P. D., García-Ródenas, C. L., MacDonald, T., Mercenier, A., et al. (2016). Human intestinal barrier function in health and disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 7:e196. doi: 10.1038/ctg.2016.54
- Kuczowska, K., Øverland, L., Rocha, S. D. C., Eijnsink, V. G. H., and Mathiesen, G. (2019). Comparison of eight *Lactobacillus* species for delivery of surface-displayed mycobacterial antigen. *Vaccine* 37, 6371–6379. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.09.012
- Lane, E. R., Zisman, T. L., and Suskind, D. L. (2017). The microbiota in inflammatory bowel disease: Current and therapeutic insights. *J. Inflamm. Res.* 10, 63–73. doi: 10.2147/JIR.S116088
- LeCureux, J. S., and Dean, G. A. (2018). *Lactobacillus* Mucosal Vaccine Vectors: Immune Responses against Bacterial and Viral Antigens. *mSphere* 3, e00061–18. doi: 10.1128/mSphere.00061-18

- Lee, C. S. (2014). Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: The role of inflammation. *World J. Gastroenterol.* 20:3751–3761. doi: 10.3748/wjg.v20.i14.3751
- Levit, R., Savoy de Giori, G., de Moreno, de LeBlanc, A., and LeBlanc, J. G. (2018). Protective effect of the riboflavin-overproducing strain *Lactobacillus plantarum* CRL2130 on intestinal mucositis in mice. *Nutrition* 54, 165–172. doi: 10.1016/j.nut.2018.03.056
- Lhomme, C., Arbelot, M., Puigserver, A., and Biagini, A. (2003). Kinetics of Hydrolysis of Fructooligosaccharides in Mineral-Buffered Aqueous Solutions: Influence of pH and Temperature. *J. Agric. Food Chem.* 51, 224–228. doi: 10.1021/jf0204699
- Lü, N., Russell, W. M., Douglas-Escobar, M., Hauser, N., Lopez, M., and Neu, J. (2009). Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG: Effects on proinflammatory and anti-inflammatory cytokines/chemokines in gastrostomy-fed infant rats. *Pediatr. Res.* 66, 203–207. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181aabd4f
- Longley, D. B., Harkin, D. P., and Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3, 330–338. doi: 10.1038/nrc1074
- Lopez, M., Li, N., Kataria, J., Russell, M., and Neu, J. (2008). Live and Ultraviolet-Inactivated *Lactobacillus Rhamnosus* GG Decrease Flagellin-Induced Interleukin-8 Production in Caco-2 Cells. *J. Nutr.* 138, 2264–2268. doi: 10.3945/jn.108.093658
- Luu, M., and Visekruna, A. (2019). Short-chain fatty acids: Bacterial messengers modulating the immunometabolism of T cells. *Eur. J. Immunol.* 49, 842–848. doi: 10.1002/eji.201848009
- Machado, F. F., Lazzaretti, R. K., and Poziomyck, A. K. (2014). Uso de Probióticos e Simbióticos nos Pré e Pós-Operatórios do Câncer Colorretal: uma Revisão. *Rev. Bras. Cancerol.* 60, 363–370.
- Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriani, T., Zoumpoulou, G., Tsakalidou, E., et al. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res. Microbiol.* 157, 241–247. doi: 10.1016/j.resmic.2005.09.002
- Markowiak, P., and Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients* 9:1021. doi: 10.3390/nu9091021
- Martins, C. C., and Wagner, S. C. (2013). Individualização Farmacocinética das Doses de 5-Fluorouracil no Câncer Colorretal. *Rev. Bras. Cancerol.* 59, 271–280.
- Mathur, S., and Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 281–295. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008
- Mi, H., Dong, Y., Zhang, B., Wang, H., Peter, C. C. K., Gao, P., et al. (2017). *Bifidobacterium infantis* Ameliorates Chemotherapy-Induced Intestinal Mucositis Via Regulating T Cell Immunity in Colorectal Cancer Rats. *Cell. Physiol. Biochem.* 42, 2330–2341. doi: 10.1159/000480005
- Miura, K., Kinouchi, M., Ishida, K., Fujibuchi, W., Naitoh, T., Ogawa, H., et al. (2010). 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administerable 5-FU Drugs. *Cancers* 2, 1717–1730. doi: 10.3390/cancers2031717
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules* 22:1255. doi: 10.3390/molecules22081255
- Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., and Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 6463–6472. doi: 10.1007/s00253-019-099789977
- Mowat, A. M., and Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 667–685. doi: 10.1038/nri3738
- Nussbaumer, S., Bonnabry, P., Veuthey, J.-L., and Fleury-Souverain, S. (2011). Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta* 85, 2265–2289. doi: 10.1016/j.talanta.2011.08.034
- Oh, N. S., Lee, J. Y., Lee, J. M., Lee, K. W., and Kim, Y. (2017). Mulberry leaf extract fermented with *Lactobacillus acidophilus* A4 ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Lett. Appl. Microbiol.* 64, 459–468. doi: 10.1111/lam.12741
- Ojha, K. S., Kerry, J. P., Alvarez, C., Walsh, D., and Tiwari, B. K. (2016). Effect of high intensity ultrasound on the fermentation profile of *Lactobacillus sakei* in a meat model system. *Ultrason. Sonochem.* 31, 539–545. doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.01.001
- Pandey, K. R., Naik, S. R., and Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics—a review. *J. Food Sci. Technol.* 52, 7577–7587. doi: 10.1007/s13197-015-19211921
- Parada Venegas, D., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., et al. (2019). Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front. Immunol.* 10:277. doi: 10.3389/fimmu.2019.00277
- Plavec, T. V., and Berlec, A. (2019). Engineering of lactic acid bacteria for delivery of therapeutic proteins and peptides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 2053–2066. doi: 10.1007/s00253-019-09628-y
- Playne, R., and Crittenden, M. (2002). Purification of food-grade oligosaccharides using immobilised cells of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 297–302. doi: 10.1007/s00253-001-0886883
- Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F., Vilchez-Padial, L., and Gil, A. (2017). Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Chronic Diseases. *Nutrients* 9:555. doi: 10.3390/nu9060555
- Porto, B. A. A., Monteiro, C. F., Souza, F. L. S., Leocádio, P. C. L., Alvarez-Leite, J. I., Generoso, S. V., et al. (2019). Treatment with selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 partially ameliorates mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 84, 117–126. doi: 10.1007/s00280-019-038653868
- Pot, B., Foligné, B., Daniel, C., and Granelle, C. (2013). Understanding immunomodulatory effects of probiotics. *Nestlé Nutr. Inst. Workshop Ser.* 77, 75–90. doi: 10.1159/000351388
- Prisciandaro, L. D., Geier, M. S., Butler, R. N., Cummins, A. G., and Howarth, G. S. (2011). Probiotic factors partially improve parameters of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Cancer Biol. Ther.* 11, 671–677. doi: 10.4161/cbt.11.7.14896
- Quaresma, M., Damasceno, S., Monteiro, C., Lima, F., Mendes, T., Lima, M., et al. (2019). Probiotic mixture containing *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Nutr. Cancer* 12, 1–11. doi: 10.1080/01635581.2019.1675719
- Rad, A. H., Aghebati-Maleki, L., Kafil, H. S., and Abbasi, A. (2020). Molecular mechanisms of postbiotics in colorectal cancer prevention and treatment. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15, 1–17. doi: 10.1080/10408398.2020.1765310
- Rajčić-Stojanović, M., and de Vos, W. M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 996–1047. doi: 10.1111/1574-6976.12075
- Rather, I. A., Bajpai, V. K., Kumar, S., Lim, J., Paek, W. K., and Park, Y.-H. (2016). Probiotics and Atopic Dermatitis: An Overview. *Front. Microbiol.* 7:507. doi: 10.3389/fmicb.2016.00507
- Ribeiro, R. A., Wanderley, C. W. S., Wong, D. V. T., Mota, J. M. S. C., Leite, C. A. V. G., Souza, M. H. L. P., et al. (2016). Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 78, 881–893. doi: 10.1007/s00280-016-3139-y
- Roberfroid, M. B. (2007). Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. *J. Nutr.* 137, 2493S–2502S. doi: 10.1093/jn/137.11.2493S
- Roller, M., Reckemmer, G., and Watzl, B. (2004). Prebiotic Inulin Enriched with Oligofructose in Combination with the Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* Modulates Intestinal Immune Functions in Rats. *J. Nutr.* 134, 153–156. doi: 10.1093/jn/134.1.153
- Saez-Lara, M. J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Díaz, J., and Gil, A. (2015). The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: A systematic review of randomized human clinical trials. *Biomed Res. Int.* 2015:505878. doi: 10.1155/2015/505878
- Salvo Romero, E., Alonso Cotoner, C., Pardo Camacho, C., Casado Bedmar, M., and Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev. Española Enfermedades Dig.* 108, 686–695. doi: 10.17235/reed.2015.3846/2015
- Satchithanandam, S., Vargofcak-Apker, M., Calvert, R. J., Leeds, A. R., and Cassidy, M. M. (1990). Alteration of Gastrointestinal Mucin by Fiber Feeding in Rats. *J. Nutr.* 120, 1179–1184. doi: 10.1093/jn/120.10.1179

- Schley, P. D., and Field, C. J. (2002). The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *Br. J. Nutr.* 87, S221–S230. doi: 10.1079/bjn/2002541
- Shi, Y., Zhai, Q., Li, D., Mao, B., Liu, X., Zhao, J., et al. (2017). Restoration of cefixime-induced gut microbiota changes by Lactobacillus cocktails and fructooligosaccharides in a mouse model. *Microbiol. Res.* 200, 14–24. doi: 10.1016/j.micres.2017.04.001
- Shields, M. (2017). *Chemotherapeutics. In Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*. Netherland: Elsevier Inc, 295–313.
- Simon, G. L., and Gorbach, S. L. (1982). Intestinal Microflora. *Med. Clin. North Am.* 66, 557–574. doi: 10.1016/S0025-7125(16)31407-9
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients* 5, 1417–1435. doi: 10.3390/nu5041417
- Smith, C. L., Geier, M. S., Yazbeck, R., Torres, D. M., Butler, R. N., and Howarth, G. S. (2008). Lactobacillus fermentum BR11 and fructooligosaccharide partially reduce jejunal inflammation in a model of intestinal mucositis in rats. *Nutr. Cancer* 60, 757–767. doi: 10.1080/01635580802192841
- Socol, C. R., Vandenberghe, L. P., de, S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguchi, C. T., et al. (2010). The potential of probiotics: A review. *Food Technol. Biotechnol.* 48, 413–434.
- Sonis, S. T. (2004). The pathobiology of mucositis. *Nat. Rev. Cancer* 4, 277–284. doi: 10.1038/nrc1318
- Soveri, L. M., Hermunen, K., De Gramont, A., Poussa, T., Quinaux, E., Bono, P., et al. (2009). Association of adverse events and survival in colorectal cancer patients treated with adjuvant 5-fluorouracil and leucovorin: Is efficacy an impact of toxicity? *Eur. J. Cancer* 50, 2966–2974. doi: 10.1016/j.ejca.2014.08.017
- Stringer, A. M., Gibson, R. J., Logan, R. M., Bowen, J. M., Yeoh, A. S. J., Hamilton, J., et al. (2014). Gastrointestinal Microflora and Mucins May Play a Critical Role in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Gastrointestinal Mucositis. *Exp. Biol. Med.* 234, 430–441. doi: 10.3181/0810-RM-301
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A. N., Mackay, C. R., and Macia, L. (2014). The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv. Immunol.* 121, 91–119. doi: 10.1016/B978-0-12-800100-4.000039
- Tang, Y., Wu, Y., Huang, Z., Dong, W., Deng, Y., Wang, F., et al. (2017). Administration of probiotic mixture DM#1 ameliorated 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis and dysbiosis in rats. *Nutrition* 33, 96–104. doi: 10.1016/j.nut.2016.05.003
- Taverniti, V., and Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr.* 6, 261–274. doi: 10.1007/s12263-011-0218-x
- Thomas, S. A., Grami, Z., Mehta, S., Patel, K., North, W., and Hospital, F. (2016). Adverse Effects of 5-fluorouracil: Focus on Rare Side Effects. *Cancer Cell Microenviron.* 3, 3–6. doi: 10.14800/ccm.1266
- Thursby, E., and Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* 474, 1823–1836. doi: 10.1042/BCJ20160510
- Toucheffeu, Y., Montassier, E., Nieman, K., Gastinne, T., Potel, G., Bruley Des, et al. (2014). Systematic review: The role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis - Current evidence and potential clinical applications. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 40, 409–421. doi: 10.1111/apt.12878
- Trindade, L. M., Martins, V. D., Rodrigues, N. M., Souza, E. L. S., Martins, F. S., Costa, G. M. F., et al. (2018). Oral administration of Simbioflora® (synbiotic) attenuates intestinal damage in a mouse model of 5-fluorouracil-induced mucositis. *Benef. Microbes* 9, 477–486. doi: 10.3920/BM2017.0082
- Tsiligiri, K., and Rescigno, M. (2013). Postbiotics: what else? *Benef. Microbes* 4, 101–107. doi: 10.3920/BM2012.0046
- van Reenen, C. A., and Dicks, L. M. T. (2011). Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Arch. Microbiol.* 193, 157–168. doi: 10.1007/s00203-010-0668663
- Van Sebille, Y. Z. A., Stansborough, R., Wardill, H. R., Bateman, E., Gibson, R. J., and Keefe, D. M. (2015). Management of Mucositis During Chemotherapy: From Pathophysiology to Pragmatic Therapeutics. *Curr. Oncol. Rep.* 17:50. doi: 10.1007/s11912-015-0474479
- van Vliet, M. J., Harmsen, H. J. M., de Bont, E. S. J. M., and Tissing, W. J. E. (2010). The Role of Intestinal Microbiota in the Development and Severity of Chemotherapy-Induced Mucositis. *PLoS Pathog.* 6:e1000879. doi: 10.1371/journal.ppat.1000879
- Vancamelbeke, M., and Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 821–834. doi: 10.1080/17474124.2017.1343143
- Villa, A., and Sonis, S. T. (2015). Mucositis: Pathobiology and management. *Curr. Opin. Oncol.* 27, 159–164. doi: 10.1097/CCO.0000000000000180
- von Bültzingslöwen, I., Adlerberth, I., Wold, A. E., Dahlén, G., and Jontell, M. (2003). Oral and intestinal microflora in 5-fluorouracil treated rats, translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotic bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.* 18, 278–284. doi: 10.1034/j.1399-302x.2003.00075.x
- Wallace, C. J. K., Foster, J. A., Soares, C. N., and Milev, R. V. (2020). The Effects of Probiotics on Symptoms of Depression: Protocol for a Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. *Neuropsychobiology* 79, 108–116. doi: 10.1159/000496406
- Walter, J., and Ley, R. (2011). The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 411–429. doi: 10.1146/annurev-micro-090110102830
- Wang, G., Li, X., Zhao, J., Zhang, H., and Chen, W. (2017). Lactobacillus casei CCFM419 attenuates type 2 diabetes via a gut microbiota dependent mechanism. *Food Funct.* 8, 3155–3164. doi: 10.1039/C7FO00593H
- Wang, H., Zhang, L., Xu, S., Pan, J., Zhang, Q., and Lu, R. (2018). Surface-Layer Protein from Lactobacillus acidophilus NCFM Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation through MAPK and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways in RAW264.7 Cells. *J. Agric. Food Chem.* 66, 7655–7662. doi: 10.1021/acs.jafc.8b02012
- Wang, M., Gao, Z., Zhang, Y., and Pan, L. (2016). Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: a realistic therapeutic option. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5691–5701. doi: 10.1007/s00253-016-7557-x
- Wang, Y., George, S. P., Roy, S., Pham, E., Esmailniakooshkghazi, A., and Khurana, S. (2016). Both the anti- and pro-apoptotic functions of villin regulate cell turnover and intestinal homeostasis. *Sci. Rep.* 6, 1–10. doi: 10.1038/srep35491
- Wang, Y. (2009). Probiotics: Present and future in food science and technology. *Food Res. Int.* 42, 8–12. doi: 10.1016/j.foodres.2008.09.001
- World Health Organization [WHO] (2018). *No Title. Fact sheets-Cancer*. Switzerland: WHO.
- Wu, Y., Wang, B., Xu, H., Tang, L., Li, Y., Gong, L., et al. (2019). Probiotic Bacillus Attenuates Oxidative Stress- Induced Intestinal Injury via p38-Mediated Autophagy. *Front. Microbiol.* 10:2185. doi: 10.3389/fmicb.2019.02185
- Xing, J., Wang, G., Zhang, Q., Liu, X., Gu, Z., Zhang, H., et al. (2015). Determining Antioxidant Activities of Lactobacilli Cell-Free Supernatants by Cellular Antioxidant Assay: A Comparison with Traditional Methods. *PLoS One* 10:e0119058. doi: 10.1371/journal.pone.0119058
- Xu, R., Shang, N., and Li, P. (2011). In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from Bifidobacterium animalis RH. *Anaerobe* 17, 226–231. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.07.010
- Yeung, C. Y., Chan, W. T., Jiang, C., Bin, Cheng, M. L., Liu, C. Y., et al. (2015). Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model. *PLoS One* 10:1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0138746
- Yu, J. (2013). Intestinal stem cell injury and protection during cancer therapy. *Transl. Cancer Res.* 2, 384–396. doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.07.03
- Yu, L. C. H. (2018). Microbiota dysbiosis and barrier dysfunction in inflammatory bowel disease and colorectal cancers: exploring a common ground hypothesis. *J. Biomed. Sci.* 25:79. doi: 10.1186/s12929-018-0483-8
- Zaharuddin, L., Mokhtar, N. M., Muhammad Nawawi, K. N., and Raja Ali, R. A. (2019). A randomized double-blind placebo-controlled trial of probiotics in post-surgical colorectal cancer. *BMC Gastroenterol.* 19:131. doi: 10.1186/s12876-019-10471044
- Zhang, F., Gao, J., Wang, B., Huo, D., Wang, Z., Zhang, J., et al. (2018). Whole-genome sequencing reveals the mechanisms for evolution of streptomycin

- resistance in *Lactobacillus plantarum*. *J. Dairy Sci.* 101, 2867–2874. doi: 10.3168/jds.201713323
- Zhang, N., Yin, Y., Xu, S. J., and Chen, W. S. (2008). 5-Fluorouracil: Mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules* 13, 1551–1569. doi: 10.3390/molecules13081551
- Ziegler, E., Vanderhoof, J. A., Petschow, B., Mitmesser, S. H., Stolz, S. I., Harris, C. L., et al. (2007). Term Infants Fed Formula Supplemented With Selected Blends of Prebiotics Grow Normally and Have Soft Stools Similar to Those Reported for Breast-fed Infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 44, 359–364. doi: 10.1097/MPG.0b013e31802fca8c
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2020 Batista, da Silva, de Jesus, Coelho-Rocha, Barroso, Tavares, Azevedo, Mancha-Agresti and Drumond. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## CAPÍTULO II

**Justificativa, objetivos, metodologia, resultados, discussão, conclusão, perspectivas, referências bibliográficas e anexos.**



## 1. JUSTIFICATIVA

O 5-FU é um dos agentes quimioterápicos essenciais para o tratamento de diversos tipos de câncer. Porém, o mecanismo de ação deste fármaco é inespecífico, gerando vários efeitos tóxicos principalmente sobre as células do TGI (Longley et al., 2003; Martins e Wagner, 2013; Cassidy e Syed, 2017; Guichard et al., 2017), sendo a mucosite intestinal um dos efeitos colaterais mais prevalentes (cerca de 50 - 80% dos casos notificados) (Kim et al., 2015).

A mucosite intestinal caracteriza-se por uma lesão inflamatória ulcerativa que acomete principalmente o intestino delgado e leva o paciente a apresentar sintomas como diarreia, dor abdominal, sangramento, fadiga, desnutrição, desequilíbrio eletrolítico e, nos casos mais graves, infecções com complicações que podem ser fatais (Sonis, 2004b; Touchefeu et al., 2014; Kim et al., 2018). Dessa forma, trata-se de um grave problema na clínica médica, e atualmente as terapias existentes são limitadas ao manejo clínico dos sintomas (Van Seville et al., 2015; Ribeiro et al., 2016).

O uso probióticos vêm sendo amplamente explorados como alternativas terapêuticas para a mucosite intestinal, devido às propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras que exercem no TGI. Espécies do gênero *Lactobacillus* têm sido bem caracterizadas na literatura devido a capacidade de atenuar os danos inflamatórios intestinais ocasionados pelo antineoplásico 5-FU (Hemarajata e Versalovic, 2013b; Justino et al., 2015; Oh et al., 2017a). No entanto, há uma resistência da clínica médica no uso de microrganismos vivos em indivíduos imunocomprometidos, como na mucosite intestinal, as pesquisas atuais enfatizam que a viabilidade de um microrganismo não é necessária para sua ação probiótica e que seus diferentes compostos (carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas, ácidos orgânicos, como também, componentes da parede celular), bem como, sua forma inativada, também trazem benefícios à saúde (Cuevas-González et al., 2020). Desta forma, a administração de microrganismos não-viáveis, e de seus produtos secretados, podem apresentar vantagens em termos de segurança para os pacientes (Taverniti e Guglielmetti, 2011; Aguilar-Toalá et al., 2018; Cuevas-González et al., 2020).

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 é uma nova linhagem com potencial probiótico, cujo, suas propriedades terapêuticas têm sido reportadas tanto *in vitro* (Kociubinski et al., 1996, 1999; Hugo et al., 2008; Rolny et al., 2016a; Hugo et al., 2017), quanto *in vivo* (De Jesus et al., 2019). No entanto, não há relatos na literatura se esta cepa, após ser inativada por calor, ou se seus produtos secretados são capazes de conferir os mesmos efeitos imunomodulatórios e anti-inflamatórios atribuídos à linhagem viável. Assim, o presente trabalho se propôs a avaliar o efeito terapêutico de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133, na sua forma viável, inativada por calor e de seus metabólitos secretados em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5 fluorouracil.

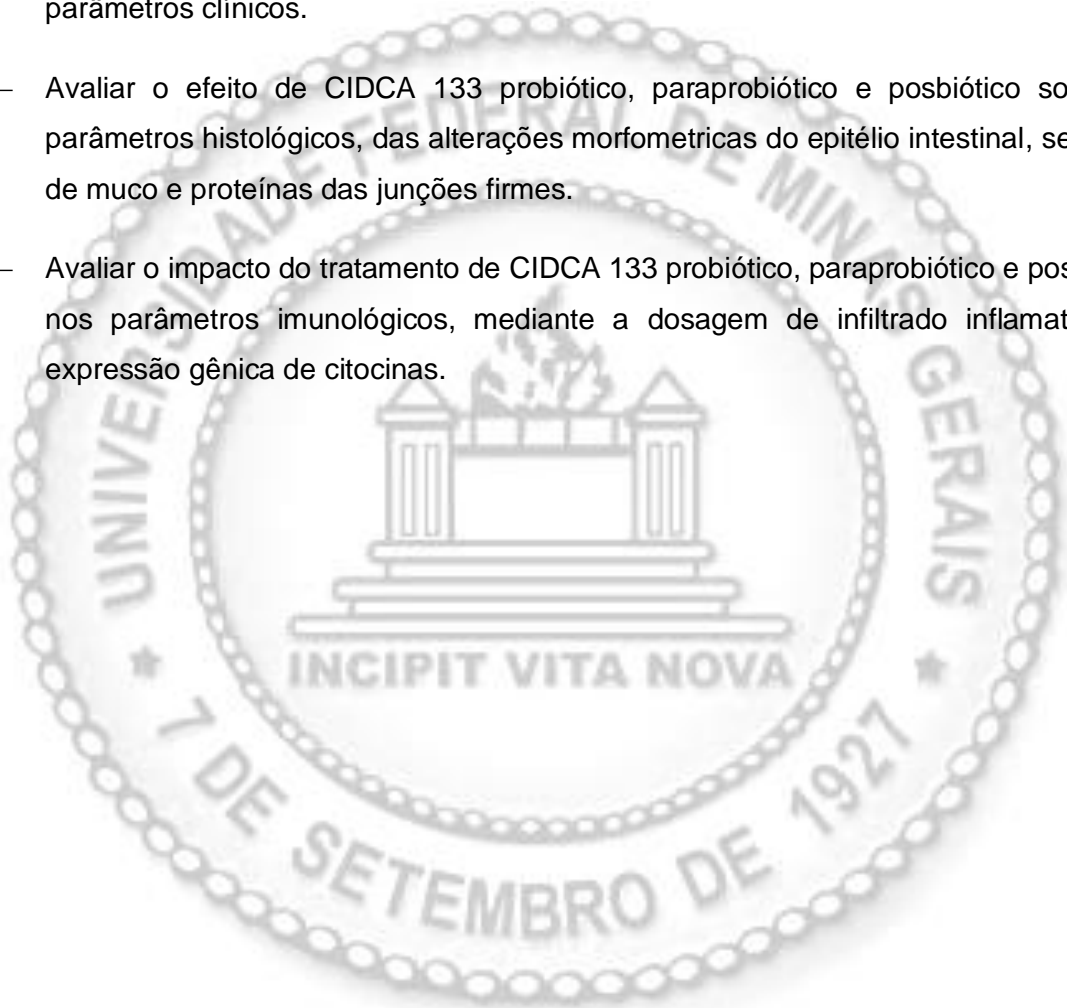
## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- 5 Avaliar os efeitos da administração de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133, viável (probiótico), inativado pelo calor (paraprobiótico) e seu sobrenadante (posbiótico) em modelo murino de mucosite intestinal induzida pelo antineoplásico 5-FU.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de CIDCA 133 probiótico, paraprobiótico e posbiótico sobre os parâmetros clínicos.
- 10 – Avaliar o efeito de CIDCA 133 probiótico, paraprobiótico e posbiótico sobre os parâmetros histológicos, das alterações morfométricas do epitélio intestinal, secreção de muco e proteínas das junções firmes.
- Avaliar o impacto do tratamento de CIDCA 133 probiótico, paraprobiótico e posbiótico nos parâmetros imunológicos, mediante a dosagem de infiltrado inflamatório, e  
15 expressão gênica de citocinas.



### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Linhagem bacteriana e padronização da curva de crescimento.

Neste trabalho, utilizou-se a linhagem probiótica *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 (CIDCA 133) pertencentes a coleção de culturas do Centro de Investigação e Desenvolvimento em Criotecnologia de Alimentos (CIDCA) da Universidade Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, Argentina. A identificação da linhagem foi confirmada por espectrometria de massa (MALDI TOF) e sequenciamento. CIDCA 133 foi mantida a -80°C em caldo MRS [*de Mann-Rogosa-Sharp* (Kasvi, Itália)], com 15% de glicerol (Sigma- Aldrich) como crioprotetor.

Foram realizadas curvas de crescimento com intuito de estabelecer uma relação entre a densidade óptica (DO), que reflete o crescimento bacteriano, e o número de unidades formadoras de colônias (UFC), para assim, determinar o penúltimo ponto da fase exponencial de crescimento da referida linhagem para posterior confecção das doses que foram administradas aos animais dos diferentes grupos experimentais. Para tanto, 50 µL da cultura congelada foram ativados em 15 mL de caldo MRS (Kasvi, Itália), a 37°C em estufa bacteriológica, sem agitação, durante 16 horas, em condições de microaerobiose.

Transcorrido esse tempo, procedeu-se à medição da absorbância da cultura crescida, a uma DO de  $_{600nm}$ , e posteriormente foi realizado um segundo inóculo, a partir deste primeiro, em duplicatas biológicas, sendo a absorbância inicial de 0,04 (DO  $_{600nm}$ ) em 50 mL de meio MRS (Kasvi, Itália), de acordo com a seguinte fórmula:

**Fórmula 1:** Fórmula para cálculo da densidade óptica inicial de CIDCA 133 para confecção das doses (DO  $_{600nm}$ ).

$$\text{Volume do pré inóculo a ser adicionado} = \frac{\text{DO}_{600nm} \text{ } 0,04 \times \text{volume final}}{\text{DO}_{600nm} \text{ overnight}}$$

Após esta diluição, a cultura foi incubada novamente nas condições anteriormente descritas e a curva foi acompanhada durante as primeiras 10 horas de crescimento. Durante esse período, a absorbância (DO $_{600nm}$ ) da cultura foi medida em um espectrofotômetro digital faixa 325-1000 NM - 722G. A cada hora uma alíquota de 100 µL foi retirada e foram realizadas diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ), com plaqueamento de 100 µL das mesmas, em duplicata, em placas de Petri com MRS-ágar (1,5%) (Kasvi, Itália), e incubadas em estufa microbiológica a 37°C, por 48 horas. Transcorrido este tempo foi realizada a contagem das colônias de cada uma das placas e, em seguida, realizado o cálculo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), de acordo com a fórmula a seguir:

**Fórmula 2:** Fórmula para o cálculo do número de unidade formadora de colônias (UFC/mL) de CIDCA 133.

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

### 3.2 Preparação de doses

5 As doses de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133, para administração oral, foram confeccionadas da seguinte forma: 50 µL da cultura de CIDCA 133 previamente ativada em caldo MRS foram inoculados em 15 mL do mesmo e crescidos a 37°C, sem agitação e em ambiente de microaerobiose, em que, o Falcon foi totalmente cheio e a cultura teve o mínimo de oxigênio para seu crescimento, por 16 horas. Decorrido esse tempo, um novo inóculo foi  
10 feito diluindo-se o pré-inóculo em 100 mL de MRS na proporção de 1:20. Assim que a absorbância de 1,6 (DO<sub>600nm</sub>), referente ao penúltimo ponto da fase exponencial da curva de crescimento, foi atingida, a cultura celular foi centrifugada a 1520 g por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi separado e o pellet lavado duas vezes em PBS 0,1 estéril [(0,006M de NaCl, 0,001 M de KCl, 0,0003 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,0006 M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>- Synth) e quantidade suficiente  
15 (q.s.p) de água destilada para o volume final de 450 mL]. O precipitado final foi ressuscitado em PBS (0,1 M) estéril de maneira que cada 1 mL fosse equivalente a 10<sup>9</sup> UFC e foram imediatamente mantidos em ultra freezer a -80°C, até o momento da administração aos animais.

Para testar a viabilidade das doses de CIDCA 133, a cada dia, 100 µL das doses  
20 armazenadas em -80 °C foram plaqueadas, em duplicata, em placas MRS-ágar e incubadas em estufa microbiológica a 37°C, por 48 horas.

Para a inativação de CIDCA 133, após a bactéria ter atingido o último ponto da fase exponencial, o sobrenadante da cultura foi descartado e o pellet foi autoclavado a 121°C por 15 min, e, em seguida, armazenado em ultra freezer a -80°C, até o momento da sua utilização.  
25 Para comprovar o processo de inativação de CIDCA 133, 100 µL deste pellet foram plaqueados em MRS-ágar, e as placas foram então incubadas em estufa bacteriológica, a 37°C por 48 horas.

### 3.3 Preparo do sobrenadante (SN) de CIDCA 133

30 O sobrenadante de CIDCA 133 foi preparado seguindo o protocolo descrito por Prisciandaro et al. (2012). Brevemente, 50 µL da cultura estoque de CIDCA 133 foram crescidos em 15 mL de meio MRS estéril, por 16 horas a 37°C, sem agitação e em condições de microaerobiose. Após esse período, foi realizado um inóculo diluindo-se o pré inóculo em 100 mL de MRS (Kasvi, Itália) na proporção de 1:20. Assim que a absorbância atingiu 1,6  
35 (DO<sub>600nm</sub>), o volume foi centrifugado a 1520 g por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, o pH aferido em PHmetro de bancada PH 0-14 110V Kasvi, e a solução foi tamponada com

solução de Tris base 1 M (Sigma-Aldrich) (6 g de Tris-base q.s.p para 50 mL de água) até atingir o pH de 7,2. Posteriormente, a solução foi filtrada com filtro 0,22 µm (Kasvi) e concentrada com Vivaspín molecular weight cut-off (MWCO) 10,000 Kilodalton (kDa) (Sinapse Biotecnologia) por 30 min a 2370 g e, após esse período, o concentrado foi alíquotado (2 mL) em microtubos e armazenado em ultra freezer a -80°C, até o momento da utilização.

Para confirmação da esterilidade do sobrenadante tratado, 100 µL do mesmo foram dispensados em placas de Petri MRS ágar e incubados a 37°C durante 48 horas.

### 3.4 Animais e Manejo

Foram utilizados camundongos BALB/c, machos (25-30g), com 6 semanas de idade, obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) ICB, UFMG. Os animais foram mantidos em mini isoladores em condições controladas de temperatura ( $21 \pm 2$  °C) e fotoperíodo (12h claro/12h escuro), com alimentação e água *ad libitum* até o término do experimento. Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (Protocolo 112/2020), o qual encontra-se em anexo.

### 3.5 Delineamento experimental

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais (n=6) sendo eles: **I-** CTL (controle negativo), **II-** MUC (mucosite), **III-** MUC+MRS (mucosite tratado com caldo MRS) **IV-** MUC+CIDCA 133 VIÁVEL (mucosite+probiótico) **V-** MUC+CIDCA 133 INATIVADA PELO CALOR (mucosite+paraprobiótico), **VI-** MUC+SOBRENADANTE DE CIDCA 133 VIÁVEL (mucosite+posbiótico). Os grupos experimentais e seus respectivos tratamentos estão descritos na Tabela 1.

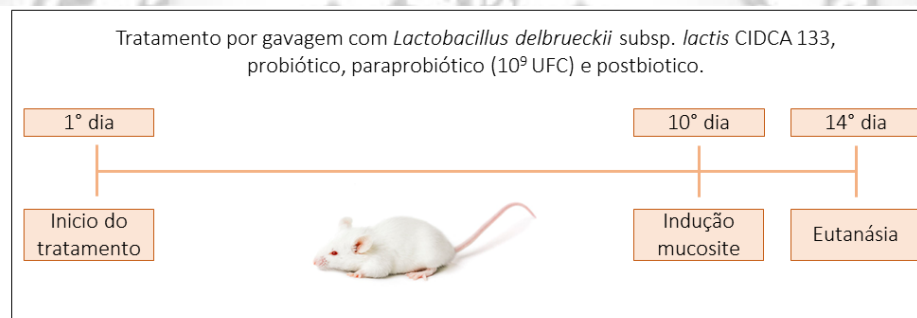
A mucosite intestinal foi induzida conforme protocolo descrito por Carvalho et al., (2017) (Figura 1), e, para tanto, os animais dos grupos II a VIII receberam, no 10º dia do experimento, injeção intraperitoneal (i.p.), contendo 300 mg/kg de 5-FU (Fauldfluor®, Libbs, São Paulo, Brasil). Os animais do grupo I receberam injeção i.p. com mesmo volume de solução salina. No dia 14º do experimento, os animais foram anestesiados com 10 mg/kg de Xilazina (cloridato de xilazina, Syntec) e 100 mg/kg de Cetamina (cloridato de cetamina, Syntec) (i.p.), e eutanasiados por aprofundamento anestésico, seguido de descolamento cervical, conforme aprovado pela CEUA. Após a evisceração, as carcaças foram armazenadas a -20 ° C para posterior incineração.

**Tabela 1.** Grupos experimentais, tratamentos realizados e concentração do fármaco 5-FU administrado em animais de diferentes grupos experimentais.

5

GRUPOS EXPERIMENTAIS	TRATAMENTO (Gavagem 0,3 mL)	INDUÇÃO ( <i>i.p</i> ) (5-FU = 300 mg/kg)
CTL (controle negativo)	Salina 0,9 %	Salina 0,9 %
MUC (mucosite)	Salina 0,9 %	5-FU
MRS (mucosite tratado com caldo MRS)	MRS	5-FU
MUC + CIDCA 133 viável (mucosite + probiótico)	CIDCA 133 viável ( $10^9$ UFC/mL)	5-FU
MUC + CIDCA 133 INATIVADA POR VALOR (mucosite + paraprobiótico)	CIDCA 133 inativada pelo calor ( $10^9$ UFC/mL)	5-FU
MUC + SOBRENADANTE DE CIDCA 133 VIÁVEL (mucosite + posbiótico)	SN* CIDCA 133 viável	5-FU

\* SN = sobrenadante



10

**Figura 1.** Desenho experimental do modelo de mucosite intestinal induzido por 5-FU.

Os animais receberam, via gavagem, solução salina e tratamentos conforme especificados na tabela 1, durante 14 dias. No 10º dia de experimentação foram administrados 300 mg/kg de 5-FU (ou solução salina) por via. *ip*. Os animais foram eutanasiados no 14º dia por aprofundamento anestésico seguido de deslocamento cervical.

15

### 3.6 Parâmetros analisados

#### 3.6.1 Análise do consumo alimentar, hídrico e perda de peso

Os consumos alimentar e hídrico foram avaliados diariamente por meio da diferença entre o peso da ração e o volume de líquido ofertados e a sobra deles, 24 horas após a oferta. Os animais e a ração foram pesados diariamente em balança semi-analítica (FEH Series digital - 220g x 0,001 g), sempre no mesmo horário. O peso diário dos animais foi expresso em porcentagem (%) da variação de peso em relação ao peso inicial.

#### 3.6.2 Análises histopatológica e morfométrica

As análises histopatológica e morfométrica foram realizadas de acordo com o protocolo pré estabelecido por Ferraris e Vinnakota (1995). O segmento intestinal correspondente ao íleo distal (20% da longitude intestinal) foi isolado, estendido com a

25

camada serosa em contato com papel filtro e seccionado longitudinalmente a partir da borda anti-mesentérica. O conteúdo luminal foi lavado com PBS (0,1M) até a remoção completa dos fluidos. A área seccionada foi enrolada no sentido da porção distal para a proximal, acondicionada em cassetes histológicos e transferida para solução de formol 4% tamponado [0,03 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich), 0,04 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich), 100 mL formaldeído (Nox) 37% a 40%, q.s.p para 1000 mL de água destilada], até o processamento das amostras.

O material foi submetido às técnicas histológicas de rotina e analisado por meio da classificação histopatológica, sob microscopia óptica. O escore histológico de cada lâmina foi determinado por um patologista, por meio de um estudo duplo cego, utilizando o método previamente descrito por Soares et al. (2008) (Tabela 2). Cada lâmina foi pontuada pelo patologista variando de escore de 0 para amostras sem danos (normal) a escore de 3 para amostras que revelaram dano grave.

Por fim, 10 campos histológicos da secção ileal de cada animal foram capturados aleatoriamente com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus BX41; objetiva 40x) acoplado ao sistema de aquisição de imagens (Software Spot Basic versão 3.4.5). As imagens foram analisadas utilizando o software *ImageJ* (versão 1.51j8), de forma a se medir a altura de 20 vilosidades e a profundidade de 20 criptas.

**Tabela 2.** Parâmetros semiquantitativos para determinação dos escores histopatológicos do íleo relacionados à progressão dos danos ocasionados pela mucosite intestinal induzida por 5-FU seguindo o protocolo previamente descrito por Soares et al. (2008).

<b>Escore</b>	<b>Achados microscópicos</b>
<b>0</b>	Achados histológicos normais.
<b>1</b>	<b>Mucosa:</b> vilos encurtados, perda da arquitetura das criptas, infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. <b>Muscular:</b> sem alterações
<b>2</b>	<b>Mucosa:</b> vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas. Intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema. <b>Muscular:</b> sem alterações
<b>3</b>	<b>Mucosa:</b> vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema. <b>Muscular:</b> edema, vacuolização e infiltrado de neutrófilos.

### 3.6.3 Atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)

Para determinar o índice de neutrófilos no intestino delgado, foi mesurada a atividade da enzima mieloperoxidase, conforme descrito por Souza et al. (2000). Brevemente, fragmentos do íleo distal dos animais foram coletados, pesados e armazenados em ultra freezer, a -80°C. Após o descongelamento, pesaram-se 100 mg de tecido e a este fragmento

foi adicionado um volume de 1,9 mL de solução tampão BUFFER 1 gelado [0,01 M de NaCl (Synth); 0,02 M de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich); 0,04 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.1H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich); 0,015 M de Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma-Aldrich); pH 4,7] e homogeneizado utilizando macerador Marconi (modelo MA 102/MINI). Este macerado foi centrifugado a 4°C por 15 minutos a 9500 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido à lise hipotônica das hemácias, adicionando 0,2% de NaCl (Synth) gelado e 1,6% de NaCl suplementado com glicose 5% (Synth) na proporção de 1,5 mL/100 mg de tecido. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas novamente a 4°C por 15 minutos, a 9500 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado com tampão contendo 6,9 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.1H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich); Hexadecyltrimethylammonium Bromide (HTAB) 0,5% (Sigma-Aldrich), (pH 5,4), na proporção de 1,9 mL/100 mg de tecido e homogeneizadas à temperatura ambiente. Sucessivamente, alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para microtubos, e procedeu-se a 3 ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido. Após este processo, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 9500 g e o sobrenadante foi coletado para o ensaio enzimático.

Para realização do ensaio enzimático, adicionou-se 25 µL do sobrenadante coletado e 25 µL do substrato TMB 1,6 mM [3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Sigma-Aldrich)], previamente diluído em 3,845 mg/mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth) em placas de 96 poços (Nunc-Immuno, MaxiSorp). Posteriormente, as amostras foram incubadas a 37°C, por 5 min. Em seguida, foram adicionados 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,002% (Sigma-Aldrich) a cada poço, e incubados à 37°C por 5 min. Logo após, foram adicionados 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1M (Sigma-Aldrich), para interrupção da reação. Então, a absorbância foi medida através de espectrofotometria, em comprimento de onda de 450 nm, utilizando um leitor de microplacas (Bio-Rad modelo 450, Bio-Rad 42 Laboratories, Hercules, CA, USA), sendo os resultados plotados em unidade de enzima por miligrama de tecido (U/mg).

#### **3.6.4 Atividade da enzima Peroxidase Eosinofílica (EPO)**

Para determinar o índice de eosinófilos no intestino delgado, foi mesurada a atividade da enzima peroxidase eosinofílica, conforme descrito por Strath e Sanderson (1985). Para isso, a cada 100 mg de íleo foram adicionados 1,9 mL de PBS 0,5M. Em seguida, a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 4°C a 9500 g por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi submetido à lise hipotônica pela adição das soluções de NaCl 0,2% e de NaCl 1,6% (Sigma-Aldrich) suplementada com glicose 5% (Synth) na proporção de 500 µL/100 mg de tecido. Logo após a lise, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas sob as mesmas condições anteriormente relatadas e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi ressuscitado com HTAB 0,5%(Sigma-Aldrich) diluído em 100 mL de PBS (pH 7,4) na proporção de 1,9 mL/100 mg de tecido. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para um



microtubo e procedeu-se a 3 ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 4°C, por 15 min, a 9500 g e o sobrenadante foi coletado para o ensaio enzimático.

Em uma placa de 96 poços (Nunc-Immuno, MaxiSorp) foram adicionados 75 µL de cada amostra. Em seguida, foram adicionados 75 µL do cromógeno O-fenilenediamina diidrocloreto a 1,5 mM (OPD) (Sigma-Aldrich) diluído em tampão Tris-HCl a 0,075 mM (pH 8,0) (Sigma-Aldrich) acrescidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 6,6 mM (Vetec). A placa foi incubada na ausência de luz, a 20°C, por 30 min. e a reação foi interrompida com o acréscimo de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1M (Vetec). A absorbância foi medida por espectrofotometria, em comprimento de onda de 492 nm, utilizando um leitor de microplacas (Bio-Rad modelo 450, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), sendo os resultados plotados em unidade relativa da enzima por miligrama de tecido (U/mg).

### 3.6.5 Análise da expressão gênica relativa

Após a eutanásia, fragmentos de 2 cm de tecido ileal foram coletadas e acondicionadas em microtubos contendo 150 µL de solução de RNA later (ThermoFisher), e armazenados a -20 °C. Posteriormente, o tecido foi submetido às seguintes etapas:

#### 3.6.5.1 Extração do RNA e síntese do cDNA

O RNA total da porção ileal foi obtido através da extração com o reagente TRIzol (Ludwig Biotec), seguindo as recomendações do fabricante. Para isto, em um microtubo de 2 mL, foram adicionados 10 mg de beads magnéticas (Sigma-Aldrich) e 500 µL de TRIzol. Em seguida, aproximadamente 20 mg de tecido ileal foram acondicionados nesses microtubos, e homogeneizados utilizando o aparelho Precellys (Cryolys<sup>®</sup>) sendo realizados 2 ciclos de 4340 g x 24 segundos. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas por 10 min a temperatura ambiente, e a elas adicionaram-se 100 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich) e agitou-se vagarosamente por 30 segundos e, logo após, centrifugou-se à 16060 g por 15 min, a 4°C. A fase superior, transparente, foi transferida para um microtubo contendo 250 µL de isopropanol (Vetec) gelado e centrifugado a 16060 g, a 4°C, por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 µL de etanol 70% gelado, e as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, sob as mesmas condições, esse processo de descarte do sobrenadante e adição de 500 µL de etanol 70% gelado foi repetido por mais 3 vezes e então, o pellet foi seco em temperatura ambiente por 15 min e ressuspendido em 50 µL de água DEPC (Diethyl pyrocarbonate - Sigma-Aldrich). A qualidade e quantidade do RNA foram avaliados em gel de agarose 1,5% (Kasvi-Italia) e através de espectrofotometria [NanoDrop<sup>®</sup> 2000 no comprimento de onda 260/280 (Thermo Scientific)], respectivamente.

Em seguida, as amostras de RNA foram purificadas utilizando a enzima DNase I (Invitrogen) (1 µL de DNase Buffer 10X; 1 µL de DNase I, RNase Free; 1µg de RNA Total; Água Nuclease Free q.s.p. 10 µL).

Para síntese do cDNA, a DNase I anteriormente adicionada às amostras foi inativada a 37° C por 30 min e o cDNA foi gerado a partir de 2µg do RNA seguindo as recomendações do kit Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher).

### 3.6.5.2 PCR quantitativa (qPCR)

O cDNA sintetizado foi amplificado por qPCR, utilizando primers específicos listados na tabela 3. A PCR quantitativa foi realizada no aparelho Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR System usando o PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (ThermoFisher) nas seguintes condições: 50 °C por 2 min, 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60 °C por 1 min. A expressão de genes alvos foi analisada utilizando o método relativo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  descrito por Livak e Schmittgen (2001), e foi normalizada usando os genes  $\beta$ -actina (Actb) e GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) como referências endógenas.

Foram mensuradas as expressões relativas das citocinas pró-inflamatórias (Il6, Il12p40, Tnf e Il1b) e anti-inflamatória (Il10).

Para avaliar integridade da barreira intestinal dos animais procedeu-se à análise da expressão gênica das proteínas das junções firmes, Claudinas (Cldn1, Cldn2), Zonulin, F11r e da glicoproteína Muc2 envolvida na função de barreira epitelial utilizando primers específicos (Tabela 3).

**Tabela 3:** Sequência de primers utilizados para o ensaio da RT- qPCR

Gene	Primer Foward	Primer Reverse	Referência
<b>Actb</b>	GCTGAGAGGGAAATCGTGCGTG	CCAGGGAGGAAGAGGATGCGG	Volynets et al.,(2016)
<b>GAPDH</b>	TCACCACCATGGAGAAGGC	GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA	Giulietti et al.,(2001)
<b>Il6</b>	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	Giulietti et al.,(2001)
<b>Il12p40</b>	GGAAGCACGGCAGCAGAATA	AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG	Giulietti et al., (2001)
<b>Il10</b>	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	Giulietti et al., (2001)
<b>Il1b</b>	CTCCATGAGCTTTGTACAAGG	TGCTGATGTACCAGTTGGGG	Song et al., (2013)
<b>Tnf</b>	ACGTGGAAGTGGCAGAAGAG	CTCCTCCACTTGGTGGTTTTG	Song et al., (2013)
<b>Cldn1</b>	TCCTTGCTGAATCTGAACA	AGCCATCCACATCTTCTG	Volynets et al., (2016)
<b>Cldn2</b>	GTCATCGCCCATCAGAAGAT	ACTGTTGGACAGGGAACCAG	Volynets et al., (2016)
<b>Zonulin</b>	CCACCTCTGTCCAGCTCTTC	CACCGGAGTGATGGTTTTCT	Volynets et al., (2016)
<b>F11r</b>	CACCTTCTCATCCAGTGGCATC	CTCCACAGCATCCATGTGTGC	Volynets et al., (2016)
<b>Muc 2</b>	GATGGCACCTACCTCGTTGT	GTCTGGCACTTGTGGAAT	Volynets et al., (2016)

25

### 3.7 Análises estatísticas

Para avaliar a normalidade da distribuição dos dados, foi utilizado o teste Shapiro-Wilk. Dados com a distribuição normal (paramétricos) foram avaliados pelo teste ANOVA, e pós-teste Tukey. Os dados que apresentavam distribuição não-normal (não-paramétricos) foram submetidos à análise de variância não-paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de múltiplas comparações de Dunns. A comparação entre o consumo alimentar e hídrico antes e após a indução da mucosite foi feita utilizando o teste T. Todos os dados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 7.0, sendo considerados valores estatisticamente significativos aqueles com  $p < 0,05$ .



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Relação entre a curva de crescimento de CIDCA 133 e número de unidades formadoras de colônias (UFC)

Com o intuito de estabelecer uma relação entre DO e UFC, avaliou-se o crescimento da cultura bacteriana, de hora em hora, por um período de 10 horas. A cada hora foi feita a medição da absorbância na DO<sub>600nm</sub> e plaqueamento, após diluição seriada, para assim, realizar a contagem das UFCs. Verificou-se que o último ponto da fase logarítmica de crescimento iniciou-se na 7<sup>a</sup> hora de crescimento (Figura 2) nas condições previamente descritas (item 3.1). Nestas condições, obteve-se o número de  $1,3 \times 10^9$  UFC/mL. No entanto, para confecção das doses utilizamos o penúltimo ponto da fase exponencial DO<sub>600nm</sub> 1,6 ( $1,2 \times 10^9$  UFC/mL).

No que diz respeito à avaliação da viabilidade das bactérias após o processo de congelamento, demonstrou-se que a linhagem permaneceu na concentração de  $10^9$  UFC/mL por até 4 dias em  $-80^\circ\text{C}$ .

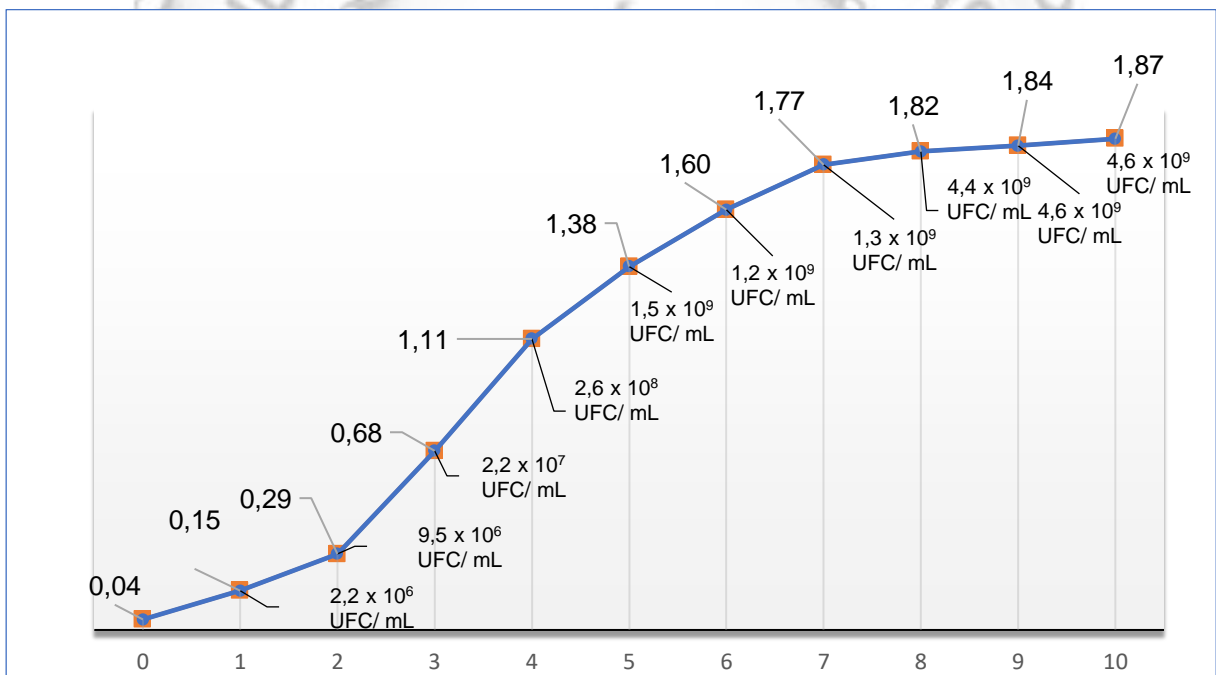
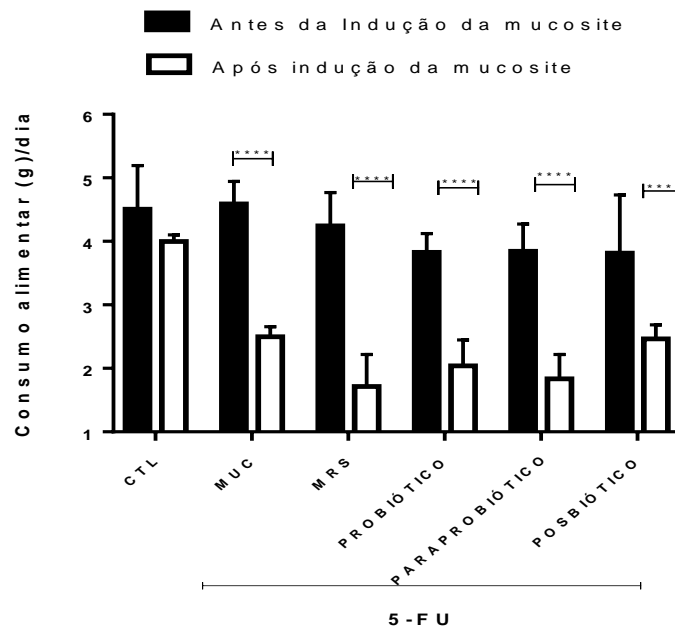


Figura 2: Curva de crescimento e número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de CIDCA 133. A absorbância (DO<sub>600nm</sub>) inicial é de 0,04. As medições de absorbância e plaqueamento foram realizadas de hora em hora por um período de 10 horas.

### 4.2 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133, nas três variantes testadas não influenciam nos consumos hídrico e alimentar dos animais com mucosite intestinal

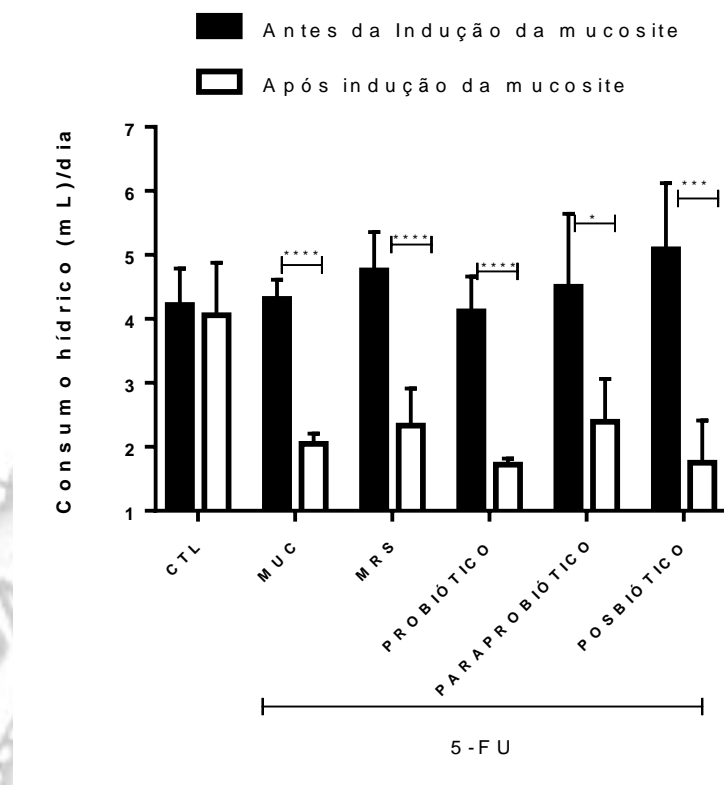
Observou-se que antes da indução da mucosite, os animais de todos os grupos experimentais consumiram, em média, a mesma quantidade de ração por dia, não havendo, portanto, diferença significativa entre os grupos neste período do experimento (figura 3A). Após a indução da mucosite, o grupo MUC apresentou redução no consumo de ração ( $2,49 \pm 0,15$  g) quando comparado ao controle negativo (CTL) ( $3,99 \pm 0,10$  g) que manteve sua

ingestão alimentar semelhante ao período inicial do experimento. Observou-se também que os tratamentos com MRS ( $1,75 \pm 0,50$  g), Probiótico ( $2,04 \pm 0,40$  g), paraprobótico ( $1,83 \pm 0,38$  g) e posbiótico ( $2,46 \pm 0,22$  g) não foram capazes de influenciar ( $p > 0,05$ ) o consumo alimentar dos animais, quando estes foram comparados ao grupo MUC (Figura 3 B). Da mesma forma, não houve diferença entre todos os grupos quando se avaliou consumo total durante os 14 dias de experimentação ( $p > 0,05$ ) (Figura 3 C e D).



**Figura 3: Efeito da administração por gavagem de CIDCA 133, probiótico, paraprobótico e posbiótico na variação do consumo alimentar antes e após a indução da mucosite.** A indução da mucosite foi realizada no 10º dia, os animais do grupo controle (CTL) receberam salina 0,9%, e os animais do restante dos grupos experimentais receberam 5-FU (300 mg/kg) por via intraperitoneal, foram alimentados com ração *ad libitum* e tratados por gavagem com CIDCA 133 (probiótico, paraprobótico e posbiótico) (n=6). Os símbolos \*\*\*\* indicam diferença estatística calculada usando o teste T (*two-tailed*,  $p < 0,05$ ).

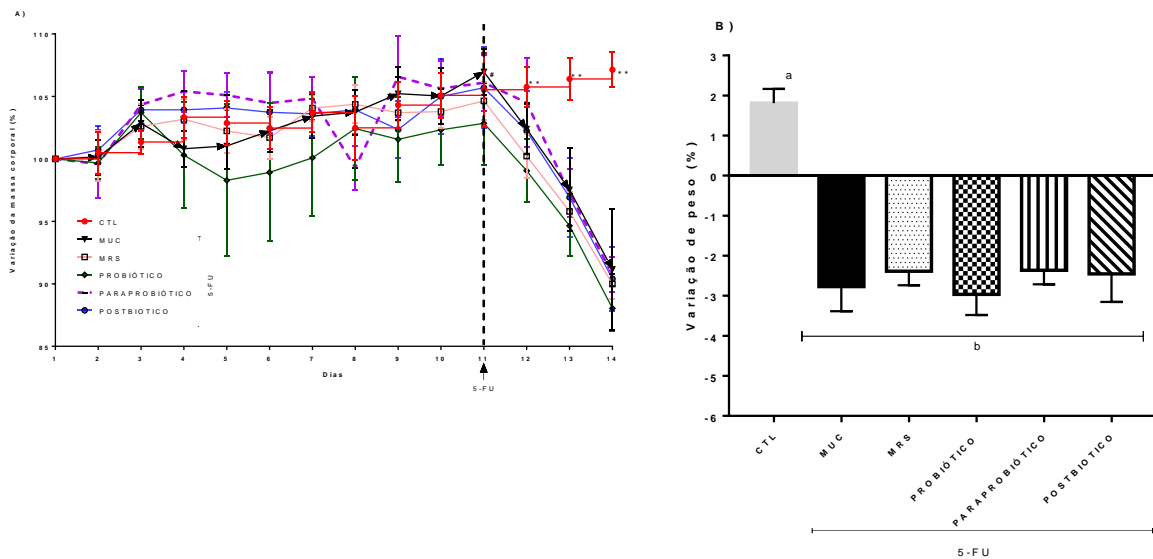
Referente ao consumo hídrico foi possível observar que os animais dos grupos experimentais consumiram em média o mesmo volume por dia, não havendo, portanto, diferença significativa entre eles ( $p < 0,05$ ) (Figura 4 A). Contudo, após a indução da mucosite os grupos MUC e MRS ( $2,04 \pm 0,16$  mL e  $2,33 \pm 0,57$  mL, respectivamente) reduziram o consumo hídrico, quando comparado com o grupo controle CTL ( $4,05 \pm 0,82$  mL) ( $p < 0,05$ ), conforme esperado. Os tratamentos com probiótico ( $1,72 \pm 0,09$  mL), paraprobótico ( $2,39 \pm 0,67$  mL) e posbiótico ( $1,75 \pm 0,66$  mL) não foram capazes de reverter a diminuição do consumo hídrico após a indução da mucosite intestinal, sendo os resultados encontrados, semelhantes aos do grupo MUC ( $p > 0,05$ ) (Figura 4B e D). Também não foi possível observar qualquer diferença no consumo hídrico total entre os grupos experimentais durante os 14 dias de experimentação ( $p > 0,05$ ) (Figura 4 C).



**Figura 4: Efeito da administração por gavagem de CIDCA 133, probiótico, paraprobiótico e posbiótico na variação do consumo hídrico, antes e após a indução da mucosite.** Foram ofertados 45 mL de água diária aos animais, e eles foram tratados com CIDCA 133 (probiótico, paraprobiótico e posbiótico) administrado via gavagem (300  $\mu$ L) (n=6). os símbolos \*, \*\*\*, \*\*\*\* indicam diferenças estatísticas calculadas usando o teste T (two-tailed,  $p < 0,05$ ).

#### 4.3 Administração oral de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 nas três variantes testadas não foi capaz de reduzir a perda de peso dos animais com mucosite intestinal

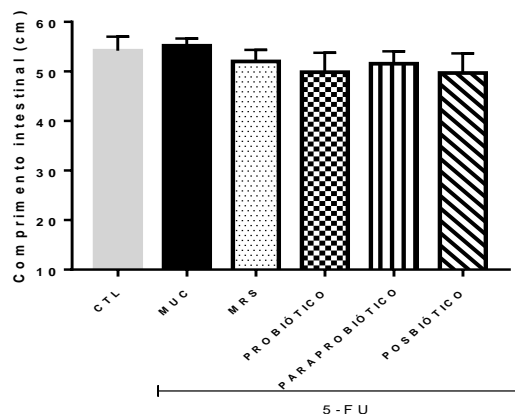
Não foram observadas variações do peso corporal entre os animais dos grupos experimentais até a indução da mucosite. Contudo, após a indução da doença, os grupos experimentais, MUC ( $-2,77 \pm 0,61$  g), MRS ( $-2,38 \pm 0,35$  g), probiótico ( $-2,96 \pm 0,51$  g), paraprobiótico ( $-2,36 \pm 0,35$  g) e posbióticos ( $-2,45 \pm 0,69$  g) começaram a exibir perdas do peso corporal ao se comparar com o grupo CTL ( $1,81 \pm 0,35$  g). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais quando este parâmetro foi avaliado ( $p > 0,05$ ), e todos os grupos se diferiram ao grupo CTL ( $p < 0,05$ ) (Figuras 5 A e B).



**Figura 5: Efeito da administração por gavagem de CIDCA 133, probiótico, paraprobiótico e posbiótico na variação de perda de peso corporal dos animais. Variação da massa corporal (A)** \*\* indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do grupo CTL em comparação aos demais grupos experimentais, e # indica diferença estatística do grupo MUC com o grupo probiótico ( $p < 0,05$ ) pelo teste Two ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Perda de peso dos grupos experimentais (B). A perda de peso foi avaliada por one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

5 4.4 **Administração** oral de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 nas três variantes testadas não influencia no comprimento intestinal.

10 Para este experimento o comprimento intestinal de cada animal foi medido usando uma régua (cm), e, não houve diferença significativa entre todos os grupos experimentais (Fig.6), CTL ( $55 \pm 2,49$  cm), MUC ( $54 \pm 2,48$  cm), MRS ( $52 \pm 2,36$  cm), probiótico ( $49 \pm 2,36$  cm), paraprobiótico ( $51 \pm 2,50$  cm) e posbiótico ( $49 \pm 3,48$  cm) ( $p > 0,05$ ).



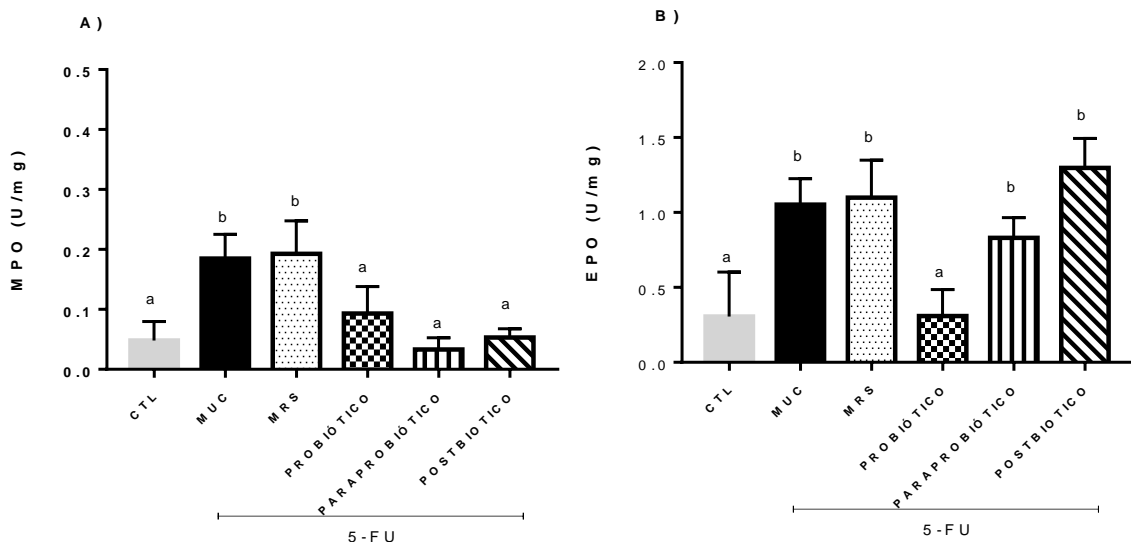
**Figura 6: Efeito da administração por gavagem de CIDCA 133, probiótico, paraprobiótico e posbiótico no comprimento intestinal dos animais com mucosite intestinal: Comprimento intestinal medido em cm, nenhuma diferença estatística ( $p < 0,05$ ) pelo teste Two ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey.**

20

#### 4.5 Probiótico, paraprobiótico e posbióticos de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 foram capazes de prevenir o aumento do infiltrado de neutrófilos em animais com mucosite intestinal

O infiltrado inflamatório foi avaliado por meio da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) no lisado celular da região ileal. Os animais do grupo controle positivo, que receberam apenas administração *i.p.* de 5-FU tiveram os infiltrados de neutrófilos e eosinófilos ( $0,18 \pm 0,04$  U/mg para MPO;  $1,05 \pm 0,17$  U/mg para EPO) aumentados, como esperado, ao se comparar com o grupo CTL, ( $0,04 \pm 0,03$  U/mg para MPO;  $0,30 \pm 0,29$  U/mg para EPO) (Figuras 6A e B). O grupo que recebeu apenas MRS (controle positivo) não foi capaz de prevenir o aumento do infiltrado inflamatório de neutrófilos e eosinófilos ( $0,19 \pm 0,05$  U/mg para MPO;  $1,09 \pm 0,24$  U/mg para EPO) (Figura 6A e B), como também era esperado, diferentemente dos tratamentos: Probiótico ( $0,09 \pm 0,04$  U/mg), paraprobiótico ( $0,03 \pm 0,01$  U/mg) e posbiótico ( $0,05 \pm 0,01$  U/mg) que foram capazes de prevenir o aumento da atividade da enzima mieloperoxidase com valores estatisticamente semelhantes ao do grupo CTL ( $0,04 \pm 0,03$  U/mg) ( $p < 0,05$ ) (Figura 6 A). Com relação ao infiltrado de eosinófilos, apenas o grupo tratamento probiótico ( $0,30 \pm 0,17$  U/mg) foi capaz de prevenir o seu aumento, observando-se valores semelhantes aos do CTL ( $0,30 \pm 0,30$  U/mg) ( $p > 0,05$ ) (Figura 6B).

20



25

**Figura 7: Efeito da administração por gavagem de CIDCA 133, probiótico, paraprobiótico e posbiótico no infiltrado inflamatório no íleo: Atividade de MPO (A) e EPO (B) no íleo de animais inflamados com 5-FU (300 mg/kg) (MUC, MRS, probiótico, paraprobiótico e posbiótico) ou salina 0,9% (CTL) por via intraperitoneal (n=6). Letras diferentes em A e B indicam diferença significativa por ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).**



#### 4.6 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 probiótico, paraprobiótico e posbótico foram capazes de prevenir o aumento da expressão gênica relativa das citocinas pro-inflamatórias (Tnf e Il12p40), e a diminuição desta expressão para a Il10

5 As expressões gênicas relativas das citocinas pro-inflamatórias (Tnf, Il1b, Il12p40 e Il6) e anti-inflamatória (Il10), foram mensuradas após 72 horas da administração do agente quimioterápico 5-FU. Análise da expressão relativa das citocinas pro-inflamatórias demonstram um aumento importante nos animais do grupo MUC: Il12p40 ( $2,38 \pm 0,67$ ), Il1b ( $2,84 \pm 0,70$ ), Tnf ( $3,77 \pm 0,97$ ) e Il6 ( $3,44 \pm 0,99$ ), ao contrário dos valores exibidos no grupo

10 CTL: Il12p40 ( $1,06 \pm 0,37$ ), Il1b ( $0,71 \pm 0,56$ ), Tnf ( $1,07 \pm 0,73$ ) e Il6 ( $0,68 \pm 0,19$ ) ( $p < 0,05$ ) (figura 7 A-E). O tratamento com o probiótico foi capaz de suprimir o aumento de: Il12p40 ( $0,90 \pm 0,48$ ), Tnf ( $0,81 \pm 0,61$ ) não diferindo significativamente do grupo CTL ( $p > 0,05$ ) (Figuras 7 A e C). No entanto, quando avaliada a expressão gênica relativa da Il6 ( $2,38 \pm 0,60$ ), o probiótico não foi capaz de diferir significativamente tanto com o grupo CTL ( $0,68 \pm 0,19$ ) quanto com o grupo MUC ( $3,44 \pm 0,9$ ) ( $p > 0,05$ ) (Figura 7 D). por outro lado, o tratamento com o paraprobiótico foi capaz de prevenir o aumento de: Il12p40 ( $0,48 \pm 0,24$ ), Il1b ( $1,38 \pm 0,75$ ) e Tnf ( $1,0 \pm 0,96$ ) com valores estatisticamente semelhantes ao grupo CTL ( $p > 0,05$ ).

Foi possível observar que os níveis da citocina anti-inflamatória Il10 diminuíram nos animais do grupo MUC ( $0,25 \pm 0,17$ ) e MRS ( $0,42 \pm 0,21$ ), após a administração do 5-FU, em

20 relação ao grupo CTL ( $1,58 \pm 0,40$ ) ( $p < 0,05$ ) (Figura 7 E). Os tratamentos com probiótico e paraprobiótico foram capazes prevenir a diminuição da expressão de Il10 ( $1,06 \pm 0,72$  e  $1,08 \pm 0,46$  respectivamente) (Figura 7 E).

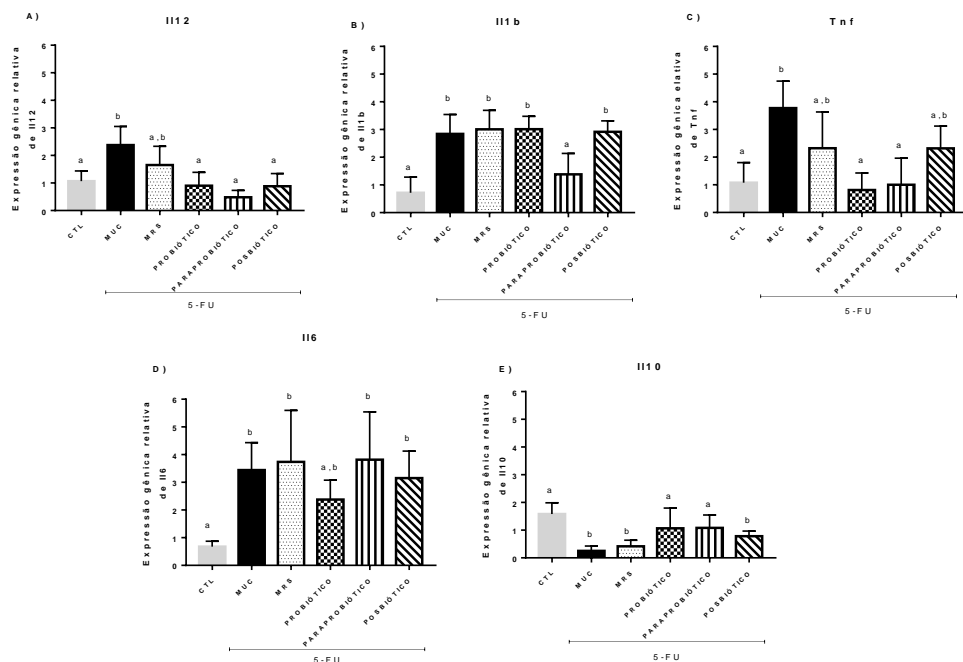
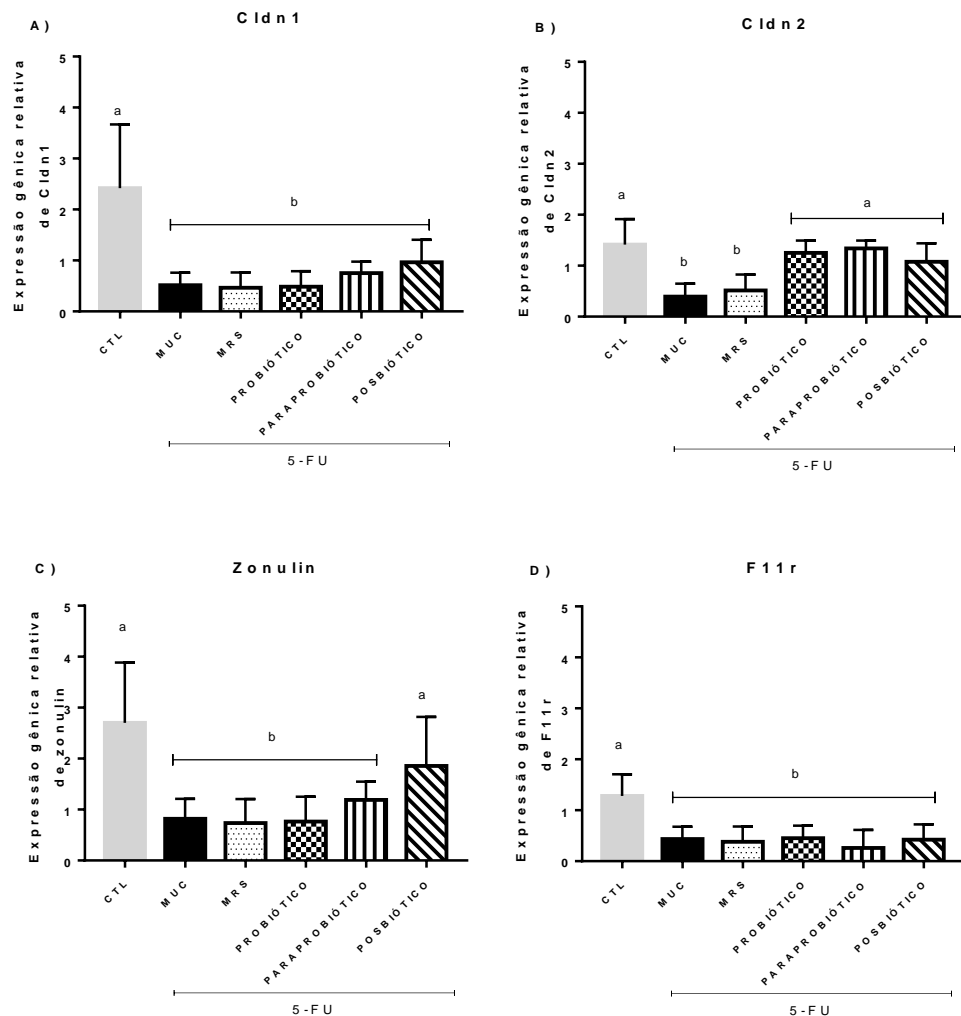


Figura 8: Efeito da administração por gavagem de CIDCA 133, probiótico, paraprobótico e posbótico nas expressões gênicas relativas dos genes Il12 (A), Il1b (B), Tnf (C), Il6 (D) e Il10 (E) no íleo dos animais, 72 horas após a administração de 5-FU. (n=6). Letras diferentes indicam diferença significativa por ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.7 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 probiótico, paraprobótico e posbótico não foram capazes de prevenir a diminuição da expressão gênica relativa dos genes codificadores das proteínas das junções firmes

Foram mensuradas as expressões gênicas relativas dos genes codificadores das proteínas das junções firmes (Cldn1, Cldn2, Zonulina e F11r). Os resultados demonstram que houve uma supressão gênica importante destas proteínas nos grupos MUC e MRS: Cld1 ( $0,51 \pm 0,24$  e  $0,46 \pm 0,29$ ) Cld2 ( $0,39 \pm 0,25$  e  $0,51 \pm 0,31$ ), Zonulina ( $0,81 \pm 0,39$  e  $0,73 \pm 0,46$ ) e F11r ( $0,41 \pm 0,20$  e  $0,38 \pm 0,30$ ), respectivamente, conforme esperado devido ao processo inflamatório gerado pelo fármaco, ao contrário dos valores exibidos no grupo CTL: Cld1 ( $2,41 \pm 1,25$ ), Cld2 ( $1,41 \pm 0,49$ ), Zonulina ( $2,70 \pm 1,81$ ) e F11r ( $1,28 \pm 0,42$ ) ( $p < 0,05$ ) (Figura 8 A-D). Os tratamentos com probiótico, paraprobótico e posbóticos ( $1,2 \pm 0,24$ ;  $1,33 \pm 0,15$  e  $1,07 \pm 0,36$ , respectivamente) foram capazes de prevenir a diminuição da expressão relativa de Cld2 (Figura 8 B) a níveis semelhantes ao do grupo CTL ( $1,41 \pm 0,49$ ) ( $p > 0,05$ ) (Figura 8 D).

Adicionalmente, o posbótico também foi capaz de prevenir a diminuição da expressão gênica de Zonulina ( $1,85 \pm 0,96$ ) com resultados semelhantes aos do grupo CTL ( $2,70 \pm 1,81$ ) ( $p > 0,05$ ) (Figura 8 C). Embora estes sejam resultados relevantes, nenhum dos tratamentos avaliados foi capaz de influenciar a expressão gênica relativa de Cld1 ( $0,48 \pm 0,30$  probiótico;  $0,75 \pm 0,22$  paraprobótico;  $0,96 \pm 0,44$  posbótico) e F11r ( $0,45 \pm 0,24$  probiótico;  $0,26 \pm 0,35$  paraprobótico e  $0,42 \pm 0,30$  posbótico) (Figuras 8 A e D).

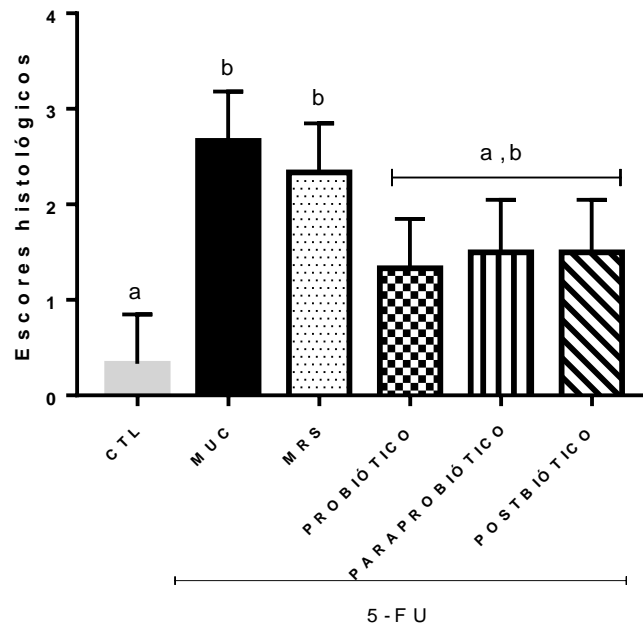


5 **Figura 9: Efeito da administração por gavagem de CIDCA 133, probiótico, paraprobiótico e posbiótico na análise da expressão gênica relativa dos genes codificadores das proteínas das junções firmes. Cld1 (A); Cld2 (B); Zonulina (C) e F11r (D). Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os grupos experimentais por ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) ( $n = 6$ ).**

#### 10 **4.8 Administração oral de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 paraprobiótico e posbiótico amenizou os parâmetros morfométricos da mucosite intestinal**

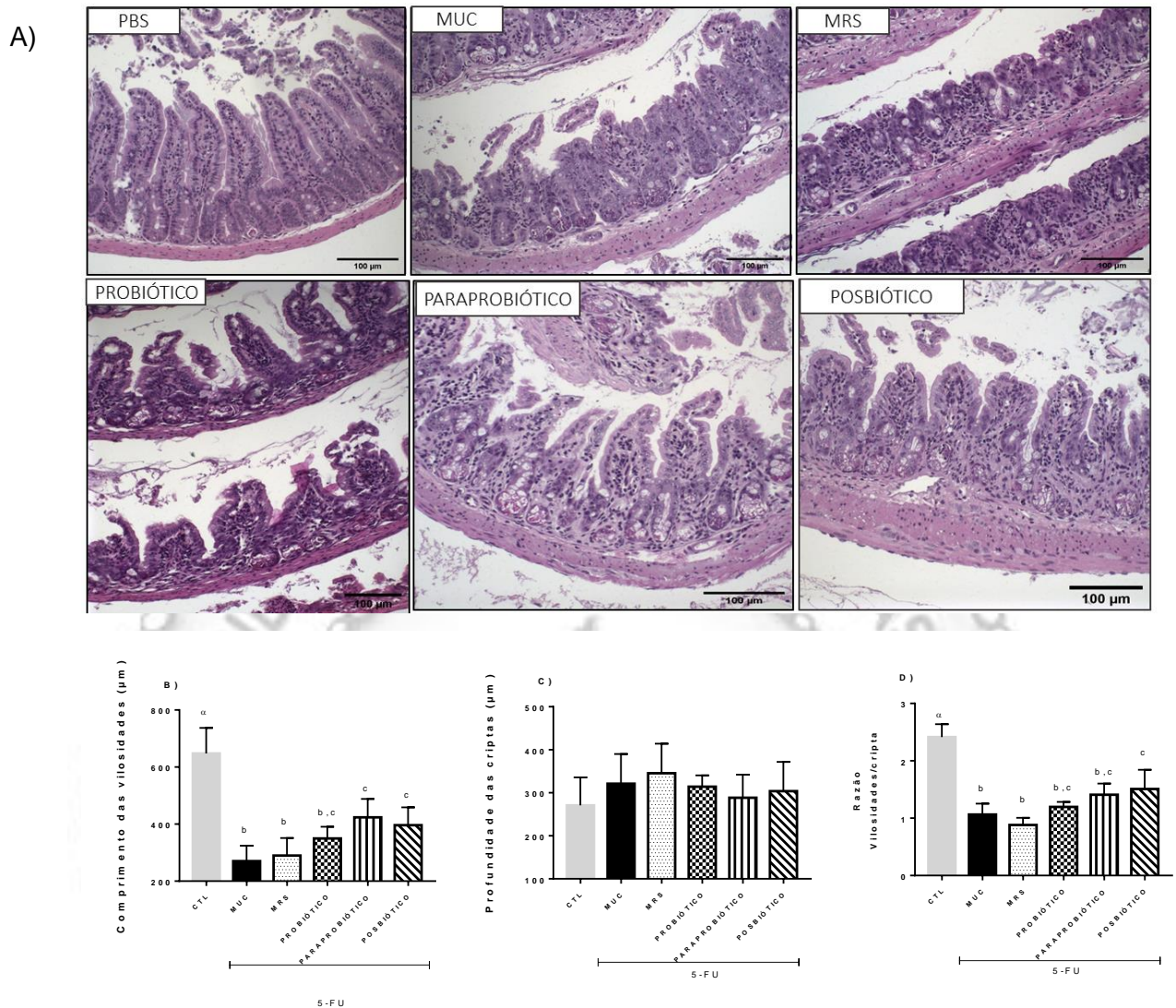
15 O grupo controle (CTL) apresentou escore histológico do íleo variando entre 0 e 1 ( $0,33 \pm 0,51$ ), indicando achados morfológicos normais, com um discreto infiltrado inflamatório em alguns animais (Figura 9). Os animais do grupo MUC ( $2,66 \pm 0,51$ ), que receberam apenas o 5-FU e o grupo que recebeu apenas com MRS ( $2,33 \pm 0,51$ ) (controles positivos) apresentaram graves lesões no íleo, com alteração da arquitetura da mucosa intestinal, apresentando escores histológicos variando entre 2 e 3, como esperado, devido à inflamação gerada pelo quimioterápico. Os tratamentos com probiótico ( $1,33 \pm 0,51$ ), paraprobiótico ( $1,51 \pm 0,54$ ) e posbiótico ( $1,51 \pm 0,54$ ) apresentaram escore histológico variando de 1 e 2, mas, mesmo

assim não sendo capazes de apresentar diferenças significativas tanto com o grupo CTL ( $0,33 \pm 0,51$ ) quanto do grupo MUC ( $2,66 \pm 0,51$ ) ( $p > 0,05$ ) (Figura 9).



**Figura 10: Efeito da administração por gavagem de CIDCA 133, probiótico, paraprobiótico e posbiótico no escore histológico de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.** Animais que receberam 5-FU (300 mg/kg) (MUC, MRS, probiótico, paraprobiótico e posbiótico) ou salina 0,9% (CTL) por via intraperitoneal (n=6). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de múltiplas comparações de Dunns ( $p < 0,05$ ) (n=6).

No que se refere à altura das vilosidades, os grupos tratados com paraprobiótico ( $423,7 \pm 64,7 \mu\text{m}$ ) e com o posbióticos ( $396,4 \pm 62,5 \mu\text{m}$ ) foram capazes de prevenir o dano profundo da arquitetura intestinal diferindo-se significativamente do grupo MUC ( $270,0 \pm 54,0 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,05$ ) (Figura 10 B). No entanto, apenas o grupo tratado com o posbiótico ( $1,508 \pm 0,33 \mu\text{m}$ ) foi capaz de aumentar a relação da altura das vilosidades/profundidade das criptas quando comparado ao grupo MUC ( $1,063 \pm 0,180 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,05$ ) (Figura 10 D). Quando avaliada a profundidade das criptas, todos os grupos apresentaram resultados semelhantes ( $p > 0,05$ ) CTL ( $207,00 \pm 65,08 \mu\text{m}$ ), MUC ( $321,00 \pm 69,10 \mu\text{m}$ ), MRS ( $345,00 \pm 68,64 \mu\text{m}$ ), probiótico ( $314,00 \pm 26,04 \mu\text{m}$ ), paraprobiótico ( $288,00 \pm 53,51$ ) e posbiótico ( $303,00 \pm 68,13 \mu\text{m}$ ) (Figura 10 C).



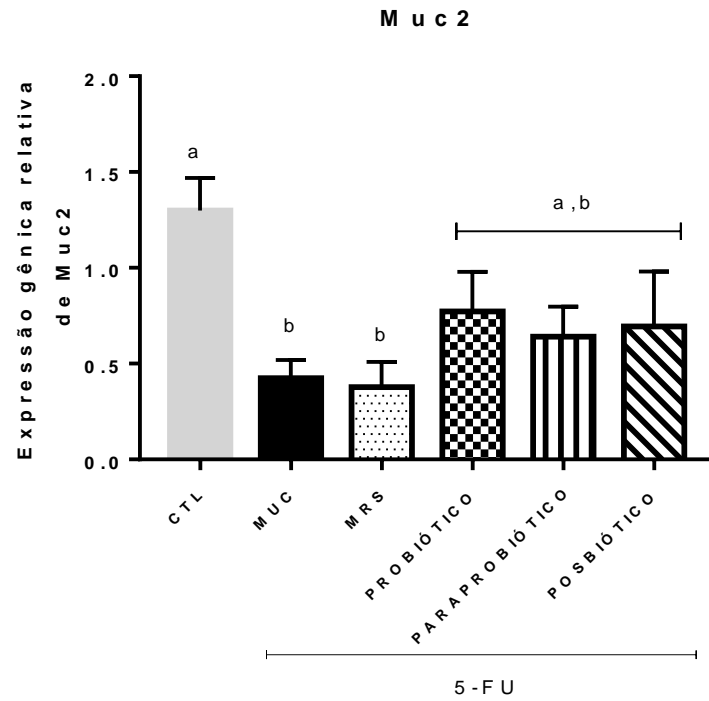
**Figura 10: Análises histológica e morfométrica do íleo dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados probiótico, paraprobiótico e posbiótico.** Achados histológicos (A) lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE) aumento de 20x, comprimento das vilosidades (B), profundidade das criptas (C) razão comprimento das vilosidades e profundidades das criptas (D). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de múltiplas comparações de Dunns ( $p < 0,05$ ) ( $n=6$ ).

5

10

15

A administração de 5-FU reduziu a expressão gênica relativa de Muc2 ( $0,42 \pm 0,09$ ), gene codificante da glicoproteína relacionada à secreção de mucina 2, um dos principais componentes do muco intestinal, produzidos pelas células caliciformes. Os grupos tratados com probiótico ( $0,77 \pm 0,20$ ), paraprobiótico ( $0,64 \pm 0,15$ ) e posbiótico ( $0,69 \pm 0,28$ ) não foram capazes de diferir significativamente tanto do grupo MUC ( $0,42 \pm 0,09$ ) quanto do grupo CTL ( $1,29 \pm 0,17$ ) ( $p > 0,05$ ) (Figura 11).



**Figura 11: Efeito da administração por gavagem de CIDCA 133, probiótico, paraprobótico e posbótico na expressão gênica relativa de Muc2.** Letras diferentes indicam diferença significativa pelos testes de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de múltiplas comparações de Dunns ( $p < 0,05$ ) ( $n=6$ ).

5

## 5. DISCUSSÃO

As terapias existentes para a mucosite intestinal são limitadas ao manejo clínico dos sintomas, não existindo medidas eficazes para seu controle e prevenção (Van Seville et al., 2015; Ribeiro et al., 2016; Yeung et al., 2020). Desse modo, a necessidade de alternativas terapêuticas para prevenir, amenizar ou até mesmo tratar os sintomas dos efeitos colaterais gerados por quimioterápicos, fica evidente, melhorando assim, a qualidade de vida dos pacientes oncológicos.

Este trabalho baseou-se nos relatos da literatura que demonstram que a administração dos bióticos (probióticos, paraprobióticos e posbióticos), tanto em estratégias de tratamento como de prevenção poderiam ser uma alternativa terapêutica à mucosite intestinal. Estudos prévios, *in vitro* (Kociubinski et al., 1996, 1999; Hugo et al., 2010; Rolny et al., 2016a), mostraram o potencial probiótico de CIDCA 133 o qual foi corroborado, *in vivo*, via administração do leite fermentado por esta linhagem em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU (De Jesus et al., 2019).

Contudo, sabe-se que nem todos os benefícios clínicos estão diretamente relacionados à viabilidade das bactérias. Desta forma, o sobrenadante dos probióticos, como também a inativação dos mesmos, seja por calor (Matsuzaki and Chin, 2000; Kamilya et al., 2015), por radiação (Kamiya, 2006), ou por sonicação (Shin et al., 2010) tem demonstrado ser capazes de realizar funções benéficas semelhantes, ou até superiores à da sua forma viável. Estas versões apresentam menos risco a saúde, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos (Prisciandaro et al., 2011a; Taverniti and Guglielmetti, 2011; Aguilar-Toalá et al., 2018).

Deste modo, objetivou-se investigar, além da forma probiótica desta bactéria, as formas paraprobiótica e posbiótica em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU, enfatizando a inexistência na literatura, de estudos *in vivo* com esta abordagem, utilizando-se a linhagem *L. delbrueckii* CIDCA 133.

Na fase ulcerativa da doença, a diminuição do apetite, que influencia na perda de peso corpóreo (Sonis, 2004a; De Jesus et al., 2019; Gan et al., 2020), torna-se relevante para avaliação do estado geral dos pacientes. Nossos resultados mostraram que camundongos Balb/c após a indução da mucosite, apresentaram diminuições significativas do consumo hídrico, alimentar e, conseqüentemente, perda de peso corpóreo e, os três tratamentos propostos no presente estudo não diminuíram essa perda de peso dos animais, e não promoveram a melhora do apetite. De maneira semelhante, De Jesus et al. (2019), observaram perda de peso significativa em animais com mucosite intestinal, e o leite fermentado por CIDCA 133 também não foi capaz de modificar a ingestão de leite e alimento nos animais. No entanto, o tratamento foi capaz de prevenir a perda de peso corporal, e de acordo com os relatos dos autores, esse efeito foi devido a capacidade probiótica dessa

bactéria sobre comprimento do intestino, correlacionando-o a uma maior absorção de nutrientes (De Jesus et al., 2019). Da mesma forma, corroborando com nossos achados, *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 ( $10^9$  UFC/ mL) enriquecida com selênio não promoveu a diminuição da perda de peso, e nem a melhora no consumo hídrico e alimentar dos animais com mucosite intestinal (Porto et al., 2019), diferentemente do observado no trabalho de Justino et al. (2014), onde o probiótico *Saccharomyces boulardii* em doses maiores ( $10^{10}$  UFC/Kg) foi capaz de reverter a perda de peso em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Da mesma forma o sobrenadante de *Escherichia coli* Nissle 1917 *Lactobacillus fermentum* (*Limosilactobacillus fermentum*) BR11 também não influenciaram a perda de peso e o consumo alimentar, nos animais com mucosite intestinal (Prisciandaro et al., 2011b).

Diante do processo inflamatório desencadeado pela doença, o recrutamento de neutrófilos torna-se importante de forma a combater possíveis infecções, por meio da liberação da enzima MPO (Kolaczowska e Kubes, 2013), como também de eosinófilos, os quais potencializam reações inflamatórias no local da inflamação por meio de liberação de um arsenal de mediadores químicos (citocinas), tais como, interleucina (IL12, IL4, IL5 e IL10 (Lampinen et al., 2004; Rothenberg e Hogan, 2006; Vieira et al., 2009; Woodruff et al., 2011). Diante disto, as atividades enzimáticas destas duas enzimas (MPO e EPO), utilizadas como marcadores bioquímicos, permitem avaliar de forma indireta o recrutamento destes leucócitos.

No presente estudo, ambos os indicadores foram avaliados, e os resultados sugerem que após a indução da mucosite houve um aumento importante no infiltrado de eosinófilos e neutrófilos no íleo dos animais em relação ao grupo saudável. No entanto, o aumento da atividade enzimática, de ambos os marcadores bioquímicos, foi prevenido após administração de CIDCA 133 probiótico e esses achados são consistentes com os obtidos por De Jesus et al. (2019). Em contrapartida, CIDCA 133 paraprobótico e posbótico somente foram capazes de prevenir o recrutamento dos neutrófilos. Esses resultados são consistentes com outros trabalhos, que de maneira semelhante, observaram efeitos benéficos de diferentes linhagens de microrganismos como, *S. boulardii* (Justino et al., 2014), *Bifidobacterium bifidum* G9-1 (Kato et al., 2017) e o sobrenadante de *E. coli* Nissle 1917 (Prisciandaro et al., 2011a) e *L. fermentum* (Smith et al., 2008) na diminuição do infiltrado inflamatório.

Nossos resultados, comparados com os estudos relatados acima, sugerem que a ação de CIDCA 133 na redução do infiltrado inflamatório pode estar relacionada com a capacidade deste probiótico em reduzir o recrutamento de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que gera uma diminuição tanto do dano tecidual quanto da migração de neutrófilos para o local afetado, reduzindo assim a gravidade geral da mucosite (Sonis et al., 2004). Verificou-se que essa mesma propriedade é mantida após a inativação da linhagem bem como no seu



sobrenadante. No entanto, não foi possível obter resultados semelhantes no que concerne ao recrutamento de eosinófilos.

Ainda que a presença de eosinófilos esteja relacionada com a piora do prognóstico da mucosite (Lampinen et al., 2004), alguns estudos indicam que os eosinófilos são componentes  
5 proeminentes da mucosa gastrointestinal na homeostase, e mediante a estímulos inflamatórios agudos, como a mucosite, eles podem ser capazes de interagir com bactérias exógenas, como os probióticos ou seus componentes, de forma a contribuir com a resolução de uma inflamação gastrointestinal local (Nussbaum et al., 2013; Rosenberg et al., 2016).

Diante disso, sugerimos que esse resultado ocorre devido mecanismo de ação  
10 diferentes no controle da inflamação, na qual, CIDCA 133 probiótico pode atuar na prevenção do aumento da expressão da eotaxina na mucosa intestinal, o que conseqüentemente leva uma diminuição no recrutamento de eosinófilos melhorando o prognóstico da doença (Rankin et al., 2000), sendo necessários outros experimentos para confirmação desta hipótese. Por outro lado, seus componentes paraprobiótico e posbiótico interagem com os eosinófilos, de  
15 forma a aumentar seu recrutamento para resolver a inflamação local, essa hipótese corrobora com o estudo desenvolvido por Kvarnhammar et al.(2011), os autores mostraram, que eosinófilos humanos podem ser ativados diretamente, através dos antagonistas NOD 1 e NOD 2 que são receptores citoplasmáticos para fragmentos peptidoglicanos bacterianos (Kvarnhammar et al., 2011).

Por outro lado, confirmando a hipótese de mecanismo de ação diferentes entre células  
20 viáveis, inativadas e seus componentes, Lopez et al. (2008), ao avaliaram a linhagem probiótica *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) viva e inativada por ultravioleta (UV) na diminuição da produção de interleucina 8 (Il8) em células Caco-2. Observaram que LGG vivo e inativado foram igualmente eficazes na modulação da resposta inflamatória diminuindo Il8,  
25 por meio da inibição da translocação da proteína do fator nuclear de NF-Kb. No entanto, essa modulação seguiu mecanismos diferentes, LGG inativado diminuiu a produção de Il8 através da inibição da expressão gênica do inibidor ubiquitinado-kB (Ub-IkB), ao contrário de LGG vivo que também diminui Il8 sem alterar os níveis de expressão gênica deste inibidor (Lopez et al., 2008).

A exposição a fármacos antineoplásicos, como o 5-FU, causa danos diretos ao DNA  
30 celular, o que gera lesão celular e morte epitelial e, conseqüentemente, aumenta ROS (Sonis, 2004b; Logan et al., 2007), sendo que o maior dano tecidual envolve a estimulação de macrófagos, produzindo uma cascata de eventos inflamatórios como a ativação do fator de transcrição NF-kB , favorecendo a expressão gênica de Il1b (Dinarello, 2011), como também  
35 das sínteses das citocinas pro-inflamatórias, Tnf, Il6 e Il12. Citocinas responsáveis pelas várias fases da mucosite intestinal e sua regulação positiva causa lesões na mucosa provocando danos adicionais aos tecidos (Sonis, 2004b; Logan et al., 2007).

Neste estudo, após 72 horas da indução da mucosite observou-se aumento importante na expressão gênica relativa das citocinas pro-inflamatórias Il1b, Il6, Il12 e Tnf. Nossos achados são consistentes com os estudos conduzidos por Chang et al. (2018) e Barroso et al. (2021) que também demonstraram aumento importante destas citocinas na mucosite intestinal induzida pelo uso de quimioterápico 5-FU. O aumento destas moléculas, na mucosa, ocorre devido à promoção da apoptose (Sonis, 2004b; Logan et al., 2008). Assim, este estímulo precoce leva à atrofia do epitélio, fazendo com que os pacientes desenvolvam os sintomas característicos da mucosite intestinal (Sonis, 2004b; Soares et al., 2008; Yeung et al., 2015). Os três tratamentos avaliados (probiótico, paraprobiótico e postbiótico) foram capazes de prevenir o aumento tanto de Il12 como de Tnf, o que torna estes tratamentos condizentes com a atividade anti-inflamatória descrita deste probiótico. A citocina Tnf, em altas concentrações, pode gerar danos no epitélio e, conseqüentemente, prejudicar a função da barreira epitelial ao alterar a estrutura e a função das proteínas das junções firmes aumentando, assim, a permeabilidade intestinal, possibilitando a passagem de bactérias patogênicas do lúmen intestinal ao organismo hospedeiro (Schmitz et al., 1999; Turner, 2006). Bem como, a citocina Il12 é um fator patogênico crítico na inflamação intestinal (Eftychi et al., 2019).

Em contrapartida, apenas CIDCA 133 inativada por calor conseguiu impedir o aumento de Il1b, com níveis semelhantes aos dos animais não inflamados. A importância desse achado se deve ao papel significativo de Il1b na função da barreira intestinal, através do aumento da permeabilidade, regulando negativamente a expressão gênica das proteínas das junções firmes (Al-Sadi e Ma, 2007; Kanarek et al., 2014)

Assim, os importantes achados neste trabalho, no que refere a diminuição da expressão gênica de Tnf e Il12, nos três tratamentos, somado à diminuição da expressão da citocina pro-inflamatória Il1b por parte do paraprobiótico sustentam o benefício, além da segurança que os paraprobióticos e posbiótico oferecem ao hospedeiro. Estes achados apoiam o relatado por De Marco et al. (2018) no seu estudo *in vitro* utilizando células epiteliais do intestino humano e macrófagos estimulados com LPS para avaliar o potencial anti-inflamatório dos metabolitos de determinadas cepas probióticas. No referido trabalho mostrou-se que os metabolitos de e *Lactocaseibacillus casei* (*Lactobacillus casei*) foram capazes de regular negativamente a secreção de Tnf e impedir a ativação de Il1b induzida por LPS (De Marco et al., 2018). Do mesmo modo que os probióticos *Lactocaseibacillus casei* (*Lactobacillus casei* variedade *ramnosus*), associada com *Bifidobacterium bifidum* e *S. boulardii* foram capazes de reduzir a expressão gênica relativa de Il1b e Tnf em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU (Yeung et al., 2015; Porto et al., 2019).

Outra citocina de destaque no processo inflamatório é a Il10, que apresenta ação imunorreguladora sendo responsável por manter a homeostase do intestino, bem como,

contribuir para a diminuição da intensidade da resposta inflamatória, ao regular negativamente a produção de citocinas pro-inflamatórias no local do dano tecidual (Rubtsov et al., 2008). Estudos mostram que Il10 também é capaz de atenuar a expressão gênica de Tnf (Clarke et al., 1998). Dada a importância desta citocina no processo inflamatório, nosso estudo revelou que os tratamentos com probiótico e paraprobiótico, foram capazes de aumentar a expressão gênica relativa de Il10.

O epitélio intestinal atua como uma barreira seletiva entre o ambiente externo e o interno e as proteínas das junções firmes atuam como guardiões desta barreira epitelial, uma vez que impedem a passagem de substâncias nociva. Dentre essas proteínas destacam-se a Zonulina, Claudina, Ocludina e F11r (Song et al., 2013; Otani et al., 2019). A expressão das proteínas das junções firmes (cldn1, cldn2, zonulina e F11r) estudadas neste trabalho mostraram significativa diminuição nos animais que receberam 5-FU e esses achados corroboram com o estudo conduzido por Barroso et al. (2021) que também observaram diminuição significativa na expressão gênica relativa das mesmas proteínas, revelando assim, a importância das mesmas na manutenção de barreira epitelial. O 5-FU pode aumentar a permeabilidade da barreira epitelial por meio da regulação negativa das proteínas das junções firmes. Assim, o aumento da expressão gênica de Cldn2 observada nos três tratamentos propostos, somado ao aumento da expressão gênica de zonulina pela ação dos probióticos, são achados promissores para uma possível redução da permeabilidade intestinal gerada pela mucosite. Embora estes achados se apresentem como satisfatórios, talvez a dose administrada nesse experimento ( $10^9$  UFC/mL) não tenha sido suficiente para evitar o aumento desse parâmetro, sendo necessários mais estudos envolvendo a permeabilidade intestinal para explorar os resultados encontrados.

Como consequência das alterações inflamatórias induzidas pelo quimioterápico, na fase de ulceração, também ocorrem alterações morfológicas, extensamente documentadas, na arquitetura do epitélio (Sonis, 2004b; Carvalho et al., 2017a; De Jesus et al., 2019; Porto et al., 2019). Os resultados das análises morfométricas realizadas no íleo dos animais reforçam os resultados encontrados pelos métodos qualitativos. O grupo que recebeu 5-FU (*i.p.*) gavados com solução salina, como também o grupo controle que recebeu meio MRS (ambos controles positivos), apresentaram perda grave da arquitetura da mucosa ileal, evidenciando, assim a inflamação intestinal dos animais. Desse modo, a suplementação do probiótico, paraprobiótico e posbiótico conseguiu reduzir parcialmente o escore histológico, demonstrando potencial na preservação da arquitetura epitelial. Além destes benefícios o paraprobiótico e posbiótico mostraram-se capazes de prevenir a redução do tamanho das vilosidades de forma mais eficaz do que o probiótico. Esses achados corroboram com o estudo conduzido por Prisciandaro et al., (2011b), que demonstraram que o sobrenadante de *E. coli* Nissle 1917 e *L. fermentum* BR11 foram capazes de reduzir o escore histológico da

mucosite e melhorar a morfologia intestinal (Prisciandaro et al., 2011b), destacando, mais uma vez, o efeito benéfico sobre a inflamação não só do probiótico como também dos para e postbióticos.

Outro efeito observado na mucosite intestinal é redução da expressão gênica de Muc 2, responsável pela produção de mucina 2. As mucinas são secretadas pelas células caliciformes que criam uma camada de muco que protege o epitélio contra a penetração de bactérias. A mucina 2 é considerada o principal componente do muco intestinal, assim quanto maior número dessas células, maior a proteção epitelial (Oh et al., 2017b; Li et al., 2018). No presente estudo, a suplementação com o probiótico, paraprobótico e o posbiótico de CIDCA133, não diferiu significativamente do grupo saudável e do grupo doente quanto a este parâmetro, visto que, seus níveis expressos não foram suficientes para gerar uma resposta significativamente distinta entre os grupos experimentais. Em outros estudos, como Barroso et al. (2021), foi observada que após administração do 5-FU, uma redução acentuada da produção de mucina, e a linhagem recombinante de CIDCA 133 (pExu: *hsp65*) foi capaz de aumentar a expressão gênica relativa de Muc 2. Do mesmo modo, extrato de folha de amora fermentado pelo probiótico *Lactobacillus acidophilus* A4 regulou positivamente a expressão gênica de muc2 a valores semelhantes ao grupo saudável em ratos com mucosite intestinal induzida por 5-FU (Oh et al., 2017b).

De acordo com dados literários, além dos danos estruturais ao epitélio, o tratamento com o quimioterápico tem efeito negativo na composição da microbiota intestinal, que está diretamente relacionado com o desenvolvimento e a gravidade da mucosite, devido a capacidade de certos microrganismos em liberar metabólitos tóxicos ativos presentes no quimioterápico exacerbando a lesão tecidual (Stringer et al., 2009). Apesar disso, a presença de bactérias comensais residentes podem oferecer proteção ao indivíduo contra o desenvolvimento da inflamação, através da atuação sobre: i) influenciando no processo inflamatórios e modulando o estresse oxidativo, ii) influenciando na permeabilidade intestinal, (iii) influenciando na camada de muco, na resistência a estímulos nocivos e no reparo tecidual (van Vliet et al., 2010). A capacidade dos probióticos e seus componentes secretados em modular a microbiota intestinal vêm ganhando destaque como um promissor tratamento para a mucosite intestinal.

Segundo Stringer et al., (2009) a diarreia induzida pelo quimioterápico irinotecano pode estar associada a presença de algumas bactérias, em especial *E-coli* produtora de  $\beta$ -glucuronidase que desempenha um papel essencial a toxicidade intestinal do fármaco (Stringer et al., 2009). Por outro lado, as linhagens probióticas *Bifidobacterium bifidum* G9-1 (BBG9-1) e *Lactocaseibacillus casei* (*Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*) foram capazes de modular a microbiota intestinal em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU (diminuindo o filo firmicutes e aumentando bacteroidetes) (Kato et al., 2017; Chang et

al., 2018b). Baseados nesses achados e outros da literatura, os probióticos mostram capacidade de modular a microbiota desequilibrada, aumentando a população de bactérias benéficas, regulando a função de barreira do epitélio intestinal, exercer efeitos imunomodulatórios e anti-inflamatórios através da inibição de produção de citocinas por regulação negativa da via NF-kB (van Vliet et al., 2010; Azad et al., 2018).

Desse modo, baseados em dados da literatura, sugerimos que os efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios de CIDCA 133 viável, inativada e seu sobrenadante, observados neste estudo, pode ser devido a interação de componente secretados com as células epiteliais intestinais, modulando o sistema imunológico através da regulação negativa da via de transcrição NK-kB inibindo a expressão gênica de diversos genes responsáveis pelo início da lesão da mucosa, tais como, citocinas pro-inflamatórias (Tnf, Il12 e Il1b) e aumentando a anti-inflamatória Il10, e modulando a microbiota intestinal (Sonis, 2004b), é de conhecimento científico que as bactérias viáveis e seus componentes são capazes de regular a produção de citocinas pro-inflamatórias através da modulação da microbiota (Kim et al., 2007; van Vliet et al., 2010; Azad et al., 2018).

Mediante as informações apresentadas, observamos que os três tratamentos propostos neste estudo foram capazes de melhorar alguns parâmetros da mucosite intestinal induzida pelo 5-FU. Acredita-se que os resultados diferentes dos tratamentos encontrados, pode ser explicado pelo fato da existência de diferenças no mecanismo de ação e na via de sinalização quando diferentes resultados são produzidos por células viáveis e inativadas e, do mesmo modo, quando ambas as células (viáveis e mortas) apresentam o mesmo resultado, podendo ser devido à existência de mecanismos de ação subjacentes diferentes (Lopez et al., 2008; Taverniti and Guglielmetti, 2011), em alternativa, o tratamento térmico também pode ser eficaz para aumentar a atividade imunomoduladora de CIDCA 133, conforme já relatado em estudos envolvendo paraprobióticos (FUJIKI et al., 2012).

A adesão às células da mucosa intestinal é o primeiro mecanismo que as bactérias probióticas utilizam para modular o sistema imunológico, o epitélio intestinal é conhecido por ter diversas adequações protetoras especializadas, como as junções firmes, que dificulta o contato direto de bactérias as células epiteliais (Nagler-Anderson, 2001), Desse modo, sugerimos que CIDCA 133 inativada, e suas proteínas secretadas tem mais facilidade em passar por essa camada protetora de muco estimulando as células epiteliais mais diretamente, com isso há uma redução do processo inflamatório e estresse oxidativo, ocasionando uma redução da permeabilidade intestinal através da regulação das proteínas das junções firmes, desse modo, prevenindo o dano tecidual, exercendo os efeitos protetores mais eficientes no encurtamento das vilosidades conforme relatados neste estudo. Contudo, é necessário a condução de novos estudos avaliando a alteração da microbiota com intuito

de confirma a capacidade de modulação de CIDCA, e compreender os mecanismos de ações dos paraprobóticos e posbiótico na mucosite intestinal.

5

10

15

20

25

30



## 6. CONCLUSÃO

A administração de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 probiótico, paraprobiótico e posbiótico são capazes de preservar parcialmente os danos causados à mucosa intestinal em decorrência do uso do quimioterápico 5-FU. Ainda assim, o paraprobiótico exerceu um efeito protetor melhor na mucosite intestinal, o que apresenta diversas vantagens em relação aos microrganismos vivos, principalmente no quesito segurança, posicionando-se como uma estratégia terapêutica promissora para a proteção do epitélio e a homeostase intestinal, podendo atender diversos tipos de pacientes, principalmente os imunocomprometidos.



## 7. PERSPECTIVA

Sugere-se a condução de novos estudos, tais como:

- Estudo da secreção de metabólitos e proteínas de superfícies do paraprobiótico, para elucidar a presença de compostos que possam estar relacionados com alguns dos efeitos observados no presente trabalho.
- Coloração PAS para quantificar muco e células caliciformes.
- Microbiota dependente de cultivo para quantificar Bactérias do ácido lácticos (BAL) e enterobactérias.
- Expressão gênica relativa das quimiocinas CXCL1 e Eoxatina.
- IgA intestinal.





## 8. REFERÊNCIA

- 5 Aguilár-Toalá, J. E., García-Varela, R., García, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., et al. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends Food Sci. Technol.* 75, 105–114. doi:10.1016/j.tifs.2018.03.009.
- 10 Al-Sadi, R. M., and Ma, T. Y. (2007). IL-1 $\beta$  Causes an Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability. *J. Immunol.* 178, 4641–4649. doi:10.4049/jimmunol.178.7.4641.
- 10 Azad, M. A. K., Sarker, M., and Wan, D. (2018). Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles. *Biomed Res. Int.* 2018, 8063647. doi:10.1155/2018/8063647.
- 15 Barroso, F. A. L., de Jesus, L. C. L., de Castro, C. P., Batista, V. L., Ferreira, Ê., Fernandes, R. S., et al. (2021). Intake of *Lactobacillus delbrueckii* (pExu:hsp65) Prevents the Inflammation and the Disorganization of the Intestinal Mucosa in a Mouse Model of Mucositis. *Microorganisms* 9, 107. doi:10.3390/microorganisms9010107.
- 20 Carvalho, R. D., Breyner, N., Menezes-Garcia, Z., Rodrigues, N. M., Lemos, L., Maioli, T. U., et al. (2017a). Secretion of biologically active pancreatitis-associated protein I (PAP) by genetically modified dairy *Lactococcus lactis* NZ9000 in the prevention of intestinal mucositis. *Microb. Cell Fact.* 16, 27. doi:10.1186/s12934-017-0624-x.
- 25 Carvalho, R. D. D. O., do Carmo, F. L. R., Junior, A. de O., Langella, P., Chatel, J. M., Bermúdez-Humarán, L. G., et al. (2017b). Use of wild type or recombinant lactic acid bacteria as an alternative treatment for gastrointestinal inflammatory diseases: A focus on inflammatory bowel diseases and mucositis. *Front. Microbiol.* 8, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2017.00800.
- Cassidy, S., and Syed, B. A. (2017). Colorectal cancer drugs market. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 525–526. doi:10.1038/nrd.2017.59.
- 30 Chang, C.-W., Liu, C.-Y., Lee, H.-C., Huang, Y.-H., Li, L.-H., Chiau, J.-S. C., et al. (2018a). *Lactobacillus casei* Variety rhamnosus Probiotic Preventively Attenuates 5-Fluorouracil/Oxaliplatin-Induced Intestinal Injury in a Syngeneic Colorectal Cancer Model. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.00983.
- 35 Chang, C. W., Liu, C. Y., Lee, H. C., Huang, Y. H., Li, L. H., Chiau, J. S. C., et al. (2018b). *Lactobacillus casei* Variety rhamnosus Probiotic Preventively Attenuates 5-Fluorouracil/Oxaliplatin-Induced Intestinal Injury in a Syngeneic Colorectal Cancer Model. *Front. Microbiol.* 9, 983. doi:10.3389/fmicb.2018.00983.
- 40 Clarke, C. J., Hales, A., Hunt, A., and Foxwell, B. M. (1998). IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity. *Eur. J. Immunol.* 28, 1719–26. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199805)28:05<1719::AID-IMMU1719>3.0.CO;2-Q.
- 45 Cuevas-González, P. F., Liceaga, A. M., and Aguilár-Toalá, J. E. (2020). Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Res. Int.* 136, 109502. doi:10.1016/j.foodres.2020.109502.
- 50 De Jesus, L. C. L., Drumond, M. M., de Carvalho, A., Santos, S. S., Martins, F. S., Ferreira, Ê., et al. (2019). Protective effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* CIDCA 133 in a model of 5 Fluorouracil-Induced intestinal mucositis. *J. Funct. Foods* 53, 197–207. doi:10.1016/j.jff.2018.12.027.

De Marco, S., Sichetti, M., Muradyan, D., Piccioni, M., Traina, G., Pagiotti, R., et al. (2018). Probiotic Cell-Free Supernatants Exhibited Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity on Human Gut Epithelial Cells and Macrophages Stimulated with LPS. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2018, 1–12. doi:10.1155/2018/1756308.

5

Dinarello, C. A. (2011). A clinical perspective of IL-1 $\beta$  as the gatekeeper of inflammation. *Eur. J. Immunol.* 41, 1203–1217. doi:10.1002/eji.201141550.

10

Eftychi, C., Schwarzer, R., Vlantis, K., Wachsmuth, L., Basic, M., Wagle, P., et al. (2019). Temporally Distinct Functions of the Cytokines IL-12 and IL-23 Drive Chronic Colon Inflammation in Response to Intestinal Barrier Impairment. *Immunity* 51, 367–380.e4. doi:10.1016/j.immuni.2019.06.008.

15

Ferraris, R. P., and Vinnakota, R. R. (1995). The Time Course of Adaptation of Intestinal Nutrient Uptake in Mice Is Independent of Age. *J. Nutr.* 125, 2172–2182. doi:10.1093/jn/125.8.2172.

20

FUJIKI, T., HIROSE, Y., YAMAMOTO, Y., and MUROSAKI, S. (2012). Enhanced Immunomodulatory Activity and Stability in Simulated Digestive Juices of *Lactobacillus plantarum* L-137 by Heat Treatment. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 918–922. doi:10.1271/bbb.110919.

25

Gan, Y., Ai, G., Wu, J., Luo, H., Chen, L., Huang, Q., et al. (2020). Patchouli oil ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats via protecting intestinal barrier and regulating water transport. *J. Ethnopharmacol.* 250, 112519. doi:10.1016/j.jep.2019.112519.

30

Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., and Mathieu, C. (2001). An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods* 25, 386–401. doi:10.1006/meth.2001.1261.

35

Guichard, N., Guillaume, D., Bonnabry, P., and Fleury-Souverain, S. (2017). Antineoplastic drugs and their analysis: a state of the art review. *Analyst* 142, 2273–2321. doi:10.1039/c7an00367f.

40

Hemarajata, P., and Versalovic, J. (2013a). Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 6, 39–51. doi:10.1177/1756283X12459294.

Hemarajata, P., and Versalovic, J. (2013b). Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 6, 39–51. doi:10.1177/1756283X12459294.

45

Hugo, A. A., De Antoni, G. L., and Pérez, P. F. (2010). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (strain CIDCA 133) resists the antimicrobial activity triggered by molecules derived from enterocyte-like Caco-2 cells. *Let. Appl. Microbiol.* 50, 335–340. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02796.x.

50

Hugo, A. A., Kakisu, E., De Antoni, G. L., and Pérez, P. F. (2008). *Lactobacilli* antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. *Let. Appl. Microbiol.* 46, 613–619. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02363.x.

55

Hugo, A. A., Rolny, I. S., Romanin, D., and Pérez, P. F. (2017). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (strain CIDCA 133) stimulates murine macrophages infected with *Citrobacter rodentium*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 0. doi:10.1007/s11274-017-2219-4.

IARC (2020). *World cancer report 2020*. Available at: <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>.

- 5 Justino, P. F. C., Melo, L. F. M., Nogueira, A. F., Costa, J. V. G., Silva, L. M. N., Santos, C. M., et al. (2014). Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Br. J. Nutr.* 111, 1611–1621. doi:10.1017/S0007114513004248.
- 10 Justino, P. F. C., Melo, L. F. M., Nogueira, A. F., Morais, C. M., Mendes, W. O., Franco, A. X., et al. (2015). Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 75, 559–567. doi:10.1007/s00280-014-2663-x.
- 15 Kamilya, D., Baruah, A., Sangma, T., Chowdhury, S., and Pal, P. (2015). Inactivated Probiotic Bacteria Stimulate Cellular Immune Responses of Catla, *Catla catla* (Hamilton) In Vitro. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 7, 101–106. doi:10.1007/s12602-015-9191-9.
- 20 Kamiya, T. (2006). Inhibitory effects of *Lactobacillus reuteri* on visceral pain induced by colorectal distension in Sprague-Dawley rats. *Gut* 55, 191–196. doi:10.1136/gut.2005.070987.
- 25 Kanarek, N., Grivennikov, S. I., Leshets, M., Lasry, A., Alkalay, I., Horwitz, E., et al. (2014). Critical role for IL-1 $\beta$  in DNA damage-induced mucositis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E702–E711. doi:10.1073/pnas.1322691111.
- 30 Kato, S., Hamouda, N., Kano, Y., Oikawa, Y., Tanaka, Y., Matsumoto, K., et al. (2017). Probiotic *Bifidobacterium bifidum* G9-1 attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice via suppression of dysbiosis-related secondary inflammatory responses. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 44, 1017–1025. doi:10.1111/1440-1681.12792.
- 35 Kim, D. W., Cho, S. B., Yun, C. H., Jeong, H. Y., Chung, W. T., Choi, C. W., et al. (2007). Induction of cytokines and nitric oxide in murine macrophages stimulated with enzymatically digested lactobacillus strains. *J. Microbiol.* 45, 373–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17978795>.
- 40 Kim, H. J., Kim, J. H., Moon, W., Park, J., Park, S. J., Song, G. A., et al. (2015). Rebamipide Attenuates 5-Fluorouracil-Induced Small Intestinal Mucositis in a Mouse Model. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 179–183. doi:10.1248/bpb.b14-00400.
- 45 Kim, S., Chun, H., Choi, H., Kim, E., Keum, B., Seo, Y., et al. (2018). Ursodeoxycholic acid attenuates 5-fluorouracil-induced mucositis in a rat model. *Oncol. Lett.* doi:10.3892/ol.2018.8893.
- 50 KOCIUBINSKI, G. L., PÉREZ, P. F., AÑÓN, M. C., and DE ANTONI, G. L. (1996). A Method of Screening for Highly Inhibitory Lactic Acid Bacteria. *J. Food Prot.* 59, 739–745. doi:10.4315/0362-028X-59.7.739.
- KOCIUBINSKI, G., PÉREZ, P., and DE ANTONI, G. (1999). Screening of Bile Resistance and Bile Precipitation in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *J. Food Prot.* 62, 905–912. doi:10.4315/0362-028X-62.8.905.
- 55 Kolaczowska, E., and Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 159–175. doi:10.1038/nri3399.

- Kvarnhammar, A. M., Petterson, T., and Cardell, L.-O. (2011). NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in human eosinophils: activation by NOD1 and NOD2 agonists. *Immunology* 134, 314–325. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03492.x.
- 5 Lampinen, M., Carlson, M., Hakansson, L. D., and Venge, P. (2004). Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* 59, 793–805. doi:10.1111/j.1398-9995.2004.00469.x.
- 10 Li, C., Zuo, D., Yin, L., Lin, Y., Li, C., Liu, T., et al. (2018). Prognostic Value of MUC2 Expression in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2018, 1–12. doi:10.1155/2018/6986870.
- 15 Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- 20 Logan, R. M., Gibson, R. J., Sonis, S. T., and Keefe, D. M. K. (2007). Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. *Oral Oncol.* 43, 395–401. doi:10.1016/j.oraloncology.2006.04.011.
- Logan, R. M., Stringer, A. M., Bowen, J. M., Gibson, R. J., Sonis, S. T., and Keefe, D. M. K. (2008). Serum levels of NF $\kappa$ B and pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. *Cancer Biol. Ther.* 7, 1139–1145. doi:10.4161/cbt.7.7.6207.
- 25 Longley, D. B., Harkin, D. P., and Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3, 330–338. doi:10.1038/nrc1074.
- 30 Lopez, M., Li, N., Kataria, J., Russell, M., and Neu, J. (2008). Live and Ultraviolet-Inactivated *Lactobacillus Rhamnosus* GG Decrease Flagellin-Induced Interleukin-8 Production in Caco-2 Cells. *J. Nutr.* 138, 2264–2268. doi:10.3945/jn.108.093658.
- 35 Martins CC, Wagner SC, L. R. (2013). Individualização Farmacocinética das Doses de 5-Fluoruracil no Câncer Colorretal. *Rev. Bras. Cancerol.* 59, 271–280. Available at: [https://professores.faccat.br/moodle/pluginfile.php/20451/mod\\_resource/content/1/15-individualizacao-farmacocinetica-das-doses-de-5-fluoruracil-no-cancer-colorretal.pdf](https://professores.faccat.br/moodle/pluginfile.php/20451/mod_resource/content/1/15-individualizacao-farmacocinetica-das-doses-de-5-fluoruracil-no-cancer-colorretal.pdf).
- Matsuzaki, T., and Chin, J. (2000). Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol. Cell Biol.* 78, 67–73. doi:10.1046/j.1440-1711.2000.00887.x.
- 40 Miura, K., Kinouchi, M., Ishida, K., Fujibuchi, W., Naitoh, T., Ogawa, H., et al. (2010). 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs. *Cancers (Basel)*. 2, 1717–1730. doi:10.3390/cancers2031717.
- 45 Nussbaum, J. C., Van Dyken, S. J., von Moltke, J., Cheng, L. E., Mohapatra, A., Molofsky, A. B., et al. (2013). Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature* 502, 245–248. doi:10.1038/nature12526.
- 50 Nussbaumer, S., Bonnabry, P., Veuthey, J.-L., and Fleury-Souverain, S. (2011). Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta* 85, 2265–2289. doi:10.1016/j.talanta.2011.08.034.
- Oh, N. S., Lee, J. Y., Lee, J. M., Lee, K. W., and Kim, Y. (2017a). Mulberry leaf extract fermented with *Lactobacillus acidophilus* A4 ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Let. Appl. Microbiol.* 64, 459–468. doi:10.1111/lam.12741.
- 55 Oh, N. S., Lee, J. Y., Lee, J. M., Lee, K. W., and Kim, Y. (2017b). Mulberry leaf extract

fermented with *Lactobacillus acidophilus* A4 ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Lett. Appl. Microbiol.* 64, 459–468. doi:10.1111/lam.12741.

- 5 OMS (2018). No Title. *Organ. Mund. DA SAÚDE*. Available at: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094).
- 10 OMS (2020). *Who report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all*.
- Otani, T., Nguyen, T. P., Tokuda, S., Sugihara, K., Sugawara, T., Furuse, K., et al. (2019). Claudins and JAM-A coordinately regulate tight junction formation and epithelial polarity. *J. Cell Biol.* 218, 3372–3396. doi:10.1083/jcb.201812157.
- 15 Porto, B. A. A., Monteiro, C. F., Souza, É. L. S., Leocádio, P. C. L., Alvarez-Leite, J. I., Generoso, S. V., et al. (2019). Treatment with selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 partially ameliorates mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 84, 117–126. doi:10.1007/s00280-019-03865-8.
- 20 Prisciandaro, L. D., Geier, M. S., Butler, R. N., Cummins, A. G., and Howarth, G. S. (2011a). Probiotic factors partially improve parameters of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Cancer Biol. Ther.* 11, 671–677. doi:10.4161/cbt.11.7.14896.
- 25 Prisciandaro, L. D., Geier, M. S., Butler, R. N., Cummins, A. G., and Howarth, G. S. (2011b). Probiotic factors partially improve parameters of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Cancer Biol. Ther.* 11, 671–677. doi:10.4161/cbt.11.7.14896.
- 30 Prisciandaro, L. D., Geier, M. S., Chua, A. E., Butler, R. N., Cummins, A. G., Sander, G. R., et al. (2012). Probiotic factors partially prevent changes to caspases 3 and 7 activation and transepithelial electrical resistance in a model of 5-fluorouracil-induced epithelial cell damage. *Support. Care Cancer* 20, 3205–3210. doi:10.1007/s00520-012-1446-3.
- 35 Rankin, S. M., Conroy, D. M., and Williams, T. J. (2000). Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Mol. Med. Today* 6, 20–27. doi:10.1016/S1357-4310(99)01635-4.
- 40 Ribeiro, R. A., Wanderley, C. W. S., Wong, D. V. T., Mota, J. M. S. C., Leite, C. A. V. G., Souza, M. H. L. P., et al. (2016). Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 78, 881–893. doi:10.1007/s00280-016-3139-y.
- 45 Rolny, I. S., Tiscornia, I., Racedo, S. M., Pérez, P. F., and Bollati-Fogolín, M. (2016b). *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133 modulates response of human epithelial and dendritic cells infected with *Bacillus cereus*. *Benef. Microbes* 7, 749–760. doi:10.3920/BM2015.0191.
- Rosenberg, H. F., Masterson, J. C., and Furuta, G. T. (2016). Eosinophils, probiotics, and the microbiome. *J. Leukoc. Biol.* 100, 881–888. doi:10.1189/jlb.3RI0416-202R.
- 50 Rothenberg, M. E., and Hogan, S. P. (2006). THE EOSINOPHIL. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 147–174. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720.
- 55 Rubtsov, Y. P., Rasmussen, J. P., Chi, E. Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., et al. (2008). Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity* 28, 546–558. doi:10.1016/j.immuni.2008.02.017.

- Schmitz, H., Fromm, M., Bentzel, C. J., Scholz, P., Detjen, K., Mankertz, J., et al. (1999). Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 1, 137–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9841910>.
- 5 Shields, M. (2017). *Chemotherapeutics*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00014-7.
- 10 Shin, H. S., Park, S. Y., Lee, D. K., Kim, S. A., An, H. M., Kim, J. R., et al. (2010). Hypocholesterolemic effect of sonication-killed *Bifidobacterium longum* isolated from healthy adult Koreans in high cholesterol fed rats. *Arch. Pharm. Res.* 33, 1425–1431. doi:10.1007/s12272-010-0917-7.
- 15 Smith, C. L., Geier, M. S., Yazbeck, R., Torres, D. M., Butler, R. N., and Howarth, G. S. (2008). *Lactobacillus fermentum* BR11 and fructo-oligosaccharide partially reduce jejunal inflammation in a model of intestinal mucositis in rats. *Nutr. Cancer* 60, 757–767. doi:10.1080/01635580802192841.
- 20 Soares, P. M. G., Mota, J. M. S. C., Gomes, A. S., Oliveira, R. B., Assreuy, A. M. S., Brito, G. A. C., et al. (2008). Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 63, 91–98. doi:10.1007/s00280-008-0715-9.
- 25 Song, M.-K., Park, M.-Y., and Sung, M.-K. (2013). 5-Fluorouracil-Induced Changes of Intestinal Integrity Biomarkers in BALB/C Mice. *J. Cancer Prev.* 18, 322–329. doi:10.15430/jcp.2013.18.4.322.
- 30 Sonis, S. T. (2004b). The pathobiology of mucositis. *Nat. Rev. Cancer* 4, 277–284. doi:10.1038/nrc1318.
- Sonis, S. T., Elting, L. S., Keefe, D., Peterson, D. E., Schubert, M., Hauer-Jensen, M., et al. (2004). Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury. *Cancer* 100, 1995–2025. doi:10.1002/cncr.20162.
- 35 Souza, D. G., Cara, D. C., Cassali, G. D., Coutinho, S. F., Silveira, M. R., Andrade, S. P., et al. (2000). Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1800–1808. doi:10.1038/sj.bjp.0703756.
- 40 Strath, M., and Sanderson, C. J. (1985). Production and functional properties of eosinophils from bone marrow cultures. *J. Cell Sci.* VOL. 74, 207–217.
- 45 Stringer, A. M., Gibson, R. J., Logan, R. M., Bowen, J. M., Yeoh, A. S. J., Hamilton, J., et al. (2009). Gastrointestinal Microflora and Mucins May Play a Critical Role in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Gastrointestinal Mucositis. *Exp. Biol. Med.* 234, 430–441. doi:10.3181/0810-RM-301.
- 50 Taverniti, V., and Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr.* 6, 261–274. doi:10.1007/s12263-011-0218-x.
- 55 Touchefeu, Y., Montassier, E., Nieman, K., Gastinne, T., Potel, G., Bruley Des Varannes, S., et al. (2014). Systematic review: The role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis - Current evidence and potential clinical applications. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 40, 409–421. doi:10.1111/apt.12878.

- Turner, J. R. (2006). Molecular Basis of Epithelial Barrier Regulation. *Am. J. Pathol.* 169, 1901–1909. doi:10.2353/ajpath.2006.060681.
- 5 Van Sebille, Y. Z. A., Stansborough, R., Wardill, H. R., Bateman, E., Gibson, R. J., and Keefe, D. M. (2015). Management of Mucositis During Chemotherapy: From Pathophysiology to Pragmatic Therapeutics. *Curr. Oncol. Rep.* 17, 50. doi:10.1007/s11912-015-0474-9.
- 10 van Vliet, M. J., Harmsen, H. J. M., de Bont, E. S. J. M., and Tissing, W. J. E. (2010). The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLoS Pathog.* 6, 1–7. doi:10.1371/journal.ppat.1000879.
- 15 Vieira, A. T., Fagundes, C. T., Alessandri, A. L., Castor, M. G. M., Guabiraba, R., Borges, V. O., et al. (2009). Treatment with a Novel Chemokine-Binding Protein or Eosinophil Lineage-Ablation Protects Mice from Experimental Colitis. *Am. J. Pathol.* 175, 2382–2391. doi:10.2353/ajpath.2009.090093.
- 20 Volynets, V., Rings, A., Bárdos, G., Ostaff, M. J., Wehkamp, J., and Bischoff, S. C. (2016). Intestinal barrier analysis by assessment of mucins, tight junctions, and  $\alpha$ -defensins in healthy C57BL/6J and BALB/cJ mice. *Tissue Barriers* 4, e1208468. doi:10.1080/21688370.2016.1208468.
- 25 Woodruff, S. A., Masterson, J. C., Fillon, S., Robinson, Z. D., and Furuta, G. T. (2011). Role of eosinophils in inflammatory bowel and gastrointestinal diseases. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 52, 650–661. doi:10.1097/MPG.0b013e3182128512.
- 30 Yeung, C. Y., Chan, W. T., Jiang, C. Bin, Cheng, M. L., Liu, C. Y., Chang, S. W., et al. (2015). Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model. *PLoS One* 10, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0138746.
- Yeung, C. Y., Chiang Chiau, J. S., Cheng, M. L., Chan, W. T., Chang, S. W., Chang, Y. H., et al. (2020). Modulations of probiotics on gut microbiota in a 5-fluorouracil-induced mouse model of mucositis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 35, 806–814. doi:10.1111/jgh.14890.

## 9. ANEXOS

**Tabela 4:** Lista de créditos realizados na Pós-Graduação de Genética, publicações, participação e organização de eventos.

5

<b>Anexos</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Situação</b>
<b>Créditos</b>	23	Integralizados
<b>Capítulo de livro como 1º autora</b>	01	Publicado
<b>Capítulo de livro como coautora</b>	01	Publicado
<b>Artigo científico como 1º autora</b>	01	Submetido
<b>Artigo científico como co-autora</b>	01	Publicado – Cap I
<b>Participação de eventos</b>	03	Publicado
<b>Organização de eventos</b>	05	Concluído
	01	Concluído

10





## 9.1 PROTOCOLO CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do efeito enteroprotetor da linhagem *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA133 viável, inativada e de seus produtos secretados em modelo murino mucosite intestinal induzida pelo antineoplásico 5-fluorouracil", protocolo do CEUA: 112/2020 sob a responsabilidade de Vasco Ariston de Carvalho Azevedo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 03/08/2020.

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

Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério CeBio
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / Camundongo BALB/c
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério CeBio
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / Camundongo BALB/c
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério CeBio

Considerações posteriores:

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

Belo Horizonte, 09/11/2020.


Atenciosamente,

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

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



## 9.2 CRÉDITOS CONCLUÍDOS

		<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b> Pós-Graduação <i>Stricto Sensu</i> Histórico Escolar				Emissão 14/02/2021 Página 1 de 2	
Nome do Aluno VIVIANE LIMA BATISTA			Número de Registro 2019702155	Forma de Admissão EXAME SELECAO		Data de Início 2019/1 01/03/2019	
Filiação JOSÉ CARLOS BATISTA ELIANE LIMA VIEIRA BATISTA			Exame de Língua Estrangeira 07/02/2019 INGLES			CPF 12611386609	
Curso 2157 - GENÉTICA			Identidade MG-17.558.418	Órgão Emissor SECRETARIA SEGURANCA PUBLICA		UF MG	Doc. Militar 00
			R.M. 00	Circunscrição 203044260264	Título de Eleitor 321	Zona 204	Seção 204
			Data de Nascimento 30/06/1995		Cidade de Nascimento BELO HORIZONTE		UF MG
Nível MESTRADO	Data Criação 10/04/1997	Resolução 0497	País Nascimento BRASIL		Nacionalidade BRASIL		
Área de Concentração GENÉTICA MOLECULAR, DE MICRORGANISMOS E BIOTECNOLOGIA			Curso de Graduação BACHARELADO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS				
Linha de Pesquisa *****			Estabelecimento FACULDADE PITÁGORAS DE BELO HORIZONTE				Término 2018/2
Orientador VASCO ARISTON DE CARVALHO AZEVEDO			Cidade/País BELO HORIZONTE BRASIL				UF MG

Atividades Acadêmicas Cursadas										
Ano/Sem.	Descrição	TUR	NAT	CR	CH	FR	NOTA	CONC	SF	
2019/1	DIP BIG834 - ESTRUTURA E FUNCAO DO GENOMA	A	OB	04	60	S	95.0	A	A	
2019/1	DIP BIG835 - EVOLUCAO	A	OP	04	60	S	90.0	A	A	
2019/1	DIP BIG847 - TOPICOS ESPECIAIS DE GENETICA E EVOLUCAO II: Introdução a Bioinformática Genômica	F	OP	02	30	S	96.0	A	A	
2019/1	DIP BIG851 - SEMINARIOS DE GENETICA A: Seminários A	A	OB	1	15	S	100.0	A	A	
2019/1	DIP BIG890 - TÓPICOS ESPECIAIS DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO IV: EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL O CAMUNDONGO COMO MODELO	A	OP	04	60	S	90.0	A	A	
2019/2	DIP BIG847 - TOPICOS ESPECIAIS DE GENETICA E EVOLUCAO II: Tópicos avançados em doenças do trato gastrointestinal (EVENTO LIA 21 a 23/08)	P	OP	2	30	S	100.0	A	A	
2019/2	DIP BIG890 - TÓPICOS ESPECIAIS DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO IV: Genética em Vídeo	E	OP	04	60	S	100.0	A	A	
2020/1	DIP BIG852 - SEMINARIOS DE GENETICA B: Seminários B	A	OB	1	15	S	93.0	A	A	
2020/1	DIP BIG869 - EXPERIENCIA DIDATICA I	A	OP	01	15	S	100.0	A	A	
2020/2	ETF GER000 - ELABORACAO DE TRABALHO FINAL									

\*\* Atividades utilizadas como origem de dispensa

Belo Horizonte, 14 de fevereiro de 2021



A conferência da autenticidade poderá ser realizada por até 6 meses, contado da data de sua emissão, ou até que novo documento seja gerado pelo aluno.

Para autenticar este documento utilize o QR Code ou insira o link abaixo no seu navegador.

<https://sistemas.ufmg.br/autenticacaodocuments/autenticacaodocuments.seam?r=151941-cae52dd388cc33cf91351d230109681fe0682e9c>

#### Legenda:


NAT = Natureza (OP=Opcativa, OB=Obrigatória, EL=Eletiva, (\*)=extracurricular)  
 CH = Carga Horária CR = Créditos TUR = Turma  
 FR = Frequência (S=Suficiente, I=Insuficiente) CONC = Conceito  
 SF = Situação Final (A=Aprovado, R=Reprovado, T=Trancada, D=Dispensado)

Tipo da Origem da Dispensa ou do Aproveitamento de Créditos

AE - Aproveitamento de Estudo  
 AM - Aproveitamento de Créditos de Pós-Graduação  
 EQ - Equivalência

Conceito - (Resolução Conselho Universitário nº 03/2018 de 17 de abril de 2018)

A - (90 a 100)  
 B- (80 a 89)  
 C- (70 a 79)  
 D - (60 a 69)  
 E - (40 a 59)  
 F - (0 a 39)

	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b> Pós-Graduação <i>Stricto Sensu</i> Histórico Escolar		Emissão 14/02/2021 Página 2 de 2
	Aluno	2019702155	VIVIANE LIMA BATISTA

Orientação:  
 Vasco Ariston de Carvalho Azevedo (Orientador)  
 Isaque Joao da Silva de Faria (Coorientador)

Integralização	Créditos Exigidos: 22	Créditos Cursados: 23	Créditos aproveitados/dispensados: 0
	Créditos Utilizados para a Integralização: 22		
Correspondência Carga Horária/Crédito: 15 Horas / 1 Crédito			
Pós - Graduado: NÃO			

Belo Horizonte, 14 de fevereiro de 2021



A conferência da autenticidade poderá ser realizada por até 6 meses, contado da data de sua emissão, ou até que novo documento seja gerado pelo aluno.

Para autenticar este documento utilize o QR Code ou insira o link abaixo no seu navegador.

<https://sistemas.ufmg.br/autenticacaodocumentos/autenticacaodocumentos.seam?r=151941-cae52dd388cc33c91351d230109681fe0682e9c>

#### Legenda:

NAT = Natureza (OP=Optativa, OB=Obrigatória, EL=Eletiva, (\*)=extracurricular)  
 CH = Carga Horária CR = Créditos TUR = Turma  
 FR = Frequência (S=Suficiente, I=Insuficiente) CONC = Conceito  
 SF = Situação Final (A=Aprovado, R=Reprovado, T=Trancada, D=Dispensado)

#### Tipo da Origem da Dispensa ou do Aproveitamento de Créditos

AE = Aproveitamento de Estudo  
 AM = Aproveitamento de Créditos de Pós-Graduação  
 EQ = Equivalência

#### Conceito – (Resolução Conselho Universitário nº 03/2018 de 17 de abril de 2018)

A - (90 a 100)  
 B- (80 a 89)  
 C- (70 a 79)  
 D - (60 a 69)  
 E - (40 a 59)  
 F - (0 a 39)

## 9.3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### 9.3.1 Capítulos de livro

#### 9.3.1.1 Publicado como primeira autora

- 5 Batista VL, da Silva TF, de Jesus LCL, Tapia-Costa AP, Drumond MM, Azevedo V, Mancha-Agresti P. Lactic Acid Bacteria as Delivery Vehicle for Therapeutics Applications. *Methods Mol Biol.* 2021; 2183:447-459. doi: 10.1007/978-1-0716-0795-4\_24. PMID: 32959259.

- 10 **Descrição:** Capítulo desenvolvido em conjunto com os membros do laboratório de genética celular e molecular (LGCM), como primeira autoria, participei de toda a estrutura, escrita e correções do capítulo com o auxílio dos outros autores, a escrita deste capítulo possibilitou um maior entendimento das aplicações das bactérias do ácido láctico como veículo de entrega, que faz parte de uma das linhas de pesquisa do laboratório.



## Chapter 24

### Lactic Acid Bacteria as Delivery Vehicle for Therapeutics Applications

Viviane Lima Batista, Tales Fernando da Silva, Luis Cláudio Lima de Jesus, Ana Paula Tapia-Costa, Mariana Martins Drumond, Vasco Azevedo, and Pamela Mancha-Agresti

#### Abstract

Lactic acid bacteria comprise a large group of Gram-positive organisms capable of converting sugar into lactic acid. They have been studied due to their therapeutic potential on the mucosal surface. Among the species, *Lactococcus lactis* is considered the model bacterium and it has been explored as an important vehicle for providing therapeutic molecules and antigens in the mucosa. They can be genetically engineered to produce a variety of molecules as well as deliver heterologous DNA and protein. DNA vaccines consist of the administration of a bacterial plasmid under the control of a eukaryotic promoter encoding the antigen of interest. The resulting proteins are capable of stimulating the immune system, becoming a promising technique for immunization against a variety of tumors and infection diseases and having several advantages compared to conventional nucleic acid delivery methods (such as bioballistic delivery, electroporation, and intramuscular administration).

**Key words** Lactic acid bacteria, DNA vaccine, DNA delivery, Mucosal administration, *Lactococcus lactis*

#### 1 Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) comprises a large group of gram-positive and nonsporulating microorganisms with fermentative properties, having the capacity to convert sugar into lactic acid. The majority of LAB have a “Generally Recognized as Safe” (GRAS) status according to the United States Food and Drug Administration (US FDA), meeting the criteria to be considered safe for human consumption [1].

LAB has been intensively studied due to their potential therapeutic effects on mucosal surfaces and can also be genetically engineered to efficiently produce a large variety of molecules either for the delivery of DNA or heterologous proteins [2–5]. In this context, among the various species of LAB, *Lactococcus lactis* is

### 9.3.1.2 Publicado como co-autora

(PDF) [The Gastrointestinal Disease to the Microbiota Treatment: From the Present to the future \(researchgate.net\)](#).

- 5 **Descrição:** Capítulo desenvolvido em conjunto com os membros do laboratório de genética celular e molecular (LGCM), como co-autora, participei da escrita e correções do capítulo em conjunto com os demais autores, este capítulo está relacionado com o tema desta dissertação, trabalhando as doenças do trato gastrointestinal, microbiota e os principais tratamentos.

## eBook on Inflammatory Bowel Disease

Chapter 2

### The Gastrointestinal Disease to the Microbiota Treatment: From the Present to the Future

*Fernanda Alvarenga Lima<sup>1</sup>, Luís Cláudio Lima de Jesus<sup>1</sup>, Viviane Lima Batista<sup>1</sup>, Laisa Macedo Tavares<sup>1</sup>, Rafael Assis<sup>1</sup>, Mariana Martins Drumond<sup>1,2</sup>, Vasco Azevedo<sup>1</sup>, Pamela Mancha-Agresti<sup>1\*</sup>*

*<sup>1</sup>Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.*

*<sup>2</sup>Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG), Departamento de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.*

*\*Correspondence to: Pamela Mancha-Agresti, Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.*

*Email: [p.mancha.agresti@gmail.com](mailto:p.mancha.agresti@gmail.com)*

#### 1. Introduction

Chronic diseases, especially the inflammatory ones, share several characteristics to each other. In this chapter we will first discuss the main characteristics of inflammatory bowel diseases, afterwards the Metabolic Syndrome and associated diseases and, finally, intestinal mucositis that although is not a disease itself, produces an inflammatory process with serious problems related to the discontinuation of cancer treatment. Second, we will discuss the effects of probiotics on the control, prevention or attenuation of the symptoms of these diseases and, finally, we will discuss about the changes that these diseases cause in the microbiota, emphasizing the methods and results of the researches involving the microbiota and the next steps of scientific research to elucidate the mechanisms involved in the control of inflammatory processes through its manipulation.

10

15

### 9.3.1.3 Submetido como co-autora

Submetido em editora Atheneu SP.

- 5 **Descrição:** Capítulo desenvolvido em conjunto com os membros do laboratório de genética celular e molecular (LGCM), submetido como co-autora. Nesse capítulo, participei da escrita, e ele proporcionou um conhecimento mais abrangente da relação da microbiota e o osso.

#### MICROBIOTA INTESTINAL E OSSO

Tales Fernando da Silva<sup>1</sup>, Viviane Lima Batista<sup>1</sup>, Nina Dias Coelho-Rocha<sup>1</sup>, Mariana Martins Drumond<sup>1,3</sup>, Pamela Mancha-Agresti<sup>1</sup> e Vasco Azevedo<sup>1,2</sup>,

1. Programa de pós-graduação em Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.
2. Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.
3. Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET-MG

#### 1. INTRODUÇÃO

A influência da microbiota intestinal no tecido ósseo tem sido estudada em uma variedade de modelos experimentais, como animais desprovidos de microbiota (*Germ-free*), em animais nos quais foram administrados antibióticos ou probióticos para alterar a microbiota e em humanos. Embora os resultados na experimentação animal sejam conflitantes, atualmente a microbiota intestinal é considerada o principal regulador da densidade mineral óssea, especialmente devido a sua importante participação no sistema imune (1).

A interação entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico desempenha papel de fundamental importância na maturação do mesmo, especificamente durante os períodos iniciais pós-natal além de ter papel essencial na resposta a antígenos próprios bem como na modulação do sistema imunológico durante toda vida do hospedeiro. Outro importante fato a ser destacado é que a desregulação da microbiota pode levar ao desenvolvimento de diferentes doenças imunológicas, tais como: *i*) alergias, *ii*) autoimunidade e *iii*) doenças inflamatórias. Pesquisas recentes têm revelado que a ausência total da microbiota intestinal influencia negativamente a formação e o funcionamento de órgãos linfoides como baço e linfonodos mesentéricos, levando a uma menor produção de células TCD4<sup>+</sup> e de imunoglobulina A (IgA) (2).

Desta forma, sugere-se que tanto a composição da microbiota intestinal quanto a sua manipulação pode alterar a saúde óssea por meio da alteração/distúrbio na absorção de cálcio, por exemplo, ou também na produção de serotonina pelo intestino (Figura 1).

10

15

20

## 9.3.2 Artigos científicos

### 9.3.2.1 Publicado como primeira autora

5

Batista VL, da Silva TF, de Jesus LCL, et al. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis. *Front Microbiol.* 2020; 11:544490. Published 2020 Sep 17. doi:10.3389/fmicb.2020.544490. fator de impacto 4.2

10

**Descrição:** Artigo desenvolvido em conjunto com os membros do laboratório de genética celular e molecular (LGCM), publicado como primeira autora, esse artigo foi fruto do meu trabalho de conclusão de curso em Ciências biológicas, utilizado como introdução desse manuscrito por está diretamente relacionado com o tema da dissertação, aborda o uso de bióticos como alternativa terapêutica a mucosite intestinal. Participei de toda a escrita, estrutura e correções do manuscrito em conjunto com os demais autores.

15



## Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis

Viviane Lima Batista<sup>1</sup>, Tales Fernando da Silva<sup>1</sup>, Luis Cláudio Lima de Jesus<sup>1</sup>, Nina Dias Coelho-Rocha<sup>1</sup>, Fernanda Alvarenga Lima Barroso<sup>1</sup>, Laisa Macedo Tavares<sup>1</sup>, Vasco Azevedo<sup>1</sup>, Pamela Mancha-Agresti<sup>1,2\*</sup> and Mariana Martins Drumond<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, <sup>2</sup> Faculdade de Minas, FAMINAS-BH, Belo Horizonte, Brazil, <sup>3</sup> Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG), Departamento de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, Brazil

### OPEN ACCESS

**Edited by:**  
Konstantinos Papatimitriou,  
University of Peloponnese, Greece

**Reviewed by:**  
Natasa Golc,  
University of Belgrade, Serbia  
Eric Claassen,  
Vrije Universiteit Amsterdam,  
Netherlands  
Jia Yin,  
Hunan Normal University, China

**\*Correspondence:**  
Pamela Mancha-Agresti  
p.mancha.agresti@gmail.com  
Mariana Martins Drumond  
mmdrumond@gmail.com

**Specialty section:**  
This article was submitted to  
Food Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 21 March 2020  
**Accepted:** 24 August 2020  
**Published:** 17 September 2020

**Citation:**  
Batista VL, da Silva TF,  
de Jesus LCL, Coelho-Rocha ND,  
Barroso FAL, Tavares LM, Azevedo V,  
Mancha-Agresti P and Drumond MM  
(2020) Probiotics, Prebiotics,  
Synbiotics, and Paraprobiotics as  
a Therapeutic Alternative for Intestinal  
Mucositis.  
*Front. Microbiol.* 11:544490.  
doi: 10.3389/fmicb.2020.544490

Intestinal mucositis, a cytotoxic side effect of the antineoplastic drug 5-fluorouracil (5-FU), is characterized by ulceration, inflammation, diarrhea, and intense abdominal pain, making it an important issue for clinical medicine. Given the seriousness of the problem, therapeutic alternatives have been sought as a means to ameliorate, prevent, and treat this condition. Among the alternatives available to address this side effect of treatment with 5-FU, the most promising has been the use of probiotics, prebiotics, synbiotics, and paraprobiotics. This review addresses the administration of these "biotics" as a therapeutic alternative for intestinal mucositis caused by 5-FU. It describes the effects and benefits related to their use as well as their potential for patient care.

**Keywords:** lactic acid bacteria, chemotherapy, intestinal inflammation, treatment, mucositis

### INTRODUCTION

Cancer is a disease characterized by uncontrolled proliferation of cells with cellular differentiation properties, having the capacity to invade tissues and organs and spread to other regions of the body, causing metastases (World Health Organization [WHO], 2018). This disease is the second leading cause of death globally, according to the World Health Organization, accounting for an estimated 9.6 million deaths in 2018; lung (1.76 million deaths), colorectal (862,000 deaths), stomach (783,000 deaths), liver (782,000 deaths), and breast cancer (627,000 deaths) are the most common types and have the highest mortality rates (World Health Organization [WHO], 2018).

Despite the high incidence and mortality rates, when identified early, cancer is a potentially curable and treatable disease. Treatment may be done through surgery, chemotherapy, radiotherapy, or bone marrow transplantation, depending on the type of cancer, degree of tumor aggressiveness, as well as the patient's physical and immunological status. It is often necessary to combine more than one type of treatment to achieve satisfactory results (World Health Organization [WHO], 2018).

Antineoplastic chemotherapy consists of the use of drugs that destroy cancer cells, inhibit their growth, and prevent their spread by targeting DNA or critical processes involved in cell division (Guichard et al., 2017; Shields, 2017). The traditional chemotherapeutics are classified according to their mechanisms of action, including antimetabolites, microtubule-targeting agents, topoisomerases, and antibiotics (Shields, 2017). The therapeutic arsenal mostly used in the

20

25



### 9.3.2.2 Publicado como co-autora

de Castro CP, Drumond MM, Batista VL, Nunes A, Mancha-Agresti P, Azevedo V. Vector Development Timeline for Mucosal Vaccination and Treatment of Disease Using *Lactococcus lactis* and Design Approaches of Next Generation Food Grade Plasmids. *Front Microbiol.* 2018; 9:1805. Published 2018 Aug 14. doi:10.3389/fmicb.2018.01805. (Fator de impacto 4.2).

**Descrição:** Artigo desenvolvido em conjunto com os membros do laboratório de genética celular e molecular (LGCM), publicado como co-autora, este foi meu primeiro artigo publicado ainda na iniciação científica, participei no auxílio da escrita de pequenos tópicos e na formatação, esse artigo me proporcionou diversos conhecimentos sobre a escrita científica, e sobre o desenvolvimento de vetores vacinais para tratamento de doenças usando *Lactococcus lactis* como veículo de entrega..



## Vector Development Timeline for Mucosal Vaccination and Treatment of Disease Using *Lactococcus lactis* and Design Approaches of Next Generation Food Grade Plasmids

Camila Proserpi de Castro<sup>1,2</sup>, Mariana M. Drumond<sup>1,2</sup>, Viviane L. Batista<sup>1</sup>, Amanda Nunes<sup>1</sup>, Pamela Mancha-Agresti<sup>1</sup> and Vasco Azevedo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; <sup>2</sup> Kroton Educacional, Faculdade Pitágoras, Contagem, Brazil; <sup>3</sup> Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Coordenação de Ciências, Belo Horizonte, Brazil

*Lactococcus lactis* has been used historically in fermentation and food preservation processes as it is considered safe for human consumption (GRAS—Generally Recognized As Safe). Nowadays, in addition to its wide use in the food industry, *L. lactis* has been used as a bioreactor for the production of molecules of medical interest, as well as vectors for DNA delivery. These applications are possible due to the development of promising genetic tools over the past few decades, such as gene expression, protein targeting systems, and vaccine plasmids. Thus, this review presents some of these genetic tools and their evolution, which allow us to envision new biotechnological and therapeutic uses of *L. lactis*. Constitutive and inductive expression systems will be discussed, many of which have been used successfully for heterologous production of different proteins, tested on animal models. In addition, advances in the construction of new plasmids to be used as potential DNA vaccines, delivered by this microorganism, will also be viewed. Finally, we will focus on the scene of gene expression systems known as “food-grade systems” based on inducing compounds and safe selection markers, which eliminate the need for the use of compounds harmful to humans or animal health and potential future prospects for their applications.

**Keywords:** lactic acid bacteria, recombinant *L. lactis*, expression systems, DNA vaccine, food grade vectors

### *Lactococcus lactis*: THE MODEL LACTIC ACID BACTERIA

Lactic acid bacteria (LAB) constitute a diverse group of Gram-positive microorganisms, including species of genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Oenococcus*, which, among other shared characteristics, have the capacity to convert sugars into lactic acid (Makarova and Koonin, 2007). Because they have long been used in fermentation and food preservation processes, most of these bacteria are considered safe for human consumption, possessing the GRAS (*Generally Recognized As Safe*) status (van de Guchte et al., 2006). Among the representatives of this group, *L. lactis* is the best characterized species and figures as the model organism for its study. This, in turn, is due not only to its evident economic importance, but also to the fact that this bacterium is a microorganism of easy manipulation and has its genome sequenced. A great number of genetic tools have been developed. Thus, *L. lactis* has

#### OPEN ACCESS

##### Edited by:

Aloš Berlec,  
Jožef Stefan Institute (JSI), Slovenia

##### Reviewed by:

Priti Desai,  
Institute of Advanced Research, India  
Catherine Daniel,  
Institut Pasteur de Lille, France

##### \*Correspondence:

Vasco Azevedo  
vasco@icb.ufmg.br

##### Specialty section:

This article was submitted to  
Infectious Diseases,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

Received: 09 April 2018

Accepted: 18 July 2018

Published: 14 August 2018

##### Citation:

de Castro CP, Drumond MM,  
Batista VL, Nunes A,  
Mancha-Agresti P and Azevedo V  
(2018) Vector Development Timeline  
for Mucosal Vaccination  
and Treatment of Disease Using  
*Lactococcus lactis* and Design  
Approaches of Next Generation Food  
Grade Plasmids.  
*Front. Microbiol.* 9:1805.  
doi: 10.3389/fmicb.2018.01805

Tavares, Laísa M et al. "Novel Strategies for Efficient Production and Delivery of Live Biotherapeutics and Biotechnological Uses of *Lactococcus lactis*: The Lactic Acid Bacterium Model." *Frontiers in bioengineering and biotechnology* vol. 8 517166. 4 Nov. 2020, doi:10.3389/fbioe.2020.517166. (Fator de impacto 3.6).

**Descrição:** Artigo desenvolvido em conjunto com os membros do laboratório de genética celular e molecular (LGCM), publicado como co-autora, este artigo aborda o uso biotecnológico das bactérias lácticas, em especial, *Lactococcus lactis*, essa é uma das linhas de pesquisa do laboratório. Particpei no auxílio da escrita e da correção do artigo



## Novel Strategies for Efficient Production and Delivery of Live Biotherapeutics and Biotechnological Uses of *Lactococcus lactis*: The Lactic Acid Bacterium Model

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Ana Gomes,  
Universidade Católica Portuguesa,  
Portugal

#### Reviewed by:

Noppol Lekswasdi,  
Chiang Mai University, Thailand  
José Carlos Andrade,  
University Institute of Health Sciences,  
Portugal

#### \*Correspondence:

Pamela Mancha-Agresti  
p.mancha.agresti@gmail.com  
Mariana M. Drumond  
mmdrumond@gmail.com

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Bioprocess Engineering,  
a section of the journal  
*Frontiers in Bioengineering and  
Biotechnology*

**Received:** 03 December 2019

**Accepted:** 09 October 2020

**Published:** 04 November 2020

#### Citation:

Tavares LM, de Jesus LCL,  
da Silva TF, Barroso FAL, Batista VL,  
Coelho-Rocha ND, Azevedo V,  
Drumond MM and Mancha-Agresti P  
(2020) Novel Strategies for Efficient  
Production and Delivery of Live  
Biotherapeutics and Biotechnological  
Uses of *Lactococcus lactis*:  
The Lactic Acid Bacterium Model.  
*Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:517166.  
doi: 10.3389/fbioe.2020.517166

Laísa M. Tavares<sup>1</sup>, Luís C. L. de Jesus<sup>1</sup>, Tales F. da Silva<sup>1</sup>, Fernanda A. L. Barroso<sup>1</sup>,  
Viviane L. Batista<sup>1</sup>, Nina D. Coelho-Rocha<sup>1</sup>, Vasco Azevedo<sup>1</sup>, Mariana M. Drumond<sup>1,2\*</sup>  
and Pamela Mancha-Agresti<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Cellular and Molecular Genetics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, <sup>2</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, <sup>3</sup> FAMINAS - BH, Belo Horizonte, Brazil

Lactic acid bacteria (LAB) are traditionally used in fermentation and food preservation processes and are recognized as safe for consumption. Recently, they have attracted attention due to their health-promoting properties; many species are already widely used as probiotics for treatment or prevention of various medical conditions, including inflammatory bowel diseases, infections, and autoimmune disorders. Some LAB, especially *Lactococcus lactis*, have been engineered as live vehicles for delivery of DNA vaccines and for production of therapeutic biomolecules. Here, we summarize work on engineering of LAB, with emphasis on the model LAB, *L. lactis*. We review the various expression systems for the production of heterologous proteins in *Lactococcus* spp. and its use as a live delivery system of DNA vaccines and for expression of biotherapeutics using the eukaryotic cell machinery. We have included examples of molecules produced by these expression platforms and their application in clinical disorders. We also present the CRISPR-Cas approach as a novel methodology for the development and optimization of food-grade expression of useful substances, and detail methods to improve DNA delivery by LAB to the gastrointestinal tract. Finally, we discuss perspectives for the development of medical applications of recombinant LABs involving animal model studies and human clinical trials, and we touch on the main safety issues that need to be taken into account so that bioengineered versions of these generally recognized as safe organisms will be considered acceptable for medical use.

**Keywords:** *Lactococcus lactis*, genetic engineering, biotherapeutic molecules, mucosal immunity, safe for consumption

Barroso, Fernanda Alvarenga Lima et al. "Intake of *Lactobacillus delbrueckii* (pExu:hsp65) Prevents the Inflammation and the Disorganization of the Intestinal Mucosa in a Mouse Model of Mucositis." *Microorganisms* vol. 9,1 107. 5 jan. 2021, doi:10.3390/microorganisms9010107. (Fator de impacto 4.1).

Descrição: Artigo desenvolvido em conjunto com os membros do laboratório de genética celular e molecular (LGCM), publicado como co-autora, este artigo está relacionado ao trabalho da dissertação, usando o modelo de mucosite intestinal e cepa probiótica CIDCA 133. Participei de toda a parte experimental do trabalho.



## Article

## Intake of *Lactobacillus delbrueckii* (pExu:hsp65) Prevents the Inflammation and the Disorganization of the Intestinal Mucosa in a Mouse Model of Mucositis

Fernanda Alvarenga Lima Barroso <sup>1,†</sup>, Luís Cláudio Lima de Jesus <sup>1,†</sup>, Camila Prospero de Castro <sup>1</sup>, Viviane Lima Batista <sup>1</sup>, Ênio Ferreira <sup>2</sup>, Renata Salgado Fernandes <sup>3</sup>, André Luís Branco de Barros <sup>3</sup>, Sophie Yvette Leclercq <sup>4</sup>, Vasco Azevedo <sup>1</sup>, Pamela Mancha-Agresti <sup>1,5,\*</sup> and Mariana Martins Drumond <sup>1,6,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), Departamento de—Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte 31270-901, Brazil; fernanda\_alima@hotmail.com (F.A.L.B.); lc.luis@yahoo.com.br (L.C.L.d.J.); camilaprosperto@gmail.com (C.P.d.C.); vivianelimabio@gmail.com (V.L.B.); vasco@icb.ufmg.br (V.A.)
- <sup>2</sup> Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil; enioferreira@icb.ufmg.br
- <sup>3</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Campus da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Cidade Universitária, Belo Horizonte 31270-901, Brazil; renatasalgado@yahoo.com.br (R.S.F.); brancoabarros@yahoo.com.br (A.L.B.d.B.)
- <sup>4</sup> Laboratório de Inovação Biotecnológica, Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte 30510-010, Brazil; sodris2003@gmail.com
- <sup>5</sup> Faculdade de Minas-Faminas-BH, Medicina, Belo Horizonte 31744-007, Brazil
- <sup>6</sup> Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG), Departamento de Ciências Biológicas, Belo Horizonte 31421-169, Brazil
- \* Correspondence: p.mancha.agresti@gmail.com (P.M.-A.); mmdrumond@gmail.com (M.M.D.); Tel.: +55-31-99817-5004 (P.M.-A.); +55-31-99222-2761 (M.M.D.)
- † These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Barroso, F.A.L.; de Jesus, L.C.L.; de Castro, C.P.; Batista, V.L.; Ferreira, Ê.; Fernandes, R.S.; de Barros, A.L.B.; Leclercq, S.Y.; Azevedo, V.; Mancha-Agresti, P.; et al. Intake of *Lactobacillus delbrueckii* (pExu:hsp65) Prevents the Inflammation and the Disorganization of the Intestinal Mucosa in a Mouse Model of Mucositis. *Microorganisms* **2021**, *9*, 107. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010107>

Received: 2 November 2020

Accepted: 30 November 2020

Published: 5 January 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** 5-Fluorouracil (5-FU) is an antineoplastic drug that causes, as a side effect, intestinal mucositis, acute inflammation in the small bowel. The Heat Shock Protein (Hsp) are highly expressed in inflammatory conditions, developing an important role in immune modulation. Thus, they are potential candidates for the treatment of inflammatory diseases. In the mucositis mouse model, the present study aimed to evaluate the beneficial effect of oral administration of milk fermented by *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 (pExu:hsp65), a recombinant strain. This approach showed increased levels of sIgA in the intestinal fluid, reducing inflammatory infiltrate and intestinal permeability. Additionally, the histological score was improved. Protection was associated with a reduction in the gene expression of pro-inflammatory cytokines such as Tnf, Il6, Il12, and Il1b, and an increase in Il10, Muc2, and claudin 1 (Cldn1) and 2 (Cldn2) gene expression in ileum tissue. These findings are corroborated with the increased number of goblet cells, the electronic microscopy images, and the reduction of intestinal permeability. The administration of milk fermented by this recombinant probiotic strain was also able to reverse the high levels of gene expression of Tlrs caused by the 5-FU. Thus, the rCIDCA 133:Hsp65 strain was revealed to be a promising preventive strategy for small bowel inflammation.

**Keywords:** recombinant probiotics; DNA delivery; intestinal mucositis; inflammation; technetium-99m; bacterial translocation; gene expression

### 1. Introduction

Radio- and chemotherapy and the combination of both are widely used for cancer treatment. 5-Fluorouracil (5-FU) is one of the main chemotherapeutic drugs used to treat several types of cancer. This drug is responsible for several adverse effects, such as mucositis, an inflammatory process that affects the entire digestive tract, causing abdominal

### 9.3.3 Participação e organização de eventos



5



10



**conecta**  
**VI SIMPOSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**MICROBIOLOGIA INTERLIGADA**

**CERTIFICADO**

Certificamos que **BATISTA, V.L.; DE JESUS, L.C. L.; COELHO-ROCHA, N.D.; MACEDO, L.T.; LIMA, F.A.; ASSIS, R.; SILVA, T.F.; PAZ, J.; SANTOS, E.S.S.; SILVA, C.C.M.; MOURA, F.S.V.; TAPIA-COSTA, A.P.; DURAN, N.; AZEVEDO, V.; DRUMOND, M.M.; MANCHA-AGRESTI, P.**; teve o seu trabalho "**LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. LACTIS CIDCA133 (pExu:HSP65) ATENUA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA PELO ANTINEOPLASICO 5-FU.**", apresentado no formato de **pôster** no "VI Simpósio de Microbiologia da UFMG – **CONECTA SIM: Microbiologia Interligada**", promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 03 e 04 de setembro de 2019.

*Betânia Paiva Drummond*  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Betânia Paiva Drummond  
Coordenadora do Conecta SIM

*Flávio*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia



**conecta**  
**VI SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG**  
**MICROBIOLOGIA INTERLIGADA**

**CERTIFICADO**

Certificamos que **Viviane Lima Batista** participou do "VI Simpósio de Microbiologia da UFMG – **CONECTA SIM: Microbiologia Interligada**", promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 03 e 04 de setembro de 2019 com duração total de 16h.

*Betânia Paiva Drummond*  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Betânia Paiva Drummond  
Coordenadora do Conecta SIM

*Flávio*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

**Certificamos que VIVIANE LIMA BATISTA ministrou uma palestra na Mesa-redonda Ciências da Saúde, no dia 23/10/19, durante a Semana da Biologia da Faculdade Pitágoras de Belo Horizonte - unidade Guajajaras, realizada de 21 a 24 de outubro de 2019.**




---

Prof. Geraldo Eustáquio Valente Padilha  
Coordenador do curso de Ciências Biológicas  
Faculdade Pitágoras – Belo Horizonte



**Declaramos para os devidos fins, que a Bióloga Viviane Lima Batista ministrou a palestra intitulada “O Mercado de Trabalho para o Biólogo Geneticista” no Ciclo de Palestras do Dia do Biólogo, realizado no curso de Ciências Biológicas da Faculdade Pitágoras de Belo Horizonte, em 03 de setembro de 2019.**




---

Prof. Geraldo Eustáquio Valente Padilha  
Coordenador do curso de Ciências Biológicas  
Faculdade Pitágoras – Belo Horizonte



15/02/2021

Currículo Lattes

Imp  
cur**Viviane Lima Batista**Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2795466902488433>

Última atualização do currículo em 15/02/2021

**Resumo informado pelo autor**

Possui graduação em Ciências biológicas pela Faculdade Pitágoras de Belo Horizonte (2015-2018). Atualmente é aluna de mestrado do Programa de Pós Graduação em Genética da UFMG, atuando no Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), com defesa prevista para março de 2021. Possui experiência na área de Biologia Molecular, Genética de microrganismos, Imunologia e Biologia Celular, atuando nos seguintes temas: Biologia molecular e Biotecnologia, desenvolvimento de vacinas gênicas, utilização biotecnológica e terapêutica de Bactérias Lácticas e estudo de Probióticos com potencial terapêutico. Possui experiência como professora de nível superior e técnico.

(Texto informado pelo autor)

**Nome civil**

Nome Viviane Lima Batista

**Dados pessoais**

**Filiação** Jose Carlos Batista e Eliane Lima Vieira Batista

**Nascimento** 30/06/1995 - Ribeirão das Neves/MG - Brasil

**Carteira de Identidade** MG17558418 ssp mg - MG - 30/01/2011


**CPF** 126.113.866-09

**Endereço residencial** Avenida Castelo Branco  
Menezes (Justinoópolis) - Ribeirão das Neves  
33913280, MG - Brasil  
Telefone: 31 36382187  
Celular 31 994096255

**Endereço profissional** Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral  
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627  
Pampulha - Belo Horizonte  
31630902, MG - Brasil  
Telefone: 31 36160758

**Endereço eletrônico** E-mail para contato : viviane.lima.batista@hotmail.com

**Formação acadêmica/titulação**

- 2019** Mestrado em Programa de Pós-graduação em Genética.  
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil  
Título: Avaliação do Efeito Enteroprotetor da Linhagem L. delbrueckii CIDCA 133 morta em modelos murinos de inflamação intestinal.  
Orientador: VASCO ARISTON DE CARVALHO AZEVEDO   
Co-orientador: PAMELA MANCHA AGRESTI  
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2016 - 2018** Graduação em 57305 - Ciências Biológicas - Bacharelado - N.  
Faculdade Pitágoras - Matriz, PITÁGORAS, Belo Horizonte, Brasil  
Título: USO DE PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA PELO ANTINEOPLÁSICO 5-FLUORURACIL.  
Orientador: FRANCISCO CAIRÉS JUNIOR  
 Bolsista do(a): Educa mais Brasil

**Formação complementar**

- 2018 - 2018** Extensão universitária em BIG020 R2 - GENÉTICA I (DISCIPLINA ISOLADA). (Carga horária: 60h).  
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
- 2018 - 2018** Curso de curta duração em BIOTECNOLOGIA.  
Kroton Educacional de Belo Horizonte, KROTON, Belo Horizonte, Brasil
- 2018 - 2018** Curso de curta duração em QUALIDADE DE VIDA.  
Kroton Educacional de Belo Horizonte, KROTON, Belo Horizonte, Brasil
- 2018 - 2018** Extensão universitária em IMUNOLOGIA, MUTAÇÃO E NEOPLASIA.  
Kroton Educacional de Belo Horizonte, KROTON, Belo Horizonte, Brasil
- 2018 - 2018** Curso de curta duração em ANATOMIA E FISIOLOGIA HUMANA.  
Kroton Educacional de Belo Horizonte, KROTON, Belo Horizonte, Brasil
- 2018 - 2018** Extensão universitária em International Meeting - IIV 2018 - Back-Inflam.  
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil

[https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg\\_impov.trata](https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impov.trata)

1/7

15/02/2021

## Currículo Lattes

- 2018 - 2018** Curso de curta duração em RNAs não codificantes. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
- 2018 - 2018** Curso de curta duração em GENÉTICA FORENSE. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
- 2018 - 2018** Extensão universitária em GENÉTICA. Kroton Educacional de Belo Horizonte, KROTON, Belo Horizonte, Brasil
- 2017 - 2017** Curso de curta duração em OFICINA DE ALINHAMENTO PARA ENFRENTAMENTO DA FEBRE AMARELA EM MINAS GERAIS. (Carga horária: 26h). SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS, SES, Brasil
- 2017 - 2017** Curso de curta duração em RESPOSTA AOS DESASTRES DE ORIGEM TECNOLÓGICA. (Carga horária: 26h). SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS, SES, Brasil
- 2018 - 2018** Extensão universitária em INGLÊS. (Carga horária: 60h). CENTRO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, CACS, Brasil
- 2018 - 2018** Extensão universitária em CURSO DE EXTENSÃO: PERITOS E PERICIAS. (Carga horária: 10h). INSTITUTO GALENO, TG, Brasil
- 2016 - 2016** Extensão universitária em BIOLOGIA MARINHA. (Carga horária: 30h). IRV ambiental, IRV, Brasil
- 2016 - 2016** Extensão universitária em ESCRITA E REDAÇÃO. (Carga horária: 36h). ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO A DISTÂNCIA, ABED, Brasil
- 2016 - 2016** Extensão universitária em NOÇÕES BÁSICAS SOBRE ANIMAIS PEÇONHENTOS. (Carga horária: 2h). FACULDADE PITÁGORAS DE BELO HORIZONTE, FAP, Brasil
- 2012 - 2012** APRENDIZ INDUSTRIAL DE PROCESSOS ADMINISTRATIVOS. (Carga horária: 400h). FACULDADE DE TECNOLOGIA SENAI DE BELO HORIZONTE, SENAI, Brasil  
Bolsista do(a): PIPE SISTEMAS DE TUBULAÇÕES

## Atuação profissional

## 1. Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Vínculo  
Institucional

- 2020 - 2020** Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Estágio em docência, Carga horária: 8, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Experiência didática adquirida como docente. Lecionei sob supervisão dos professores Dr. Vasco Azevedo e Dra. Pamela Mancha Agresti aulas de Genética para o curso de graduação em medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. (disciplina Genética e Evolução 60h)
- 2019 - Atual** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
- 2018 - 2018** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva  
Outras informações:  
Bolsista de iniciação científica CNPq vinculado ao projeto "Avaliação do efeito protetor de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA133 em modelo de mucosite Intestinal induzido pelo antineoplásico 5-Fluorouracil.
- 2017 - 2017** Vínculo: VOLUNTÁRIO, Enquadramento funcional: INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Carga horária: 20, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Iniciação científica voluntária com ênfase em Genética molecular e de Microrganismo. Linhas de Pesquisa: expressão de proteínas em sistemas heterólogos, desenvolvimento de vacinas gênicas, utilização biotecnológica e terapêutica de Bactérias Láticas e Probióticas.
- 2017 - 2018** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva  
Outras informações:  
bolsista de iniciação científica CNPq vinculado ao projeto "Lactococcus lactis MG1363 como veículo de entrega de um plasmídeo vacinal/terapêutico codificando a proteína hsp65 de *Mycobacterium leprae*: perspectivas para o tratamento da esclerose múltipla em modelos animais.

## Atividades

- 07/2018 - Atual** Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral  
Linhas de pesquisa:  
Avaliação do efeito protetor de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA133 em modelo de mucosite Intestinal induzido pelo antineoplásico 5-Fluorouracil.
- 08/2017 - 07/2018** Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral  
Linhas de pesquisa:  
Lactococcus lactis MG1363 como veículo de entrega de um plasmídeo vacinal/terapêutico codificando a proteína hsp65 de *Mycobacterium leprae*: perspectivas para o tratamento da esclerose múltipla em modelos animais.

## 2. Secretaria do Estado de Saúde - Governo de Minas - SES/20

Vínculo  
Institucional

- 2018 - 2018** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Estagiário não obrigatório, Carga horária: 20, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Trabalhou com doenças epidemiológicas no estado de Minas Gerais, com o programa da Leishmaniose tegumentar, Leishmaniose visceral, Febre maculosa brasileira e acidentes por animais peçonhentos, tendo ênfase com o controle ambiental, controle epidemiológico, acompanhamento no SINAN, liberação de medicamentos para os agravos mencionados e medidas para controle e prevenção, análise da situação epidemiológica dos agravos correlatos no Estado de Minas Gerais, a partir das informações consolidadas.

## 3. FACULDADE PITÁGORAS DE BELO HORIZONTE - FAP



15/02/2021

Currículo Lattes

**Vínculo  
Institucional**

**2018 - 2018** Vínculo: Voluntário , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 4, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Monitora da disciplina Ciências moleculares e celular

4. Hospital da Baleia - FBO

**Vínculo  
Institucional**

**2013 - 2016** Vínculo: CLT , Enquadramento funcional: RECEPCIONISTA , Carga horária: 40, Regime: Integral  
Outras informações:  
Recepcionista hospitalar na unidade de pronto atendimento Upa Acrizio de Menezes localizada em Ribeirão das Neves, cuja as funções eram: Operar sistema do SUS fñci, auxiliando e monitorando transferências e internações de pacientes, atendimento ao público externo com cadastro no sistema.

5. PD MED SERVIÇOS LTDA/ SOLUMED SERVIÇOS LTDA - PS

**Vínculo  
Institucional**

**2014 - 2016** Vínculo: CLT , Enquadramento funcional: SECRETARIA , Carga horária: 40, Regime: Integral  
Outras informações:  
Secretária de coordenação médica na Unidade de pronto Atendimento Upa Acrizio de Menezes, cujo as funções eram: Assessorar Coordenação Médica quanto às atividades administrativas, no monitoramento do fluxo e da equipe, folha de ponto dos plantonistas, elaborar resposta à documentos oficiais e atendimento ao público externo relacionando as demandas de solicitações de documentos hospitalares.

6. PIPE SISTEMAS TUBULARES LTDA - PIPE

**Vínculo  
Institucional**

**2012 - 2012** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: APRENDIZ EM PROCESSOS ADMINISTRATIVOS , Carga horária: 20, Regime: Parcial  
Outras informações:  
APRENDIZ EM PROCESSOS ADMINISTRATIVOS VINCULADO A BOLSA DA FACULDADE SENAI

**Linhas de pesquisa**

1. Avaliação do efeito protetor de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA133 em modelo de mucosite intestinal induzido pelo antineoplásico 5-Fluorouracil.
2. *Lactococcus lactis* MG1363 como veículo de entrega de um plasmídeo vacinal/terapêutico codificando a proteína hsp65 de *Mycobacterium leprae*: perspectivas para o tratamento da esclerose múltipla em modelos animais.

**Áreas de atuação**

1. Biologia Geral
2. Genética de microrganismos
3. Biologia Molecular
4. Genética Molecular e de Microorganismos
6. Vigilância ambiental
8. Epidemiologia

**Idiomas**

**Inglês** Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem  
**Espanhol** Compreende Bem , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Razoavelmente  
**Francês** Compreende Razoavelmente , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Pouco  
**Português** Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

**Prêmios e títulos**

- 2018** Honorable mention 2 nd place for the poster, UFMG - Associated International Laboratory meeting (LIA)  
**2018** Melhor trabalho área da genética, 71ª Reunião Anual da SBPC  
**2018** Co- autora Relevância Acadêmica XXVII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
**2018** Grande prêmio conceção Ribeiro machado XXVII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
**2018** MENÇÃO HONROSA melhor pôster na área de Biotecnologia no "Gene Time Conference 2018", UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
**2018** MENÇÃO HONROSA NA XXVII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ PRPQ, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
**2018** RELEVÂNCIA ACADÊMICA XXII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
**2017** Melhor pôster IV simpósio de microbiologia, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

[https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg\\_impvcv.trata](https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impvcv.trata)

3/7

## Produção

## Produção bibliográfica

## Artigos completos publicados em periódicos

1. **DOI** BARROSO, FERNANDA ALVARENGA LIMA; DE JESUS, LUIS CLÁUDIO LIMA; DE CASTRO, CAMILA PROSPERI; BATISTA, VIVIANE LIMA; FERREIRA, ÉNIO; FERNANDES, RENATA SALGADO; DE BARROS, ANDRÉ LUIS BRANCO; LECLERQ, SOPHIE YVETTE; AZEVEDO, VASCO; MANCHA-AGRESTI, PAMELA; DRUMOND, MARIANA MARTINS Intake of *Lactobacillus delbrueckii* (pEstHsp65) Prevents the Inflammation and the Disorganization of the Intestinal Mucosa in a Mouse Model of Mucositis. *Microorganisms*, **9**, p.107 - , 2021.
2. **DOI** TAVARES, LAISA M.; DE JESUS, LUIS G. L.; DA SILVA, TALES F.; BARROSO, FERNANDA A. L.; BATISTA, VIVIANE L.; COELHO-ROCHA, NINA D.; AZEVEDO, VASCO; DRUMOND, MARIANA M.; MANCHA-AGRESTI, PAMELA Novel Strategies for Efficient Production and Delivery of Live Biotherapeutics and Biotechnological Uses of *Lactococcus lactis*: The Lactic Acid Bacterium Model. *FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY*, **9**, p.1 - , 2020.
3. **DOI** BATISTA, VIVIANE LIMA; DA SILVA, TALES FERNANDO; DE JESUS, LUIS CLÁUDIO LIMA; COELHO-ROCHA, NINA D.; BARROSO, FERNANDA ALVARENGA LIMA; TAVARES, LAISA MACEDO; AZEVEDO, VASCO; MANCHA-AGRESTI, PAMELA; DRUMOND, MARIANA MARTINS Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis. *Frontiers in Microbiology*, **11**, p.1 - , 2020.
4. **DOI** DE CASTRO, CAMILA PROSPERI; DRUMOND, MARIANA M.; BATISTA, VIVIANE L.; NUNES, AMANDA; MANCHA-AGRESTI, PAMELA; AZEVEDO, VASCO Vector Development Timeline for Mucosal Vaccination and Treatment of Disease Using *Lactococcus lactis* and Design Approaches of Next Generation Food Grade Plasmids. *Frontiers in Microbiology*, **9**, p.1805 - , 2018.

## Capítulos de livros publicados

1. BATISTA, VIVIANE LIMA; DA SILVA, TALES FERNANDO; JESUS, Luis Claudio Lima de; TAPIA-COSTA, A. P.; DRUMOND, MARIANA M.; AZEVEDO, V.; MANCHA-AGRESTI, PAMELA Lactic Acid Bacteria as Delivery Vehicle for Therapeutics Applications In: *Lactic Acid Bacteria as Delivery Vehicle for Therapeutics Applications*. 2018, 2020, v.2183, p. 447-459.
2. FERNANDA ALVARENGA LIMA BARROSO; Luis Claudio Lima de Jesus; VIVIANE LIMA BATISTA; LAISA MACEDO TAVARES; RAFAEL ASSIS; MARIANA MARTINS DRUMOND; VASCO AZEVEDO; PAMELA MANCHA-AGRESTI The Gastrointestinal Disease to the Microbiota Treatment: From the Present to the Future In: *The Gastrointestinal Disease to the Microbiota Treatment: From the Present to the Future*. 2 ed. LAS VEGAS: Open Access eBooks, 2019, v.2, p. 1-33.

## Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. VIVIANE LIMA BATISTA ANNALS OF INFLAMMA IV – 2018 In: INFLAMMA IV – 2018, 2019, belo horizonte. A FUNCTIONAL EVALUATION OF A RECOMBINANT LINEAGE OF *Lactococcus lactis* MG1383 DELIVERING THE VACCINE PLASMID PEKU:hsP66: PERSPECTIVES FOR COLITIS IN A MURINE MODEL. , 2018.
2. NINA DIAS COELHO ROCHA ; MARIANA MARTINS DRUMOND ; CAMILA PROSPERI DE CASTRO; Luis Claudio Lima de Jesus; VIVIANE LIMA BATISTA ANNALS OF INFLAMMA IV – 2018 91 In: Fifth International Symposium on Inflammatory Diseases, 2018, belo horizonte. ENCAPSULATED LACTOCOCCUS LACTIS AS AN ALTERNATIVE TO IMPROVE DNA VACCINES DELIVERY IN GASTROINTESTINAL TRACT. , 2018. p.90 -
3. BATISTA, V. L.; DE JESUS, L.C. L.; COELHO-ROCHA, N.D.; CARVALHO, A.; LIMA, F.; SANTOS, Spencer Silva ; MARTINS, Flaviano dos Santos ; FERREIRA, Énio; Renata Salgado Fernandes; DE BARROS, André Luis Branco; DRUMOND, MARIANA M.; PROSPERI, C.; Mancha Agresti, P.; AZEVEDO, VASCO avaliação do efeito protetor da linhagem recombinante *lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 (PEKU:HSPE6) em modelo de mucosite intestinal Induzido pelo antineoplásico 5-fluorouracil In: V SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFPM, 2018, belo Horizonte. RESUMO V SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFPM. , 2018.
4. DRUMOND, MARIANA M.; JESUS, Luis Claudio Lima de; CARVALHO, André; SANTOS, Spencer Silva ; MARTINS, Flaviano dos Santos ; FERREIRA, Énio; SALGADO, Renata ; DE BARROS, André Luis Branco; BATISTA, VIVIANE L.; COELHO-ROCHA, NINA DIAS; MANCHA-AGRESTI, PAMELA; AZEVEDO, VASCO FERMENTED MILK BY LACTOBACILLUS DELBRUECKII CIDCA 133 IS ABLE TO AMELIORATE THE CHEMOTHERAPY- INDUCED INTESTINAL MUCOSITES IN BALB/C MICE In: TARGETING MICROBIOTA, 2018, PORTUGAL. 8th World Congress on Targeting Microbiota Towards Clinical Revolution. Porto, Portugal: International Society of Microbiota, 2018. v.5.
5. ANDRÉ DE CARVALHO; Luis Claudio Lima de Jesus; VIVIANE LIMA BATISTA; NINA DIAS COELHO ROCHA ; Spencer Silva Santos; Flaviano dos Santos martins ; AMANDA NUNES; Énio Ferreira; Renata Salgado Fernandes; André Luis Branco de Barros; MARIANA MARTINS DRUMOND ; PAMELA MANCHA-AGRESTI; VASCO AZEVEDO INFLAMMA IV – 2018 In: ANNALS OF INFLAMMA IV – 2018 148, 2018, BELO HORIZONTE. THERAPEUTIC EFFECT OF *Lactobacillus delbrueckii* SUBSP. LACTIS CIDCA 133 ON 6-FU-INDUCED INTESTINAL MUCOSITIS. , 2018.
6. AMANDA NUNES; ANDRÉ DE CARVALHO; Luis Claudio Lima de Jesus; NINA DIAS COELHO ROCHA ; VIVIANE LIMA BATISTA; PAMELA MANCHA-AGRESTI; MARIANA MARTINS DRUMOND ; AZEVEDO, V. INFLAMMA IV – 2018 In: STUDY OF THE LOCATION OF THE GASTROINTESTINAL TRACT OF LACTOCOCCUS LACTIS AND LACTOBACILLUS CASEI THROUGH THE EXPRESSION OF TWO RECOMBINANT EGFP AND MCHERRY PROTEINS ENCODED BY THE VECTOR PEKU, 2018, BELO HORIZONTE. STUDY OF THE LOCATION OF THE GASTROINTESTINAL TRACT OF LACTOCOCCUS LACTIS AND LACTOBACILLUS CASEI THROUGH THE EXPRESSION OF TWO RECOMBINANT EGFP AND MCHERRY PROTEINS ENCODED BY THE VECTOR PEKU. , 2018.
7. **DOI** VIVIANE LIMA BATISTA; Luis Claudio Lima de Jesus; NINA DIAS COELHO ROCHA ; ANDRÉ DE CARVALHO; FERNANDA ALVARENGA LIMA BARROSO; Spencer Silva Santos; Flaviano dos Santos Martins; Énio Ferreira; Renata Salgado Fernandes; André Henrique Barbosa de Carvalho; MARIANA MARTINS DRUMOND ; CAMILA PROSPERI DE CASTRO; PAMELA MANCHA-AGRESTI; AZEVEDO, V. Protective effect of recombinant strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 In: Gene Time Conference, 2018, Belo Horizonte. Caderno de Resumo Gene Time Conferencoes. , 2018. v.1.
8. NINA DIAS COELHO ROCHA ; Luis Claudio Lima de Jesus; VIVIANE LIMA BATISTA; ANDRÉ DE CARVALHO; FERNANDA ALVARENGA LIMA BARROSO; MARIANA MARTINS DRUMOND ; PAMELA MANCHA-AGRESTI; VASCO AZEVEDO

15/02/2021

Currículo Lattes

- The Therapeutic effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp.lactis CIDCA 133 on Intestinal mucosites In: Gene Time conference 2018, 2018, belo Horizonte. Resumo Gene Time Conferenoe 2018. , 2018.
9. Luis Cláudio Lima de Jesus; VIVIANE LIMA BATISTA; ANDRE DE CARVALHO; NINA DIAS COELHO ROCHA ; FERNANDA ALVARENGA LIMA BARROS; Spencer Silva Santos; Flaviano dos Santos Martins; Énio Ferreira; Renata Saigado Fernandes; André Luis Branco de Barros; MARIANA MARTINS DRUMOND ; PAMELA MANCHA -AGRESTI; VASCO AZEVEDO Therapeutic effect of milk fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp.lactis CIDCA 133 on 5-FU- induced Intestinal mucositis In: Gene time Conference 2018, 2018, Belo Horizonte. Resumo Gene Time Conferenoe 2018. , 2018.
  10. de Carvalho, A.H.B.; DE JESUS, L.C. L.; BATISTA, V. L.; COELHO-ROCHA, N.D.; SANTOS, Spencer Silva ; NUNES, AMANDA; FERREIRA, Énio; DRUMOND, MARIANA.M.; DE CASTRO, CAMILA PROSPERI; MANCHA-AGRESTI, PAMELA; AZEVEDO, VASCO THERAPEUTIC EFFECT OF WILD TYPE AND RECOMBINANT *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SUBSP.LACTIS CIDCA 133 ON 5-FU-INDUCE INTESINAL MUCOSITIS In: 2018 International Congress of Genetics, 2018, Foz do Iguaçu. Abstracts-2018 International Congress of Genetics -, , 2018.
  11. COELHO-ROCHA, N.D.; DE JESUS, L.C. L.; BATISTA, V. L.; CARVALHO, A.; LIMA, F.; PROSPERI, C.; MACHA-AGRESTI, DRUMOND, MARIANA.M.; AZEVEDO, VASCO VACINA DE DNA ENTREGUE POR *Lactococcus lactis* COMO PROMISSOR MÉTODO PROFILÁTICO/TERAPÉUTICO CONTRA ESTREPTOCOCCOSE EM PEIXES In: V SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG, 2018, belo Horizonte. RESUMO V SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG. , 2018.
  12. COELHO-ROCHA, N.D.; MACHA-AGRESTI, DRUMOND, M. M.; BATISTA, V. L.; DE JESUS, L.C. L.; PROSPERI, C.; AZEVEDO, V. ANÁLISE FUNCIONAL DO VETOR PEXU CODIFICANDO A ORF DO GENE REPÓRTER M-CHERRY, UTILIZANDO BACTÉRIAS LÁTICAS COMO VEÍCULO DE ENTREGA In: IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG, 2017, belo Horizonte. CADERNO DE RESUMO IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG. , 2017.
  13. BATISTA, V. L.; ROCHA, N. D. C.; DE JESUS, L.C. L.; PROSPERI, C.; Mancha Agrest, F; DRUMOND, MARIANA.M.; AZEVEDO, V. construção e avaliação funcional de um plasmídeo terapêutico para expressão da proteína HSP65 de *Mycobacterium leprae* em células mamíferas utilizando uma linhagem de bactéria láctica como veículo carreador In: IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG, 2017, belo Horizonte. IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG. , 2017.

#### Apresentação de trabalho e palestra

1. VIVIANE LIMA BATISTA Mecanismo de ação dos probióticos em doenças inflamatórias intestinais, 2020. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)
2. ASSIS, R.; DE JESUS, L.C. L.; BATISTA, V. L. ADMINISTRAÇÃO ORAL DA VACINA DE DNA HSP 86 ENTREGUE POR *Lactococcus lactis* EM MODELO DE COLITE INDUZIDA POR DSS, 2019. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
3. NINA DIAS COELHO ROCHA ; MARIANA MARTINS DRUMOND ; Luis Cláudio Lima de Jesus; VIVIANE LIMA BATISTA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* CIDCA 133 CARREANDO O PLASMÍDEO VACINAL PEXU:HSP65 PREVINE A MUCOSITE INTESTINAL EM MODELO MURINO, 2019. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
4. TAVARES, L. M.; BATISTA, V. L. ASSOCIAÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE *LACTOCOCCUS LACTIS* NCDO 2118 CARREANDO pExu p 62 e pXlee 86 p 62 REDUZ OS SINTOMAS DA COLITE INTESTINAL EM MODELO MURINO apresentado, 2019. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
6. SILVA, T. F.; DE JESUS, L.C. L.; MADUREIRA, V.; ASSIS, R.; SOUZA, E. S. S.; PAZ, J.; COELHO-ROCHA, NINA DIAS; BATISTA, V. L. EXPRESSÃO DE MCHERRY EM ENTEROCITOS DE PEIXE PÓS ADMINISTRAÇÃO ORAL COM A CEPA RECOMBINANTE *L. LACTIS* MG 1383 (PEXU MCHERRY), 2019. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
6. BATISTA, V. L. *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SUBSP LACTIS CIDCA 133 (pExu HSP 86 ATENUA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA PELO ANTINEOPLÁSICO 5-FU, 2019. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
7. TAVARES, L. M.; DE JESUS, L.C. L.; ASSIS, R.; SOUZA, E. S. S.; PAZ, J.; CAVALCANTE, B. M; ROCHA, N. D. C.; BATISTA, V. L. mCherry expression by *lactococcus lactis* after oral administration of recombinant *L. lactis* MG1383 (pExu:moherry)", 2019. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
8. VIVIANE LIMA BATISTA Mesa redonda Ciências da Saúde, 2019. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)
9. VIVIANE LIMA BATISTA O mercado de trabalho para o biólogo Genetista, 2019. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)
10. DE JESUS, L.C. L.; ASSIS, R.; SOUZA, E. S. S.; PAZ, J.; CAVALCANTE, B. M; SILVA, C.C.M; COELHO-ROCHA, N.D.; TAVARES, L. M.; BATISTA, V. L. Oral delivery of Hsp65 DNA vaccine by *L. delbrueckii* CIDCA 133 attenuates 5-FU-Induced intestinal mucositis, 2019. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
11. BATISTA, V. L. Oral delivery of *Lactococcus lactis* carrying the pExu DNA expression vector coding for p62 and the p62-producing by *L. lactis* ameliorates inflammatory intestinal disease in mice, 2019. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
12. COELHO-ROCHA, N.D.; BATISTA, V. L. "Screening of potential probiotic bacteria for future applications in therapy or prevention of intestinal disease", 2019. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
13. ASSIS, R.; DE JESUS, L.C. L.; BATISTA, V. L. Use of a recombinant lineage of *Lactococcus lactis* MG1383 as delivery vector of the vaccine plasmid pExu:hsp65 in murine model of DSS-Induced colitis, 2019. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
14. VIVIANE LIMA BATISTA; ANDRE DE CARVALHO; DE JESUS, L.C. L.; NINA DIAS COELHO ROCHA ; CAMILA PROSPERI DE CASTRO; MARIANA MARTINS DRUMOND ; AMANDA NUNES; PAMELA MANCHA -AGRESTI; AZEVEDO, V A FUNCTIONAL EVALUATION OF A RECOMBINANT LINEAGE OF *Lactococcus lactis* MG1383 DELIVERING THE VACCINE PLASMID pExu:hsp65: PERSPECTIVES FOR COLITIS IN A MURINE MODEL, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
16. BATISTA, V. L.; DE JESUS, L.C. L.; ROCHA, N. D. C.; CARVALHO, A.; LIMA, F.; SANTOS, Spencer Silva ; MARTINS, Flaviano dos Santos ; FERREIRA, Énio; DE BARROS, André Luis Branco; DRUMOND, MARIANA.M.; PROSPERI, C.; MACHA-AGRESTI; AZEVEDO, VASCO avaliação do efeito protetor da linhagem recombinante *lactobacillus delbrueckii* subsp.lactis CIDCA 133 (PEXU:HSP65) em modelo de mucosite intestinal induzido pelo antineoplásico 5-fluorouracil, 2018. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
18. VIVIANE LIMA BATISTA; Luis Cláudio Lima de Jesus; ANDRE DE CARVALHO; NINA DIAS COELHO ROCHA ; CAMILA PROSPERI DE CASTRO ; MARIANA MARTINS DRUMOND ; FERNANDA ALVARENGA LIMA BARROS; PAMELA MANCHA -AGRESTI; VASCO AZEVEDO *LACTOCOCCUS LACTIS* MG1383 COMO VEÍCULO DE ENTREGA DE UM PLASMÍDEO

[https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg\\_impov.trata](https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impov.trata)

5/7

15/02/2021

## Currículo Lattes

- VACINAL/TERAPÊUTICO CODIFICANDO A PROTEÍNA HSP65 DE MYCOBACTERIUM LEPRAE: PERSPECTIVAS PARA O TRATAMENTO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA EM MODELOS ANIMAIS, 2018. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
17. VIVIANE LIMA BATISTA; Luis Cláudio Lima de Jesus; NINA DIAS COELHO ROCHA; ANDRE DE CARVALHO; FERNANDA ALVARENGA LIMA BARROSO; Spencer Silva Santos; Flaviano dos Santos Martins; Renata Salgado Fernandes; André Luis Branco de Barros; DRUMMOND, M. M.; CAMILA PROSPERI DE CASTRO; PAMELA MANCHA -AGRESTI; VASCO AZEVEDO  
Protective effect of recombinant strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 (pEx: hsp65) on Intestinal mucositis, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
  18. MARIANA DRUMOND; NINA DIAS COELHO ROCHA; Luis Cláudio Lima de Jesus; VIVIANE LIMA BATISTA; CAMILA PROSPERI DE CASTRO; SOPHIE LECLERQ; VASCO AZEVEDO; PAMELA MANCHA -AGRESTI  
THE FUNCTIONAL PEKU PLASMID, CARRIED BY LACTOCOCCUS LACTIS MG1363, ENABLES THE PROTEIN EXPRESSION BY EUKARYOTIC CELLS AFTER MICE GAVAGE, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
  19. NINA DIAS COELHO ROCHA; Luis Cláudio Lima de Jesus; VIVIANE LIMA BATISTA; ANDRE DE CARVALHO; FERNANDA ALVARENGA LIMA BARROSO; DRUMMOND, M. M.; PAMELA MANCHA -AGRESTI; VASCO AZEVEDO  
The therapeutic effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 on Intestinal mucositis, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
  20. Luis Cláudio Lima de Jesus; VIVIANE LIMA BATISTA; ANDRE DE CARVALHO; NINA DIAS COELHO ROCHA; FERNANDA ALVARENGA LIMA BARROSO; Spencer Silva Santos; Ério Ferreira; Renata Salgado Fernandes; André Luis Branco de Barros; M.MARTINS DRUMOND; PAMELA MANCHA -AGRESTI; VASCO AZEVEDO  
Therapeutic effect of milk fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 on 6-FU Induced Intestinal mucositis, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
  21. Andre Henrique barbosa de carvalho; Luis Cláudio Lima de Jesus; VIVIANE LIMA BATISTA; NINA DIAS COELHO ROCHA; Spencer Silva Santos; Flaviano dos Santos Martins; AMANDA NUNES; Ério Ferreira; Renata Salgado Fernandes; André Luis Branco de Barros; MARIANA MARTINS DRUMOND; PAMELA MANCHA -AGRESTI; VASCO AZEVEDO  
Therapeutic effect of wild type and recombinant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 on 6-FU Induced Intestinal mucositis, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
  22. VIVIANE LIMA BATISTA  
USO DE PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA PELO ANTINEOPLÁSICO 5-FLUORURACIL, 2018. (Outra, Apresentação de Trabalho)
  23. S.FERREIRA PIRES; L.C LIMA DE JESUS; N. Dias Coelho-Rocha; M. Martins Drumond; P. Mancha-Agresti; V. Azevedo; BATISTA, V. L.  
Utilização de bactérias lácticas como veículo de entrega de plasmídeos vacinais/terapêuticos codificando os dominios proteicos ABA-B e ABA-F de *Azoarcus lumbricoloides* som polenolol aplicação na área de vacinologia, 2018. (Outra, Apresentação de Trabalho)
  24. COELHO-ROCHA, N.D; Mancha Agresti, P; DRUMMOND, M. M.; BATISTA, V. L.; DE JESUS, L.C. L.; PROSPERI, C.; AZEVEDO, V.  
ANÁLISE FUNCIONAL DO VETOR PEKU CODIFICANDO A ORF DO GENE REPÓRTER M-CHERRY, UTILIZANDO BACTÉRIAS LÁCTICAS COMO DE ENTREGA, 2017. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
  25. BATISTA, V. L.; ROCHA, N.; DE JESUS, L.C. L.; PROSPERI, C.; Mancha Agresti, P; DRUMMOND, M. M.; AZEVEDO, V.  
CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE UM PLASMÍDEO TERAPEUTICO PARA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HSP65 DE *Mycobacterium leprae* EM CÉLULAS MAMÍFERAS UTILIZANDO UMA LINHAGEM DE BACTÉRIA LÁCTICA COMO VEÍCULO CARREADOR, 2017. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

Educação e Popularização de C&amp;T

## Apresentação de trabalho e palestra

1. VIVIANE LIMA BATISTA  
USO DE PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA PELO ANTINEOPLÁSICO 5-FLUORURACIL, 2018. (Outra, Apresentação de Trabalho)

## Eventos

Eventos

## Participação em eventos

1. ATUALIZAÇÃO NA VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE Tegumentar, 2018. (Encontro)
2. Darwin Day, 2018. (Seminário)
3. ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DA LETALIDADE POR LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DE MINAS GERAIS, 2018. (Encontro)
4. Febre Amarela: desafios presentes, 2018. (Encontro)
5. Apresentação de Poster / Painel no(a) Fourth International Symposium on Inflammatory Diseases - INFLAMMA IV, 2018. (Congresso)
6. A FUNCTIONAL EVALUATION OF A RECOMBINANT LINEAGE OF *Lactococcus lactis* MG1363 DELIVERING THE VACCINE PLASMID PEKU:hsp65: PERSPECTIVES FOR COLITIS IN A MURINE MODEL.
7. Apresentação de Poster / Painel no(a) GENE TIME CONFERENCE 2018, 2018. (Congresso)
8. Protective effect of recombinant strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133.
7. Semana de Biologia Faculdade Pitágoras, 2018. (Seminário)
8. Apresentação de Poster / Painel no(a) V simpósio de microbiologia da UFMG - Professor Eduardo Oeirão CI, 2018. (Simpósio)
9. avaliação do efeito protetor da linhagem recombinante *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 (PEKU-HSP65) em modelo de mucosite intestinal induzido pelo antineoplásico 5-fluorouracil.
9. visita técnica teste imunopatológico em banco de sangue, 2018. (Encontro)

[https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg\\_impvcv.trata](https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impvcv.trata)

6/7

15/02/2021

## Currículo Lattes

10. Apresentação de Poster / Painel no(a) IV Simpósio de Microbiologia da UFMG- Metabolismo Microbiano: Saúde Ambiental e Biotecnologia, 2017. (Simpósio)  
construção e avaliação funcional de um plasmídeo terapêutico para expressão da proteína HSP65 de *Mycobacterium leprae* em células mamíferas utilizando uma linhagem de bactéria láctica como veículo carreador.
11. III Simpósio de Microbiologia da UFMG - Doenças microbiana Emergentes, 2016. (Simpósio)
12. Seminário animal peçonhentos - Homenagem aos 160 anos de nascimento vital do Brasil, 2016. (Seminário)
13. VISITA TÉCNICA GERENCIAMENTO DE SERVIÇOS DE RESÍDUOS DA SAÚDE, 2015. (Exposição)

## Organização de evento

1. VIVIANE LIMA BATISTA LIA - BACT INFLAM, 2019. (Congresso, Organização de evento)

## Totais de produção

## Produção bibliográfica

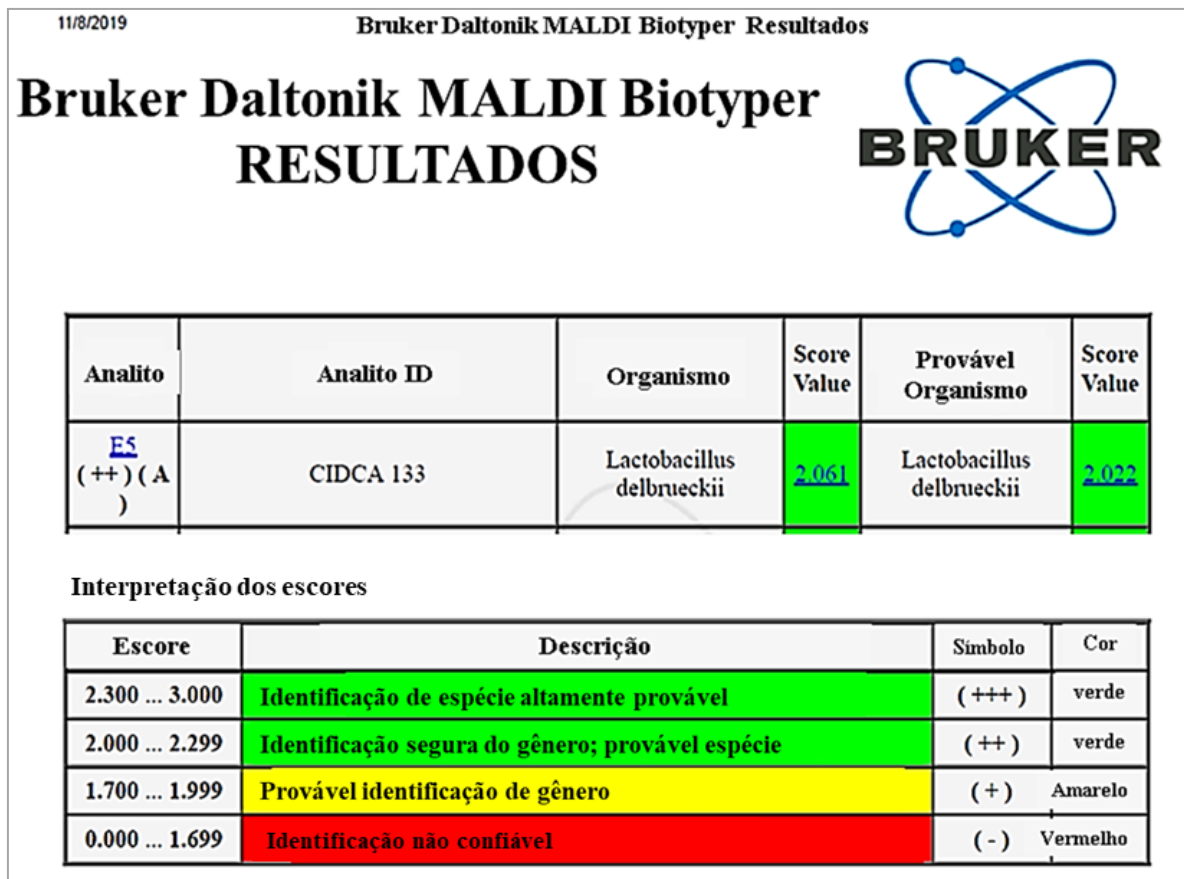
Artigos completos publicados em periódico	4
Capítulos de livros publicados	2
Trabalhos publicados em anais de eventos	13
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra)	3
Apresentações de trabalhos (Congresso)	7
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	13
Apresentações de trabalhos (Outra)	2

## Eventos

Participações em eventos (congresso)	2
Participações em eventos (seminário)	3
Participações em eventos (simpósio)	3
Participações em eventos (encontro)	4
Organização de evento (congresso)	1

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 15/02/2021 às 10:09:55.

## 9.5 Identificação de *L. delbrueckii* CIDCA 133 por MALDI- TOF biotyper e sequenciamento do genoma completo.



5 Figura 1: Identificação de CIDCA 133 por MADI-TOF biotyper. O programa classificou esta cepa como a pertencente a espécies de *L. delbrueckii*.

10 A sequência total do genoma de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 foi feito pelo nosso grupo de pesquisa, usando a plataforma HiSeq 2500 (Illumina, San diego, Ca, EUA), bibliotecas de extremidades emparelhadas (2x 150b.p). As ORFs de codificação de proteínas foram anotadas automaticamente usando o procaryotic genome annotation popelina (PGAP) do NCBI. As sequências do genoma e do plasmídeo foram depositadas no National Center for Biotechnology (NCBI) (Número de acesso: CP065513 e CP065514, respectivamente).

15

## 9.6 Análise das proteínas do sobrenadante de CIDCA 133

As análises das proteínas secretadas pelo sobrenadante de CIDCA 133, foi realizada pelo nosso grupo de pesquisa, em um projeto paralelo, no qual, o artigo foi submetido para publicação e o esboço encontra-se abaixo.



Article

# Probiogenomics of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133: an *in silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches

Luís Cláudio Lima de Jesus <sup>1</sup>, Mariana Martins Drumond <sup>2</sup>, Flávia Figueira Aburjaile <sup>1,3</sup>, Thiago de Jesus Sousa <sup>1</sup>,  
Nina Dias Coelho-Rocha <sup>1</sup>, Rodrigo Profeta <sup>1</sup>, Bertram Brenig <sup>4</sup>, Pamela Mancha-Agresti <sup>5</sup> and Vasco Azevedo <sup>\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 31270-901, Brazil; lc.luis@yahoo.com.br (L.C.J.); faburjaile@gmail.com (F.F.A.); thiagojsousa@gmail.com (T.J.S.); ninadias008@gmail.com (N.D.C-R); profeta.biotec@gmail.com (R.P) and vascoazevedo@gmail.com (V.A)

<sup>2</sup> Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG), Departamento de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 31421-169, Brazil; mundrumond@gmail.com (M.M.D)

<sup>3</sup> Laboratório de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 21040-360, Brazil

<sup>4</sup> Institute of Veterinary Medicine, University of Göttingen, Göttingen, D-37077, Germany; bbrenig@gwdg.de (B.B)

<sup>5</sup> Faculdade de Minas-Faminas-BH, Medicina, Belo Horizonte, 31744-007, Brazil; p.mancha.agresti@gmail.com (P.M-A)

\* Correspondence: vascoazevedo@gmail.com (V.A)

**Abstract:** *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 (CIDCA 133) has been reported as a potential probiotic strain, presenting immunomodulatory properties. This study investigated the possible genes and molecular mechanism involved with a probiotic profile of CIDCA 133 through a genomic approach associated with *in vitro* and *in vivo* analysis. Genomic analysis corroborates the species identification carried out by the classical microbiological method. Phenotypic assays demonstrated that CIDCA 133 could lead to survival to acid, osmotic, and thermal stressors. Besides, this strain plays antibacterial activity against *Salmonella* Typhimurium and presents immunostimulatory properties capable of up-regulating anti-inflammatory cytokines *IL10* and *Tgfb1* gene expression through inhibition of *Nfkb1* gene expression. These reported effects can be associated with secreted, membrane/exposed to the surface and cytoplasmic proteins, and bacteriocins-encoding genes predicted *in silico*. Furthermore, these findings describe the genes and the possible mechanisms used by CIDCA 133 to produce their beneficial host effects and highlight its use as a probiotic microorganism.

**Keywords:** Genomic characterization; phylogenomic; probiotic; *Lactobacillus delbrueckii*; acid and bile tolerance; *Nfkb1* gene expression; surface proteins; bacteriocin

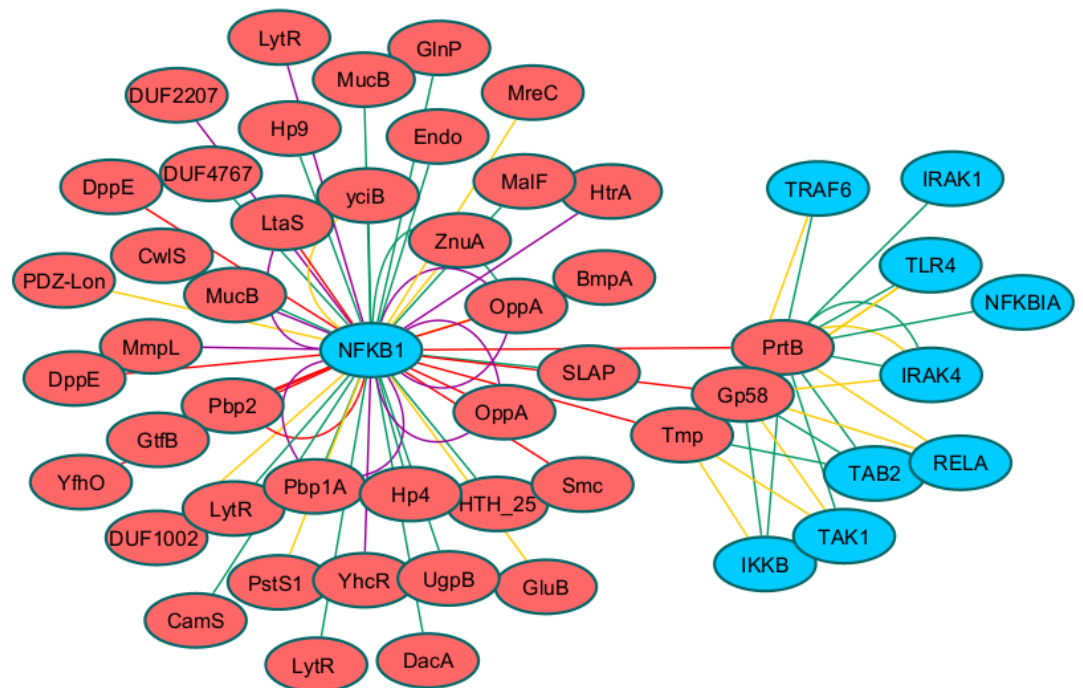
Citation: Lastname, F.; Lastname, F.;  
Lastname, F. Title. *Microorganisms*  
2021, 9, x.  
<https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Last-  
name

Received: date  
Accepted: date

A metodologia do trabalho foi feita usando o software SurfG+, os resultados obtidos, mostram que CIDCA 133 usado neste estudo, possui 1606 proteínas citoplasmática, 312 proteínas de membrana, 156 de superfícies proteicas expostas (PSE) e 58 secretadas (dados aceitos para publicação).

Outro resultado obtido da análise foi a interação da proteína de CIDCA 133 com a proteína humana pelo programa InterSPPI, no qual, previram 74 interações. (Figura 2 e Tabela 1), sendo que, a subunidade p105 do fator nuclear NF-κB, foi a proteína humana com mais interação com CIDCA. Do mesmo modo, uma proteína de superfície celular a PrtB, se sobressaiu e foi a proteína com interação mais frequente.



5 Figura 1: Mapeamento da rede de interação proteína-proteína para a via de sinalização KEGG TLR / NF- $\kappa$ B. Os nós do círculo vermelho representam proteínas de bactérias e os nós do círculo azul representam proteínas humanas. As associações mais fortes são representadas com linhas de cores diferentes. Pontuação de interação: 0,97 (linha amarela), 0,98 (linha verde), 0,99 (linha roxa), 1,0 (linha vermelha).

Tabela 1: InterSPPI humano e a interação da proteína de CIDCA 133

HUMAN ID	BACTERIA ID	Prediction score
TLR4	Gp58	0.9779299847792998
TLR4	PrtB	0.9840566873339238
TLR4	Tmp	0.9781132075471698
IRAK4	Gp58	0.9766081871345029
IRAK4	PrtB	0.9802793755135579
IRAK4	Gp58	0.9766081871345029
IRAK4	PrtB	0.9802793755135579
IRAK1	PrtB	0.980440097799511
TRAF6	Gp58	0.9781132075471698
TRAF6	PrtB	0.9802631578947368
TAB2	Gp58	0.9800332778702163
TAB2	PrtB	0.9854227405247813
TAB2	Tmp	0.9802631578947368
TAK1	Gp58	0.9785884218873909
TAK1	PrtB	0.9849624060150376
TAK1	Tmp	0.9784449576597383
IKKB	Gp58	0.9800332778702163
IKKB	PrtB	0.9855212355212355
IKKB	Tmp	0.979903536977492



NFKB1	CwIS	0.9846889952153111
NFKB1	SLAP	0.9802143446001649
NFKB1	Gp58	1.0
NFKB1	MucB	0.9848484848484849
NFKB1	GtfB	1.0
NFKB1	Pbp2	1.0
NFKB1	DUF1002	0.9765223771093177
NFKB1	DppE	1.0
NFKB1	CamS	0.9851190476190477
NFKB1	MalF	0.9840085287846482
NFKB1	Endo	0.9842243645924628
NFKB1	LytR	0.9803117309269893
NFKB1	MreC	0.9783950617283951
NFKB1	OppA	0.9844789356984479
NFKB1	DacA	0.9843587069864442
NFKB1	Hp4	0.9855212355212355
NFKB1	MucB	0.998109640831758
NFKB1	DppE	1.0
NFKB1	OppA	0.9913473423980222
NFKB1	UgpB	0.9854932301740812
NFKB1	PrtB	1.0
NFKB1	OppA	0.9955089820359282
NFKB1	OppA	0.9944055944055944
NFKB1	LtaS	0.9967213114754099
NFKB1	Pbp1A	0.9982668977469671
NFKB1	OppA	0.9968652037617555
NFKB1	BmpA	0.9791833466773419
NFKB1	HtrA	0.9932885906040269
NFKB1	yciB	0.9779635258358662
NFKB1	yciB	0.9841269841269841
NFKB1	Smc	1.0
NFKB1	LytR	0.9840085287846482
NFKB1	OppA	1.0
NFKB1	YhcR	0.9981981981981982
NFKB1	LytR	0.9912826899128269
NFKB1	OppA	1.0
NFKB1	PstS1	0.9779635258358662
NFKB1	Tmp	1.0
NFKB1	DUF4767	0.9847182425978988
NFKB1	Hp9	0.9895591647331786
NFKB1	MmpL	0.9982238010657194
NFKB1	LtaS	1.0
NFKB1	Pbp2	1.0

<b>NFKB1</b>	YfhO	1.0
<b>NFKB1</b>	PDZ-Lon	0.9787066246056783
<b>NFKB1</b>	GluB	0.979315831344471
<b>NFKB1</b>	ZnuA	0.9780966767371602
<b>NFKB1</b>	GlnP	0.9853211009174312
<b>NFKB1</b>	HTH_25	0.9801652892561984
<b>NFKB1</b>	Pbp1A	0.9967159277504105
<b>NFKB1</b>	Pbp1A	0.9802793755135579
<b>NFKB1</b>	DUF2207	0.9944979367262724
<b>RELA</b>	Gp58	0.9783783783783784
<b>RELA</b>	PrtB	0.9786392405063291
<b>NFKBIA</b>	PrtB	0.980440097799511

