

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

Indianara Machado

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE *Lactobacillus casei* DN114001 NO
TRATAMENTO DE MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FU**

Belo Horizonte

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

5

Indianara Machado

10

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE *Lactobacillus casei* DN114001 NO
TRATAMENTO DE MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FU**

15

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

20

25

Orientador

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins
Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG

30

Belo Horizonte

2018

5

10

15

20

25

30

À minha mãe, Maria Eny Machado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e por todas as graças recebidas.

- 5 À minha mãe, pelo exemplo de coragem e determinação. Por todo amor, dedicação e carinho e por ser minha maior incentivadora.

Ao Tiago, pelo companheirismo, conselhos e amor, e por estar ao meu lado, me apoiando, mesmo com a distância.

10

À Tia Eniza, Tio Fausto, Tia Helenita, Natan e Mateus por terem me acolhido em todo o período que fiquei em BH. Pelo carinho, almoços, filmes e conversas sempre alegres.

- 15 Ao Prof. Flaviano, pelos ensinamentos, pela paciência e dedicação.

Às professoras Dra. Fabiana da Conceição Pereira Tiago e Dra. Elisabeth Neumann, por terem aceitado compor a banca avaliadora de minha dissertação, e à Dra. Sílvia Beleza de Moura, por ter aceitado o encargo de relatora e suplente da banca examinadora. Às professoras Beth e Sílvia, especialmente, agradeço
20 ainda pelas conversas e ensinamentos ao longo do mestrado.

Ao professor Jacques, pelo exemplo de pesquisador.

- 25 Aos colaboradores deste trabalho: Dra. Simone de Vasconcelos Generoso, Dr. Valbert Nascimento Cardoso e Dr. Ênio Ferreira, por nos possibilitar a realização de experimentos que não poderíamos fazer em nosso laboratório.

Aos amigos do LABio: Melina, Vivian, Rodrigo, Mônica, Johnatan, Joana,
30 Spencer, Ericka, Maria Carolina, Bruna, Victor e Gabriela, assim como aos amigos do LEFM, por toda ajuda, conversas alegres e trocas de experiências.

Aos ICs Thamires e Breno, por toda ajuda, conversas e brincadeiras, que tornaram o trabalho mais divertido.

À Melina, Paulo, Lucas, Camila e Roberta pela amizade, momentos de diversão, conversas e conselhos, que tornaram minha estadia em BH mais leve.

5 Ao Rodrigo, Mônica, Vivian e Maria Carolina, Johnatan e Joana, pelas conversas e momentos de descontração.

Ao Rafa por toda ajuda e dicas.

10 A todos os amigos e família, aqui não citados, mas que de alguma forma contribuíram e torceram pelo meu mestrado.

Ao Instituto de Ciências Biológicas e à Universidade Federal de Minas Gerais, por fornecerem condições para a realização desse trabalho, e à CAPES, pela bolsa.

15

20

25

30

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS E COLABORADORES

- 5 Laboratório de Agentes Bioterapêuticos (LABio), Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).
- *Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins*
- 10 Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos (LEFM), Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG.
- *Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli*
- 15 Laboratório de Radioisótopos, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFMG.
- *Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso*
- Laboratório de Patologia comparada, Departamento de Patologia, ICB, UFMG
- *Prof. Dr. Ênio Ferreira*

SUMÁRIO

	RESUMO.....	vii
	ABSTRACT.....	vii
5	LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES.....	ix
	LISTA DE FIGURAS.....	xi
	1 – INTRODUÇÃO.....	12
	1.1 - O trato gastrointestinal.....	12
	1.1.1. Mucosa intestinal.....	12
10	1.1.2. Microbiota intestinal.....	15
	1.2. Mucosite gastrointestinal.....	19
	1.2.2. 5-Fluorouracil.....	20
	1.2.3. Mucosite intestinal e os tratamentos.....	21
	1.3. Probióticos.....	21
15	1.4. O gnero <i>Lactobacillus</i>	22
	1.4.1 <i>Lactobacillus casei</i>	23
	2 – RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	25
	3 – OBJETIVOS.....	26
	3.1 - Objetivo geral.....	26
20	3.2 - Objetivos específicos.....	26
	4 – METODOLOGIA.....	27
	4.1. Micro-organismos.....	27
	4.2. Animais.....	27
	4.3. Desenho experimental.....	27
25	4.4. Indução da mucosite.....	29
	4.5. Tratamento com as bactérias.....	29
	4.6. Avaliação clínica dos animais e consumo de alimento.....	29
	4.7. Determinação da permeabilidade intestinal.....	30
	4.8. Análises histopatológicas do fígado, íleo e jejuno.....	30
30	4.8.1. Coloração HE.....	31

	4.8.2. Técnica combinada de PAS/Alcian Blue.....	31
	4.8.3. Análise das lâminas e fotodocumentação.....	31
	4.8.4 Análises morfométricas.....	32
5	4.9. Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos e eosinófilos através da quantificação de suas enzimas correspondentes: MPO (mieloperoxidase) e EPO (peroxidase eosinofílica).....	32
	4.9.1. Medida da atividade de MPO.....	32
	4.9.2. Medida da atividade de EPO.....	33
	4.10. Dosagem de sIgA.....	34
10	4.11. Quantificações de enterobactérias no fluido intestinal.....	34
	4.12. Análise estatística.....	35
	5 – RESULTADOS.....	36
	5.1 - Avaliação clínica dos animais e consumo de alimento.....	36
	5.2 - Permeabilidade intestinal.....	37
15	5.3 - Análises histopatológicas do fígado, baço e jejuno.....	38
	5.3.1. Fígado.....	38
	5.3.2. Jejunio e íleo.....	38
	5.4. Análises morfométricas.....	41
	5.4.1. Altura das vilosidades intestinais.....	41
20	5.4.2. Quantificação das células caliciformes.....	41
	5.4. Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos e eosinófilos através da quantificação de suas enzimas correspondentes: MPO (mieloperoxidase) e EPO (peroxidase eosinofílica).....	42
	5.4.1. Medida da atividade de MPO.....	42
25	5.4.2. Medida da atividade de EPO.....	42
	5.5. Concentração de sIgA no fluido intestinal.....	43
	5.4. Quantificação de enterobactérias no fluido intestinal.....	43
	6 – DISCUSSÃO.....	45
	7 – CONCLUSÃO.....	53
30	8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
	9 – ANEXO.....	71

RESUMO

A mucosite gastrointestinal é uma das principais e mais graves consequências ocasionadas pela terapia antineoplásica, levando o paciente à debilitação ou até mesmo ao óbito, muitas vezes sendo necessária a interrupção do tratamento quimioterápico. Apesar da frequência e importância clínica, ainda não existe um tratamento efetivo contra a mucosite. Mesmo com avanços na pesquisa, sua patobiologia ainda não está totalmente elucidada; porém, sabe-se que a microbiota indígena está envolvida no seu desenvolvimento. Um dos aspectos da mucosite causada por quimioterápicos, como o 5-fluorouracil (5-FU), é a mudança da microbiota intestinal e, alguns estudos mostram que a microbiota alterada leva ao agravamento da doença. Dessa forma, vê-se a importância dos probióticos, que podem servir de terapia adjuvante na mucosite, por modular a microbiota e a resposta imune. O objetivo desse trabalho foi avaliar se a administração do probiótico *Lactobacillus casei* DN114001 protegeria camundongos contra a mucosite induzida por 5-FU. Nós investigamos o tratamento com a bactéria, administrada de forma preventiva/curativa, avaliando: perda de peso e consumo de alimentos, permeabilidade intestinal, presença de infiltrados de neutrófilos e eosinófilos e níveis de sIgA, além de parâmetros patológicos no nível histológico e a quantidade de enterobactérias. Os resultados mostraram que, no nível histológico, a bactéria proporcionou uma discreta proteção à mucosa intestinal, apresentando uma leve diminuição da permeabilidade intestinal, e do nível de enterobactérias; porém esses resultados não foram estatisticamente diferentes. A bactéria não preveniu a diminuição dos níveis de sIgA e a contagem de células caliciformes, nem o encurtamento das vilosidades intestinais, além de não ter prevenido o aumento de infiltrados de células inflamatórias, e a diminuição do consumo de alimentos, demonstrando ter um efeito muito discreto sobre alguns aspectos da mucosite. Concluiu-se, portanto, que *L. casei* DN114001 não protege os animais contra a mucosite induzida por 5-FU.

30

Palavras-chave: Mucosite, 5-FU, inflamação intestinal, probiótico, *Lactobacillus casei*.

ABSTRACT

The gastrointestinal mucositis is one of the major and most serious consequences of antineoplastic therapy, leading the patient to debilitation or even death, often requiring the interruption of chemotherapy. Despite the frequency and clinical importance, there is still no effective treatment against mucositis. Even with advances in research, its pathobiology has not yet been fully elucidated; however, it is known that the indigenous microbiota is involved in its development. One aspect of mucositis caused by, such as 5-fluorouracil (5-FU), is the change in the intestinal microbiota, and some studies show that the altered microbiota leads to the worsening of the disease. Thus, it's clear the importance of probiotics, which may serve as adjuvant therapy for mucositis, by modulating the microbiota and the immune response. The aim of this study was to evaluate whether administration of the probiotic *Lactobacillus casei* DN114001, would protect mice against 5-FU induced mucositis. We investigated the treatment with the bacteria, administered in a preventive / curative way, evaluating: weight loss and food consumption, intestinal permeability, presence of neutrophil and eosinophil infiltrates and sIgA levels, as well as pathological parameters at the histological level and the amount of enterobacteria. The results showed that, at the histological level, the bacteria provided a slight protection to the intestinal mucosa, presenting a slight decrease in intestinal permeability, and the in level of enterobacteria; however these results were not statistically different. The bacteria did not prevent the decrease of sIgA levels and goblet cell counts, nor the shortening of the intestinal villi. Likewise, it did not prevent an increase in inflammatory cell infiltrates, nor a decrease in food consumption, demonstrating to have a very discrete effect on some aspects of mucositis. It was therefore concluded, that *L. casei* DN114001 does not protect the animals against 5-FU induced mucositis.

Keywords: Mucositis, 5-FU, intestinal inflammation, probiotics, *Lactobacillus casei*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5-FU - 5-fluorouracil
- AGCC - Ácidos graxos de cadeia
- 5 AMP - Peptídeos antimicrobianos
- BAL - Bactérias do ácido láctico
- BCL2 - Proteína linfoma de células B 2
- CEBIO - Centro de Bioterismo
- Células Th2 - Células T auxiliares 2
- 10 CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- COX-2 - Ciclo-oxigenase-2
- cpm - Contagem por minuto
- CTL - Controle
- 15 CV - Animais convencionais
- Da - Daltons
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DO - Densidade ótica
- DTPA - Ácido dietilenoaminopentacético
- 20 EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
- EPO - Peroxidase eosinofílica
- FAO - Organização Alimentar e Agrícola
- HE - Hematoxilina e eosina
- HTAB - Brometo de hexadeciltrimetilamônio
- 25 i.p. - Intraperitoneal
- ICB - Instituto de Ciências Biológicas
- IFN- γ - Interferon gama
- IG - Animais isentos de germes
- IgA - Imunoglobulina A
- 30 IgG - Imunoglobulina B
- IL - Interleucina
- Lc - *Lactobacillus casei*
- LPS - Lipopolissacarídeo
- MBq - Megabecquerel

- MPO - Mieloperoxidase
MRS – *de Mann, Rogosa and Sharpe*
NB2 - Nível de biossegurança 2
NF-κB - Fator Nuclear kappa B
- 5 NLM – Nódulos linfáticos mesentéricos
nNm - Nanômetro
NO - Óxido nítrico
OMS- Organização Mundial da Saúde
OPD - *o*-fenilenodiamina
- 10 PAS/AB - Ácido Periódico Combinado de *Schiff/Alcian Blue*
PBS - Tampão fosfato-salino
pH - Potencial hidrogeniônico
PMSF - Fenil metil sulfonilfluorido
PP - Placas de Peyer
- 15 RNA - Ácido ribonucléico
ROS - Espécies reativas de oxigênio
rpm - Rotações por minuto
SBCAL - Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório
slgA - Imunoglobulina A secretória
- 20 TB - Translocação bacteriana
Tc - Tecnécio
TGI - Trato gastrointestinal
TLR - receptor *Toll-like*
TMB - Tetrametilbenzidina
- 25 TNF - Fator de necrose tumoral
Treg- Célula T regulatória
UFC - Unidade formadora de colônia
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
WHO – *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

	Figura 1: Ações protetoras da microbiota na mucosa intestinal.....	14
	Figura 2: Maturação do TGI através da microbiota.....	15
5	Figura 3: Diagrama que mostra as alterações clínicas que ocorrem durante o desenvolvimento da mucosite.....	17
	Figura 4: A microbiota comensal influencia o desenvolvimento da mucosite.....	18
	Figura 5: Identificação dos grupos e os respectivos tratamentos utilizados.....	28
	Figura 6: Esquema do tratamento dos animais com salina ou <i>L. casei</i> e a posterior indução de mucosite com 5-fluororacil (5-FU).....	28
10	Figura 7: Variação de peso.....	36
	Figura 8: Consumo de alimento.....	37
	Figura 9: Avaliação da permeabilidade intestinal.....	37
	Figura 10: Fotomicrografias do fígado de camundongos BALB/c.....	38
15	Figura 11: Fotomicrografias do jejuno de camundongos BALB/c.....	40
	Figura 12: Fotomicrografias do íleo de camundongos BALB/c.....	40
	Figura 13: Altura de vilosidades.....	41
	Figura 14: Quantificação de células caliciformes.....	41
	Figura 15: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	42
20	Figura 16: Avaliação da atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO).....	43
	Figura 17: Concentração de imunoglobulina A secretora no fluido intestinal.....	43
	Figura 18: Concentração de enterobactérias no intestino delgado.....	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. O trato gastrointestinal

1.1.1. Mucosa intestinal

5 O trato gastrointestinal (TGI), no qual fazem parte órgãos complexos que integram vários processos fisiológicos, se estende da boca até o ânus. A maior parte dos seus componentes apresentam características em comum, como o fato de serem, de um modo geral, tubos ocos compostos por um lúmen circundado por uma parede formada por quatro camadas distintas: mucosa, submucosa,
10 muscular e serosa (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Como um dos principais órgãos do TGI, o intestino desempenha funções importantes para a saúde do organismo, tais como digestão e absorção de macro e micronutrientes e produção de importantes hormônios reguladores. Funciona ainda como órgão imune e exerce função de barreira contra agentes nocivos
15 (DUNCAN & GRANT, 2003). A camada mucosa do intestino desempenha várias funções, dentre elas, a de proteção, lubrificação e transporte do conteúdo luminal e revestimento do epitélio (FORSTNER *et al.*, 1995).

Estudos demonstram que alterações ontogênicas na composição do muco intestinal estão correlacionadas com mudanças contínuas na microbiota indígena,
20 e com a maturação das funções imunológicas (NEUTRA & FORSTNER, 1987; DEPLANCKE *et al.*, 2000). Grandes quantidades de antígenos passam pelo intestino diariamente, tornando a mucosa intestinal o principal sítio de contato entre linfócitos e antígenos em todo o corpo. Além disso, aproximadamente 100 trilhões de bactérias estão associadas ao TGI. Esta rica comunidade microbiana
25 intestinal, conhecida como microbiota, tem co-evoluído em um relacionamento simbiótico, com a mucosa intestinal humana, de tal modo que a microbiota indígena se tornou essencial para a homeostase intestinal (HOOPER & MACPHERSON, 2010; HOOPER *et al.*, 2012).

30 1.1.2. Microbiota intestinal

Logo após o nascimento, o intestino, até então estéril, começa a ser colonizado pelas bactérias da mãe e do meio ambiente. *Escherichia coli*, *Clostridium* e *Streptococcus* são os primeiros a colonizar o TGI e, com a amamentação, surgem as bifidobactérias e os lactobacilos. Logo em seguida,

aparecem os gêneros *Bacteroides*, *Eubacterium* e *Peptococcus* (BOURLIOUX *et al.*, 2006). Dessa maneira, o indivíduo desenvolve sua própria coleção heterogênea de bactérias no TGI (TOIVANEN *et al.*, 2001). Sender e colaboradores (2016) demonstraram em estudos, que a proporção de micro-organismos presentes no corpo humano é de 1:1, sendo o número de micro-organismos muito próximo ao número de células do corpo, pelo fato de a maior quantidade de micro-organismos presentes no hospedeiro se concentrar no intestino, contrastando com outras áreas do corpo humano que possuem baixa ou quase nenhuma concentração de comunidades microbianas.

Essa comunidade é composta por micro-organismos comensais e simbióticos, em sua maioria, bactérias, mas também fungos, *Archaea* e vírus (ARUMUGAM *et al.*, 2011). Indivíduos apresentam composições bacterianas distintas, devido à genética e características individuais, mas fatores ambientais, tais como modo de nascimento, hábitos alimentares e o local onde vive, também influenciam essa microbiota, o que resulta numa grande variabilidade intra e interindividual (PENDERS *et al.*, 2006; HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

Devido a essa grande variedade de micro-organismos no TGI, é proporcionado ao indivíduo hospedeiro recursos não codificados pelo genoma humano (SALZMAN *et al.*, 2007), fornecendo uma diversidade de atividades bioquímicas e metabólicas que complementam e melhoram a fisiologia do hospedeiro, como a produção de ácidos graxos de cadeia curta e vitaminas (K e do complexo B) (SOMMER & BÄCKHED, 2013). Desse modo, os benefícios dessa microbiota podem ser relacionados à nutrição, proteção e desenvolvimento imunológico do indivíduo (BEVINS & SALZMAN, 2011).

Bactérias comensais têm um importante papel na homeostase e também um efeito protetor da integridade intestinal (Figura 1). Suas interações com os receptores *Toll-like* (TLRs) e subsequente ativação da via NF- κ B (Fator Nuclear kappa B), garantem o desenvolvimento de uma resposta imune inata. Essa sinalização, além de contribuir para o controle da homeostase intestinal, mantém a função de barreira, promovendo a reparação e regeneração do tecido, protegendo o intestino de possíveis danos, que podem ser causados por vários fatores, inclusive por doenças no TGI (RAKOFF-NAHOUM *et al.*, 2004; CARIO, 2008; STRINGER, 2013). Estudos já comprovaram que animais isentos de germes (IG), ao contrário dos convencionais (CV), possuem um sistema imune

pouco desenvolvido, demonstrando problemas, por exemplo, na evolução e maturação de folículos linfoides isolados, na produção de anticorpos, apresentando poucos nódulos mesentéricos linfáticos e placas de Peyer (PP) reduzidas, demonstrando, dessa forma, a grande importância dessa estreita relação da microbiota, hospedeiro e sistema imune (FALK *et al.*, 1998; MACPHERSON & HARRIS, 2004; BOUSKRA *et al.*, 2008).

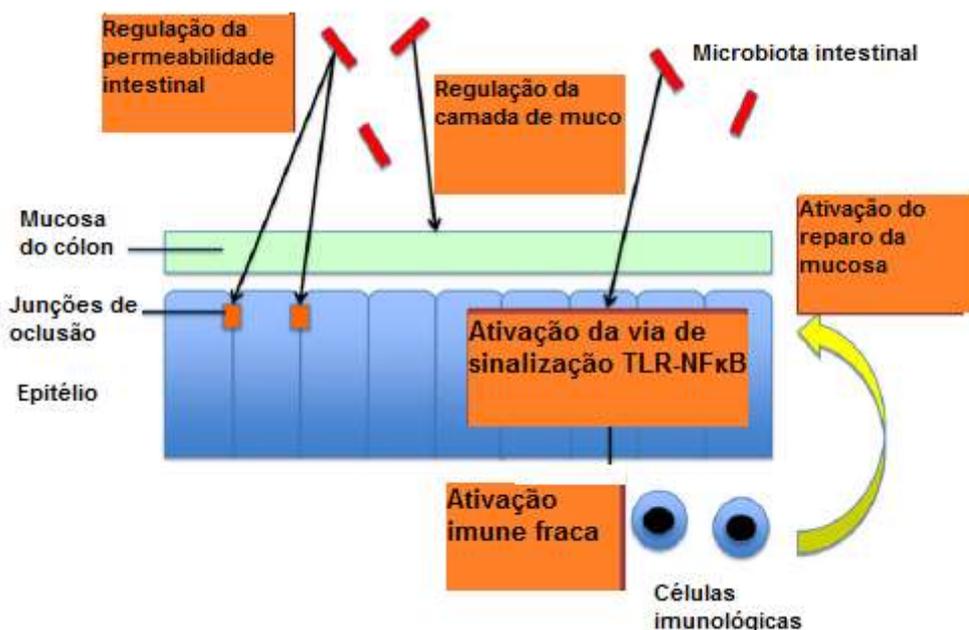


Figura 1: Ações protetoras da microbiota na mucosa intestinal. Fonte: TOUCHEFEU *et al.* (2014). (Adaptado).

Estudos também demonstraram que o intestino de animais IG, em comparação ao dos CV (figura 2), possui menos células caliciformes e uma camada mucosa mais fina (SHARMA *et al.*, 1995), além de uma menor diferenciação de células B em células plasmáticas produtoras de IgA (Imunoglobulina do tipo A), que são sensíveis à, por exemplo, proteína flagelina, presente em grande parte da microbiota intestinal (UEMATSU *et al.*, 2008). Exemplos como esses demonstram a importância de manter a integridade da camada mucosa, para que seja mantido o equilíbrio intestinal. A ativação do sistema imune do hospedeiro, por meio do contato com a microbiota, deve estar perfeitamente regulada para que seja uma relação benéfica e não desenvolva doenças como consequências de inflamações crônicas (SOMMER & BÄCKHED, 2013).

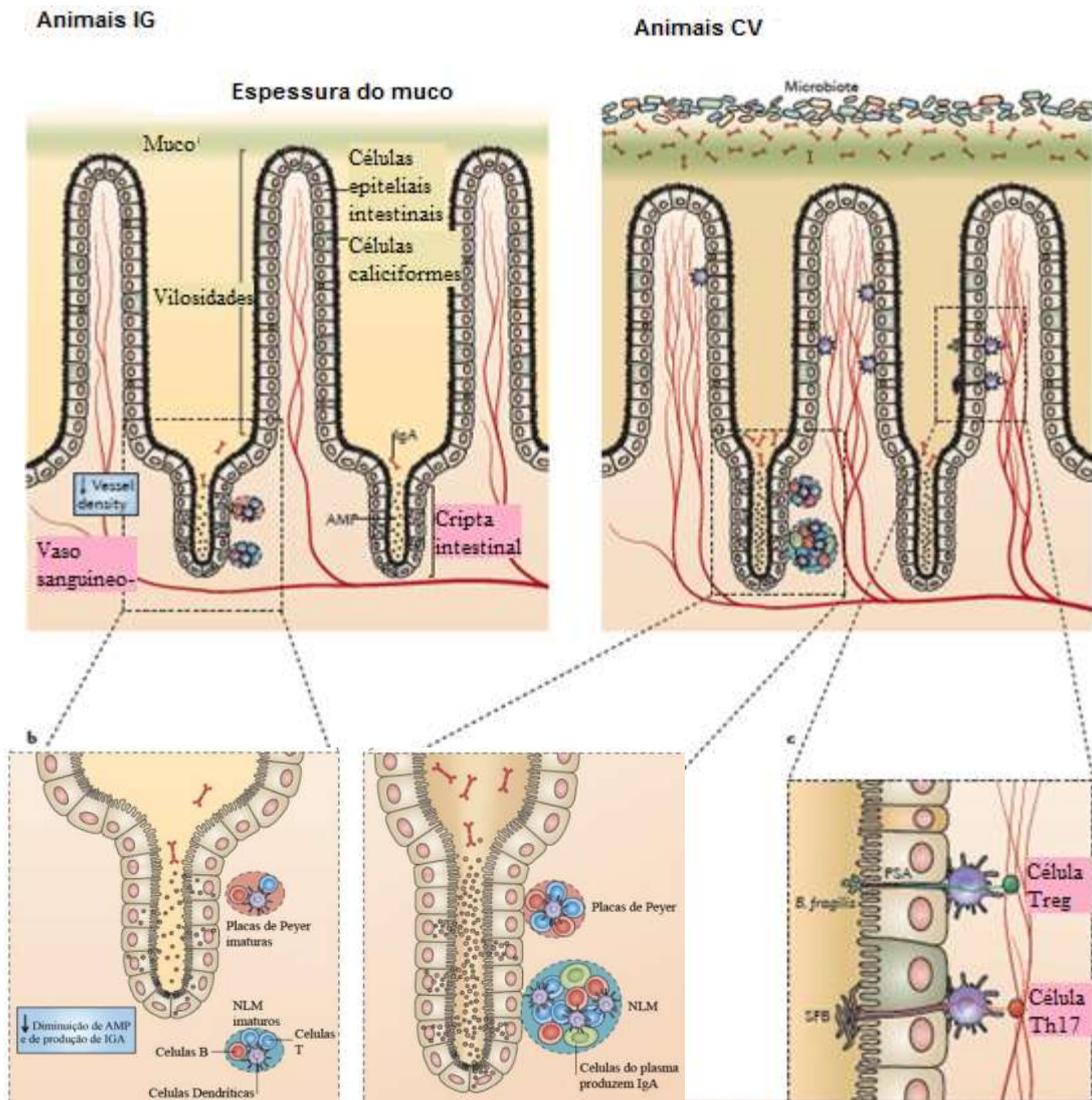


Figura 2: Maturação do TGI por meio da microbiota. Fonte: SOMMER & BÄCKHED, 2013. (Adaptado).

5 1.2. Mucosite gastrointestinal

A mucosite gastrointestinal se caracteriza pela inflamação e perda da barreira celular do trato digestivo, sendo um dos efeitos colaterais mais frequentes em pacientes submetidos à quimio e/ou radioterapia. Devido à gravidade da doença, esta se torna um fator limitante na terapia contra o câncer, justificando interrupções ou reduções no tratamento, levando a um aumento da taxa de morbidade/mortalidade dos pacientes (GIBSON & KEEFE, 2006; FERREIRA *et al.*, 2012).

A mucosite gastrointestinal ocorre em aproximadamente 40% de pacientes após doses padrão de quimioterapia, e em até 100% dos pacientes submetidos a doses elevadas de quimio e radioterapia (ELTING *et al.*, 2003; ELTING *et al.*,

2007), e está associada a muitos sintomas como ulceração, dor abdominal, distensão abdominal, náuseas, vômitos e diarreia (GIBSON & KEEFE, 2006).

De acordo com Sonis (2004), a mucosite é um processo que se desenvolve em cinco fases: iniciação, resposta primária ao dano, amplificação de sinais, ulceração e cicatrização (Figura 3). A fase de iniciação é quando a quimioterapia e/ou radioterapia tem início e agride as células epiteliais e as do tecido conjuntivo, pelo fato de causar dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA), por inibição da topoisomerase e síntese de timidilato. Pode acontecer, também, alterações no ácido ribonucleico (RNA) levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), diminuindo a renovação celular e afetando, em particular, o epitélio e vasos sanguíneos. Na resposta primária ao dano (fase II) ocorre a ativação de NF- κ B, aumentando a regulação da transcrição da ciclo-oxigenase-2 (COX2) e induzindo a expressão de mais de 200 genes, entre eles genes associados às citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β e IL-6. Essas citocinas estimulam enzimas pró-apoptóticas (família BCL2), alterando, assim, os mecanismos de crescimento e diferenciação celular, e dando início aos danos teciduais. A fase III é o resultado da ativação e da autorregulação das citocinas pró-inflamatórias, que provocam danos ao epitélio, endotélio e fibroblastos. No estágio ulcerativo (fase IV), com a perda da integridade da mucosa e consequentes lesões no tecido epitelial, pode ocorrer com mais facilidade, a colonização de patógenos no epitélio, podendo induzir uma bacteremia ou sepse em doentes neutropênicos. Na fase V, denominada cicatrização, quando cessado o estímulo provocado pelo tratamento quimioterápico/radioterápico, sinais provindo da matriz extracelular e mesênquima, induzem as células epiteliais à divisão, migração e diferenciação, permitindo a recuperação da mucosa.

No modelo acima, proposto por Sonis (2004), apesar de muito esclarecedor, não fica claro o papel da microbiota simbiótica presente no TGI, principalmente no intestino, no desenvolvimento da inflamação. Nesse modelo, a microbiota simbiote estaria envolvida apenas na fase de ulceração, elucidando as infecções causadas por micro-organismos patógenos e a necessidade do uso de antibióticos nesse estágio. Contudo, estudos mostram que a microbiota pode ter outros papéis relevantes para a patobiologia da doença (BRANDI *et al.*, 2006; PEDROSO *et al.*, 2015).

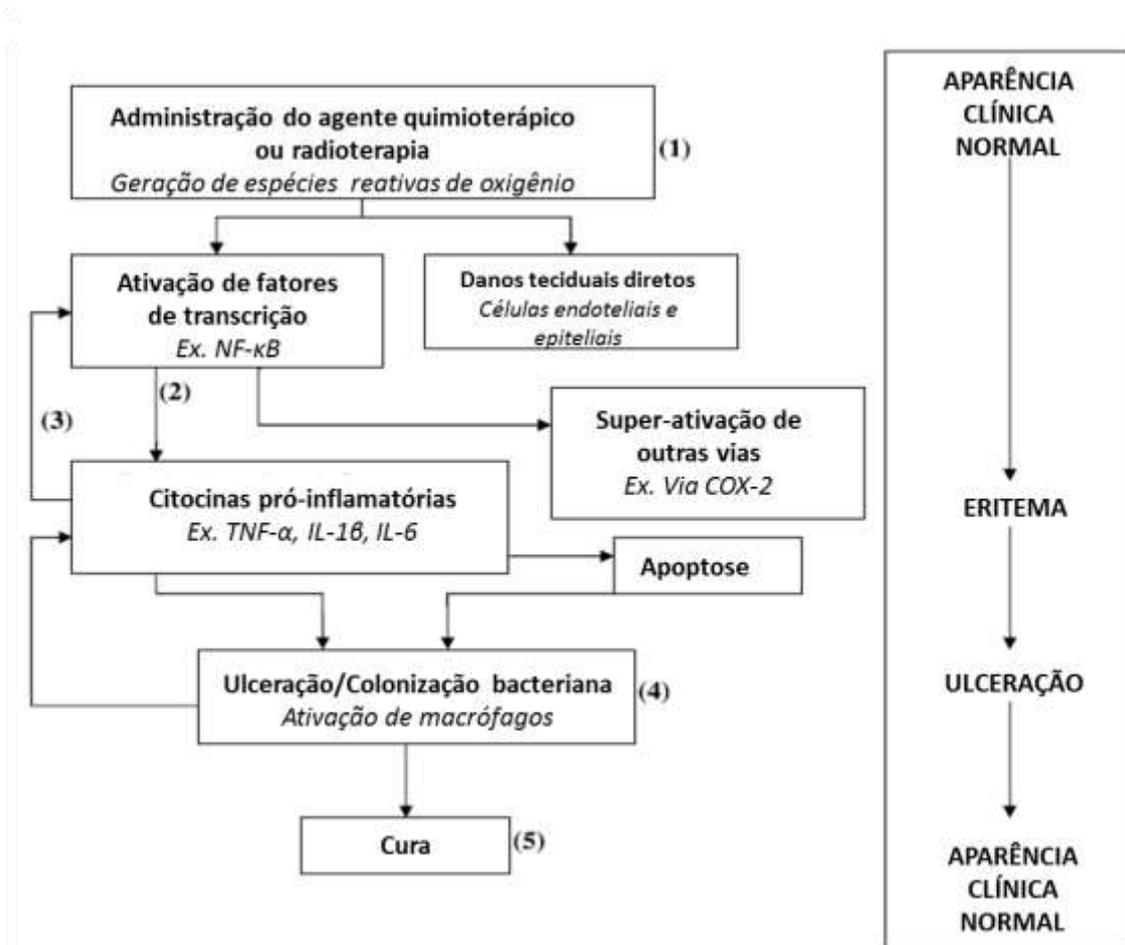


Figura 3: Diagrama que mostra as alterações clínicas que ocorrem durante o desenvolvimento da mucosite. Cinco fases são mostradas: 1- Iniciação; 2- Regulação positiva e geração de mensagem; 3- Sinalização e amplificação; 4- Ulceração; 5- Cura. Fonte: PEDROSO (2015) modificado.

5

Em estudos realizados por Pedroso e colaboradores (2015), é demonstrada a estreita relação entre a microbiota e o desenvolvimento da doença, quando foi observado no intestino de camundongos CV tratados com irinotecano (quimioterápico), características como, a destruição do epitélio, diminuição do tamanho das vilosidades, aumento da permeabilidade intestinal, infiltração de células inflamatórias e alta desorganização de células epiteliais, estavam evidentes; e ao observar o intestino de camundongos IG, submetidos ao mesmo tratamento, não houve alterações intestinais. Além disso, em camundongos IG convencionalizados e tratados com irinotecano, pode ser observado um aumento no dano intestinal semelhante ao dano ocorrido em camundongos CV, reforçando a hipótese de que a microbiota intestinal participa diretamente das alterações histopatológicas induzidas pelo quimioterápico.

15

Diversos estudos demonstram que o uso de quimioterápicos como o 5-fluorouracil (5-FU) e o irinotecano, promovem a modificação da microbiota intestinal em camundogos, estando esses associados ao aumento da taxa de *Escherichia* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., por exemplo, e redução na taxa de *Bacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (VON BULTZINGSLOWEN *et al.*, 2003; IMAOKA *et al.*, 2004; TOUCHEFEU *et al.*, 2014). Essa modificação da microbiota intestinal, com a redução de populações microbianas indígenas, parece de alguma forma influenciar no agravamento da mucosite, exacerbando o processo inflamatório.

Van vliet e colaboradores (2010) descreveram cinco processos (Figura 4), dentre vários, nos quais, a microbiota comensal pode influenciar efetivamente amenizando os sintomas do desenvolvimento da mucosite. Segundo eles a microbiota estaria envolvida 1) na evolução de processos inflamatórios e também na modulação do estresse oxidativo, pois algumas bactérias ao secretarem alguns produtos, influenciam reduzindo os níveis de NF- κ B e a produção de citocinas inflamatórias; 2) na permeabilidade intestinal, uma vez que os micro-organismos agem melhorando a viabilidade celular e a barreira epitelial; 3) aumentando e favorecendo a formação da camada de muco; 4) influenciando a resistência e reparação do epitélio, secretando substâncias, como por exemplo o butirato, que estimula o aumento do trânsito celular, induzindo maiores reparos a danos de diversas causas; e por último 5) influenciando a produção e liberação de moléculas efetoras do sistema imune, regulando, por exemplo, a expressão de sIgA (Imunoglobulina A secretória), que por sua vez conduz a composição de micro-organismos no intestino.

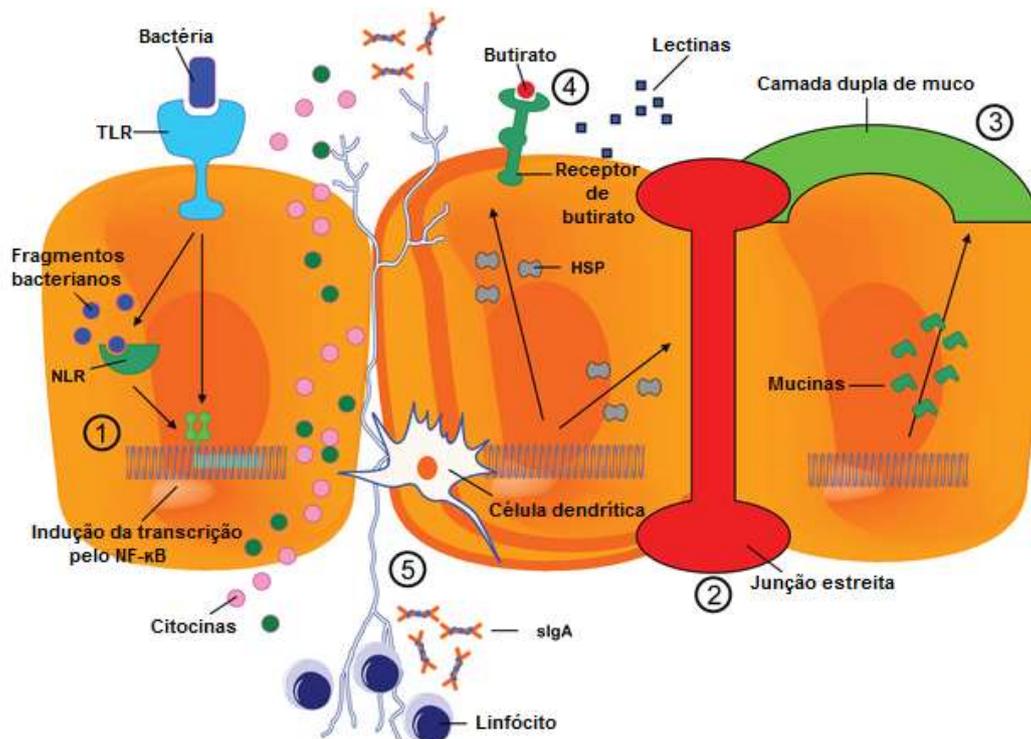


Figura 4: A microbiota comensal influencia o desenvolvimento da mucosite. 1) evolução de processos inflamatórios e modulação do estresse oxidativo; 2) permeabilidade intestinal; 3) formação da camada de muco; 4) resistência e reparação do epitélio; 5) produção e liberação de moléculas efetoras do sistema imune. VAN VLIET *et al.*, 2010 (Adaptado).

5

A dificuldade do acesso à lesão, sendo possível apenas por meios invasivos como endoscopia digestiva com biópsia, justifica a escassez de informação sobre a mucosite intestinal e as hipóteses têm sido baseadas em dados de estudos com animais (FIJLSTRA *et al.*, 2011). Descobrir e entender os mecanismos exatos envolvidos poderia auxiliar na escolha do tratamento, permitindo, assim, uma interrupção do desenvolvimento da mucosite antes da ocorrência dos sinais e sintomas, como a ulceração. Seu tratamento eficaz pode levar a uma melhoria da qualidade de vida do paciente, durante e após o tratamento quimioterápico, possibilitando uma maior probabilidade de cura do câncer.

10

15

1.2.2. 5-Fluorouracil

A quimioterapia é um tratamento muito utilizado para tratar tumores malignos, e pode causar alterações no TGI, afetando os pacientes, principalmente aqueles que recebem altas doses de quimioterápicos. (DE VITA, 1997; KEEFE,

20

2004). Sintomas como dor abdominal, diarreia, azia, inchaço, surgem após o início dos tratamentos e são causados pelo dano extensivo causado pelo uso de quimioterápicos (TAKASUNA *et al.*, 1996; DUNCAN & GRANT, 2003; KEEFE, 2004).

5 O 5-fluororacil é um antineoplásico muito utilizado no tratamento contra câncer de mama, TGI, ovários, cabeça e pescoço. É um análogo estrutural da uracila, e em seu mecanismo de ação, o 5-fluorouracil (5-FU) bloqueia a síntese do DNA e RNA, culminando na apoptose das células cancerosas, mas também das células de tecidos saudáveis com alta taxa de divisão celular (DE VITA, 1997; 10 LONGLEY *et al.*, 2003; GRIVICICH *et al.*, 2012). Como consequência, observa-se a produção de ROS, promoção do estresse oxidativo, ativação de fatores de transcrição e aumento da produção de citocinas inflamatórias (SONIS & FEY, 2002; LONGLEY *et al.*, 2003). Dessa maneira, o TGI é particularmente afetado pela terapia oncológica, devido à sua elevada taxa de renovação celular (alta taxa 15 de divisão celular) realizada pelas células estaminais localizadas nas zonas proliferativas entre as criptas e glândulas, no intestino delgado (DEKANEY *et al.*, 2012).

Um dos indicadores de danos intestinais nos pacientes que se submetem ao tratamento quimioterápico, e uma das características da mucosite é o aumento 20 da permeabilidade intestinal (BLIJLEVENS *et al.*, 2000). Esse aumento da permeabilidade devido à perda da barreira intestinal, provoca a passagem de micro-organismos viáveis, ou não, assim como seus produtos, como o LPS (lipopolissacarídeo), do lúmen intestinal para os nódulos linfáticos mesentéricos e, possivelmente, para outros órgãos, como fígado e baço, evento conhecido como 25 translocação bacteriana (TB) (KATOULI *et al.*, 2009; FOUTS *et al.*, 2012). A presença de citocinas inflamatórias [TNF- α , IL-6 e interferon (IFN)- γ] e óxido nítrico (NO) na mucosa intestinal parece ser um dos fatores responsáveis por desencadear essas alterações (BALZAN *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008; RAPIN & WIERNSPERGER, 2010).

30

1.2.3. Mucosite intestinal e os tratamentos

Apesar da alta incidência nos pacientes em tratamento quimioterápico, e de sua importância clínica, ainda não há um tratamento efetivo para a mucosite, e várias estratégias, como analgesia, antibioticoterapia e nutrição parenteral total,

são utilizadas para amenizar e neutralizar os efeitos adversos da mucosite em pacientes (SONIS, 1998; FILICKO *et al.*, 2003; KEEFE & GIBSON, 2007). No entanto, a modulação do tratamento quimioterápico (uso de doses mais baixas ou intervalos de recuperação longos entre as doses) continua a ser o meio mais eficaz para limitar a progressão e instalação das lesões intestinais. Contudo, ocorre a redução da eficácia da terapia antineoplásica, podendo células cancerosas sobreviver ou recuperar, particularmente quando a total ablação da terapia é necessária. Medidas paliativas para prevenir ou melhorar a mucosite são, dessa forma, muito buscadas (SYMONDS, 1998; FILICKO *et al.*, 2003).

Com a perda da barreira intestinal e consequente aumento da permeabilidade intestinal o risco da ocorrência de infecções é aumentado, sendo a antibioticoterapia muito comum em pacientes com mucosite, além de muitas vezes necessitar de adjuntos nutricionais, incluindo a substituição de fluidos, dietas líquidas por nutrição parenteral total, elevando, dessa forma, ainda mais os gastos financeiros com os pacientes (ELTING *et al.*, 2003; ELTING *et al.*, 2007).

Além de aumentar o risco de infecções, como conhecido, a quimioterapia altera o microbioma intestinal, levando o intestino a uma disbiose (STRINGER *et al.*, 2007) e como citado por Bevins & Salzman (2011), a microbiota intestinal traz inúmeros benefícios, não só para o bom funcionamento do intestino, mas para o organismo em sua totalidade. Como os probióticos agem fornecendo microorganismos ao intestino, numa tentativa de normalizar a microbiota intestinal, portanto, é razoável sugerir que os probióticos possam ser eficazes na melhoria da mucosite (WHITFORD *et al.*, 2009).

1.3. Probióticos

Os probióticos são definidos pela organização mundial da saúde (OMS) como “micro-organismos vivos que conferem benefícios à saúde humana, quando administrados em quantidades adequadas” (FAO/WHO, 2002). Os probióticos são utilizados em três grandes grupos comerciais: preparações farmacêuticas e produtos lácteos, sendo os produtos lácteos o mais representativo deles, constituído por iogurtes, leites fermentados, queijos e sorvetes, nos quais se utilizam frequentemente culturas iniciadoras de lactobacilos ou bifidobactérias como aditivo ou suplemento (TIMMERMAN *et al.*, 2004; SAAD, 2006).

Nas últimas décadas, diversos estudos têm demonstrado a capacidade de linhagens probióticas em desenvolver um efeito protetor em seu hospedeiro, conferindo atividades benéficas, tais como: modulação da microbiota intestinal, imunomodulação, redução de alergias, alívio de gastroenterite aguda, redução da intolerância à lactose e redução da inflamação intestinal. Contribuem também para a nutrição do hospedeiro, atuam contra micro-organismos patogênicos e influenciam na proliferação de células intestinais (GOLDIN 1998; SAXELIN *et al.*, 2005; TURRONI *et al.*, 2011).

Alguns autores também têm mostrado que os probióticos têm influencia na melhoria do quadro de várias doenças gastrointestinais, como doença inflamatória intestinal, síndrome do cólon irritável e diarreia associada ao uso de antibióticos, principalmente aquelas em que a microbiota indígena está modificada levando ao aumento de patógenos. A mucosite é uma dessas doenças em que a microbiota parece desempenhar uma função importante em seu desenvolvimento, uma vez que essa doença parece estar também relacionada com a modificação da microbiota indígena (BRANDI *et al.*, 2006; GIBSON, 2009; PEDROSO *et al.*, 2015).

Os principais micro-organismos utilizados como probióticos são as bactérias do ácido láctico (BAL), como o *Lactobacillus*, as bifidobactérias e algumas leveduras, como a *Saccharomyces boulardii* (VIEIRA *et al.*, 2013). Em especial, as BAL, as quais o gênero *Lactobacillus* faz parte, são capazes de exercer um papel importante na manutenção da saúde e na prevenção de infecções (REID *et al.*, 2003; KLAENHAMMER *et al.*, 2005). Dentre as espécies de lactobacilos conhecidos como probióticos é possível destacar *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus reuteri* por serem utilizados no tratamento e prevenção de várias disfunções, como a diarreia em neonatos (OUWEHAND *et al.*, 2002), a deficiência congênita da enzima lactase e a alergia à proteínas do leite de vaca (MAJAMAA & ISOLAURI, 1997; ROBERFROID, 2000). Muitas das espécies de micro-organismos probióticos capazes de regular o sistema imune são selecionadas a partir das BAL (KITAZAWA *et al.*, 2008).

1.4. O gênero *Lactobacillus*

Lactobacillus são bastonetes Gram-positivo, não esporulados, anaeróbios facultativos ou microaerófilos, fermentadores, e são as bactérias mais utilizadas e estudadas como probióticos (MAKAROVA *et al.*, 2006; KLEEREBEZEM & VAUGHAN, 2009). Muitas das espécies do gênero *Lactobacillus* são encontradas no TGI humano, e seu uso como probióticos têm se tornado cada vez mais comum (WALTER, 2008), pois a permanência e o aumento da concentração desses micro-organismos têm sido associados a inúmeros benefícios ao hospedeiro, como o melhoramento do trânsito e barreira intestinal, além de serem importantes contra a instalação de patógenos no intestino e também trazer benefícios ao sistema imune do hospedeiro, dentre várias outras funções (WATER, 2008; LEYER *et al.*, 2009; ELOE-FADROSH *et al.*, 2015).

Os lactobacilos são encontrados em diversos ambientes, como em alimentos, e também associados a mucosas, como na cavidade oral, vagina e TGI (DOUILLARD *et al.*, 2013). Exemplares como *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. paracasei*, *L. casei* e *L. rhamnosus* têm sido amplamente comercializados devido às suas capacidades de sobreviverem no ambiente “agressivo” do TGI, conseguirem se aderir à mucosa e também por serem micro-organismos não patogênicos, além de conferirem propriedades benéficas para o hospedeiro (SAXELIN *et al.*, 2005; MARCO *et al.*, 2006). O benefício que produtos comercializados contendo os mais diversos *Lactobacillus*, já são demonstrados em estudos clínicos em pacientes com variados tipos de doenças (ALMEIDA *et al.*, 2012; HAJELA *et al.*, 2012).

YEUNG e colaboradores (2013) demonstraram em seu trabalho, em um modelo de salmonelose *in vitro*, que algumas espécies de *Lactobacillus* são capazes de promover manutenção da integridade das junções de oclusão. *Lactobacillus fermentum* BR11 conseguiu reduzir níveis da enzima mieloperoxidase (MPO), amenizando os efeitos da mucosite induzida por 5-FU em ratos (SMITH *et al.*, 2008). Em outro estudo, *L. rhamnosus* CRL1505 foi capaz de melhorar a resposta imune de camundongos durante a recuperação de desnutrição, além de fortalecer a resposta imune do trato respiratório, reduzindo a suscetibilidade à infecção pneumocócica (BARBIERI *et al.*, 2013; HERRERA *et al.*, 2014).

1.4.1 *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei é uma BAL muito utilizada como probiótico, tendo uma grande importância na indústria, é muito utilizada em bebidas lácteas como iogurtes e leite fermentado. Esse micro-organismo já foi isolado de diversos locais, como queijos (produtos lácteos no geral), vinhos, alguns vegetais e também do TGI (KANDLER & WEISS, 1986; SAXELIN, 2005; DOGI *et al.*, 2008). Ele tem sido usado como suplemento nutricional, pois vem demonstrando benefícios no equilíbrio do microbioma intestinal, além de modular a resposta imune, já sendo usado por muitos pacientes antes, durante e após a terapia contra o câncer (KATO *et al.*, 1998; KRISHNAN *et al.*, 2013; SHARMA & DEVI, 2014).

Estudo clínicos mostraram a alta taxa de sobrevivência do *L. casei* no intestino, ao analisar as fezes de indivíduos que consumiram o produto comercial DanActive (OOZEER *et al.*, 2006; ROCHET *et al.*, 2008), sendo a maioria das linhagens de *L. casei* testadas, resistentes a, por exemplo, ácidos e sais biliares, características importantes em probióticos (BROADBENT *et al.*, 2010; HAMON *et al.*, 2012). Rochat e colaboradores (2007) demonstraram em seu trabalho que a linhagem *L. casei* BL23 apresentou características anti-inflamatórias em um modelo animal de colite.

Pesquisas também demonstram o potencial de diversas linhagens de *L. casei* em amenizar efeitos de artrite, diabetes tipo 2, e também um efeito inibitório em células mutantes no câncer de fígado (SO *et al.*, 2008; TEANPAISAN *et al.*, 2009; HAN *et al.*, 2013). A linhagem *L. casei* DN114001 foi capaz de reduzir a duração e a severidade de diarreia em crianças (PEDONE *et al.*, 2000; MERENSTEIN *et al.*, 2010). Em um estudo *in vitro* utilizando células epiteliais, o uso do sobrenadante dessa mesma linhagem de *Lactobacillus* demonstrou uma atividade inibitória na aderência em células epiteliais, de linhagens virulentas de *E. coli* isoladas de pacientes com doença de Crohn (INGRASSIA *et al.*, 2005).

Em um estudo comparativo, Dietrich e colaboradores (2014) demonstraram que o *L. casei* DN114001 preveniu, de maneira eficiente, a diarreia em pacientes tratados com antibióticos, ao contrário da linhagem *L. casei* Shirota, presente na bebida láctea Yakult. Zakostelska e colaboradores (2011) demonstraram em seu estudo que o uso de células lisadas do probiótico *L. casei* DN114001 amenizou os efeitos da colite em camundongos, aumentando a produção de células T

regulatórias (Treg) em linfonodos mesentéricos, o que condiz com resultados demonstrando a redução que o mesmo micro-organismo causou em TNF- α e IL-8 em pacientes com doença de Crohn (BORRUEL *et al.*, 2002; BORRUEL *et al.*, 2003).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A terapia antineoplásica atua reduzindo a população de células tumorais e sua capacidade de proliferação e invasão tecidual. No entanto, os antineoplásicos existentes, como o 5-FU, não afetam somente células cancerosas, mas também células sadias com rápida taxa de divisão, levando a diversos efeitos colaterais. Esses efeitos colaterais comprometem a sobrevida dos pacientes e podem afetar o sucesso terapêutico.

A mucosite intestinal decorrente da quimioterapia é um grave efeito colateral, que pode levar à desidratação, má-absorção dos nutrientes e conseqüentemente à debilitação do paciente. Apesar do impacto dos sintomas clínicos, e dos avanços na descoberta de alguns mecanismos fisiopatológicos e moleculares responsáveis pelo curso da mucosite, ainda não existe tratamento eficaz.

Estudos demonstram o papel da microbiota na modulação da resposta imune, além de conferir um efeito protetor da integridade da mucosa intestinal. Entretanto estudos demonstram que essa microbiota parece estar também relacionada com o desenvolvimento da mucosite, levando a uma disbiose intestinal. Dessa maneira vê-se a importância dos probióticos, que podem servir como terapia adjuvante na mucosite. Vários estudos já evidenciam os benefícios dos probióticos, que incluem a prevenção e o tratamento de infecções gastrointestinais, comprovando o potencial dos probióticos na melhora da qualidade de vida de pessoas com distúrbios do TGI.

Um possível candidato probiótico a ser empregado no tratamento de mucosite seria o *L. casei* DN114001, isolado a partir de um produto comercial amplamente vendido. Neste estudo, avaliamos seu efeito na mucosite induzida por 5-FU.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito probiótico de *Lactobacillus casei* DN114001 no tratamento de mucosite, induzida pelo quimioterápico 5-FU, em modelo murino.

5

3.2. Objetivos específicos

1) Verificar o efeito do tratamento com *L. casei* na mucosite, analisando sintomas clínicos e consumo de alimento.

10

2) Avaliar o efeito do tratamento com *L. casei* na mucosite, analisando parâmetros patológicos no nível histológico.

15

3) Avaliar se o tratamento com *L. casei* reduz o aumento da permeabilidade intestinal na mucosite.

4) Avaliar o efeito do tratamento com *L. casei* na mucosite, analisando parâmetros imunológicos:

20

- (i) infiltrado de neutrófilos e eosinófilos,
- (ii) níveis de sIgA.

5) Avaliar se o tratamento com *L. casei* diminui os níveis de enterobactérias aumentadas na inflamação intestinal.

4 - METODOLOGIA

4.1. Micro-organismo

Lactobacillus casei DN114001, isolado a partir do Actimel® (DanActive), Danone (Paris, França) e identificado por espectrometria de massa (MALDI-TOF), foi crescido em tubos de 5mL contendo caldo de Mann, Rogosa and Sharpe (MRS, Neogen, Michigan, EUA), a 37°C, durante 24 horas. Após crescimento e a partir do segundo repique, os tubos foram centrifugados, descartou-se o meio de cultura, e os pellets foram ressuspensos em solução salina (0,85%).

10

4.2. Animais

A manutenção, assim como o uso dos animais nos experimentos foram conduzidos respeitando as normas estabelecidas pela “Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (SBCAL/COBEA, 2006). Utilizou-se camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, convencionais, de seis a oito semanas de idade, da linhagem BALB/c, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB/UFMG. Para os experimentos, os camundongos foram mantidos em mini-isoladores modelo ALE.MIL.01.03 (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), no biotério do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, nível de biossegurança 2 (NB2). Os animais receberam ração sólida (Nuvital, Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil) esterilizada por calor úmido e água filtrada *ad libitum*. Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério, assim como aeração, umidade (60-80%) e temperatura (22±1°C). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo este procedimento precedido por anestesia geral com solução de cetamina/xilazina (0,6 mL de cetamina 100 mg/mL; 0,4 mL de xilazina 20 mg/mL e 4 mL de solução salina NaCl 0,9% estéril) (WIRTZ *et al.*, 2007). Os experimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) (Anexo 9.1).

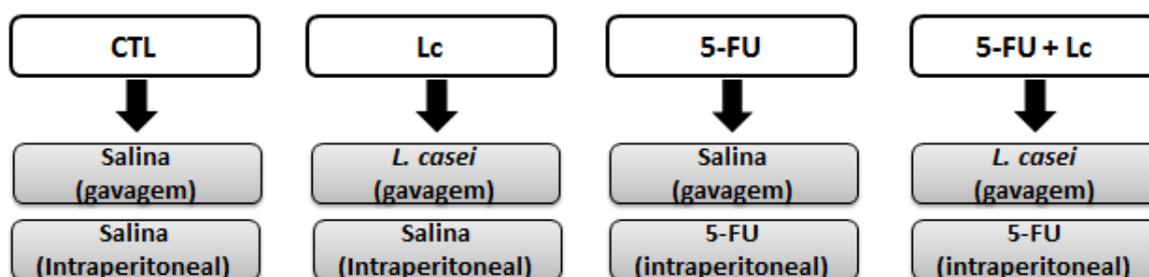
20

4.3. Desenho experimental

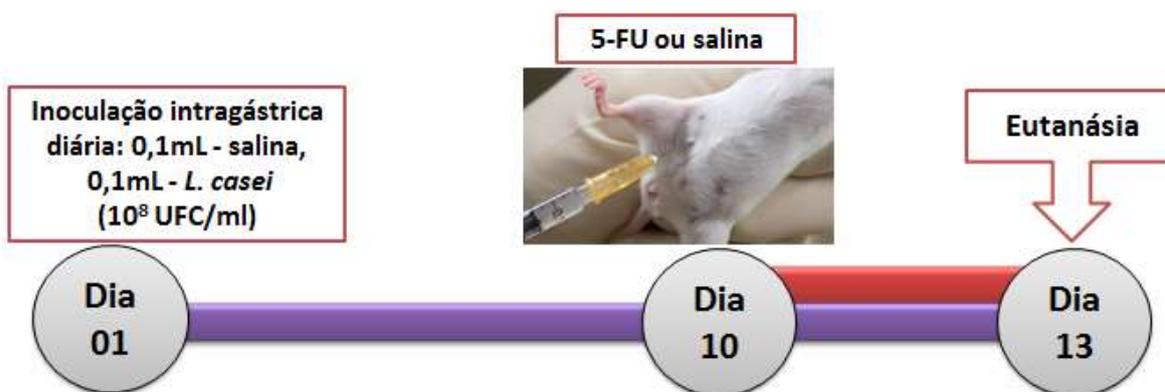
Os animais foram divididos em quatro grupos, cujas identificações e tratamentos estão indicados na figura 5. Os grupos controle (CTL) e 5-FU receberam, diariamente, por gavagem, 0,1 mL de solução salina (0,85%) estéril, durante os 13 dias de experimento (tratamento preventivo/curativo). Já os grupos

Lc e 5-FU + Lc receberam 0,1 mL de uma suspensão do micro-organismo (na concentração de 10^9 UFC/mL) em solução salina (0,85%) durante todo o experimento, também por gavagem.

A mucosite foi induzida no decimo dia de tratamento com 5-FU (FAULDFLUOR®, Libbs, São Paulo, Brasil) e injetado por via intraperitoneal na concentração de 300 mg do quimioterápico por kg do animal. Os animais foram sacrificados três dias após a indução da mucosite (Figura 6).



10 **Figura 5: Identificação dos grupos e os respectivos tratamentos utilizados.** A bactéria ou a salina foram inoculadas por gavagem e o quimioterápico por via intraperitoneal. CTL: controle; Salina: solução salina (0,85%); 5-FU: 5-Fluororacil; Lc: *L. casei*.



15 **Figura 6: Esquema do tratamento dos animais com salina ou *L. casei* e a posterior indução de mucosite com 5-fluororacil (5-FU).** Os círculos preenchidos de cinza indicam a forma de contagem dos dias do experimento, sendo que os animais foram eutanasiados no 13º dia. A faixa roxa indica o período do tratamento preventivo/curativo, em que os animais receberam salina ou a bactéria 10 dias antes da indução da doença e continuaram recebendo as soluções até o dia da eutanásia. A faixa vermelha indica o período de indução da doença, que foi realizado por meio de inoculação intraperitoneal de 5-FU.

20

Durante o experimento, desde o dia da indução da doença até o dia da eutanásia, os animais foram avaliados diariamente, às 08h00min, quanto à perda de peso, além do consumo de ração e água.

Ao final do experimento os animais foram anestesiados para coleta de sangue (avaliação da permeabilidade intestinal) e, em seguida, sacrificados para avaliação de translocação bacteriana, coleta do íleo e jejuno para análises histológicas, contagem de enterobactérias, dosagens de mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO). O conteúdo intestinal (intestino delgado) foi coletado para dosagem de sIgA e quantificação de enterobactérias. Para cada experimento utilizou-se 10 animais por grupo.

4.4. Indução da mucosite

O modelo de mucosite intestinal utilizando 5-FU, foi realizado de acordo com Maioli e colaboradores (2014). Os animais receberam injeção intraperitoneal de 300 mg/kg de 5-FU, em dose única para a indução da mucosite.

4.5. Tratamento com *Lactobacillus casei*

Aos animais foram administrados 10^8 UFC (unidades formadoras de colônias) de *L. casei* (0,1 mL de uma solução contendo 10^9 UFC/mL), diariamente, por gavagem (Del Carmen *et al.*, 2013), ressuspendidas em solução salina, como descrito no item 4.1.

4.6. Avaliação clínica dos animais e consumo de alimento

A avaliação clínica dos animais ocorreu pelo acompanhamento do ganho ou perda de peso. Os animais foram pesados do dia zero (dia em que a doença foi induzida) até o dia do sacrifício. O resultado foi expresso como média da porcentagem de ganho ou perda de peso em relação ao peso do dia zero. O consumo de ração e água também foi mensurado e calculado por gaiola, sendo utilizadas duas gaiolas por grupo. No dia 0, foi colocado em cada gaiola uma quantidade, já pesada, de ração, e a cada dia foi pesado a ração que sobrou, para mensurar o consumo dos animais por dia até o dia do sacrifício. e com uma proveta a água foi mensurada todos os dias após a indução da doença. Os resultados para o consumo de ração foram expressos em gramas e, em mL para o consumo de água, por gaiola.

4.7. Determinação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi avaliada pela determinação da radioatividade no plasma após a administração oral de ^{99m}Tc-ácido dietilenoaminopentacético (DTPA). Após a indução da mucosite e, no dia do sacrifício, alíquotas de 0,1 mL de solução de DTPA marcado com 18,5 MBq de ^{99m}Tc-DTPA foram administradas a todos os animais, por gavagem. Após 4 horas da administração do radioativo, os camundongos foram anestesiados, e 500 µL de sangue foram coletados, por punção axilar, colocados em tubos apropriados para a determinação da radioatividade e pesados. Os dados foram expressos como CPM/g (GENEROSO *et al.*, 2011).

4.8. Análises histopatológicas do fígado, íleo e jejuno

Após o sacrifício o lóbulo direito do fígado foi retirado, e então imerso em solução de formol a 4% por 24 horas. O processamento do jejuno e íleo foi realizado segundo a metodologia descrita por Calvert e colaboradores (1989) e modificado por Arantes & Nogueira (1997), na qual os órgãos foram cortados separadamente, estendidos com a serosa em contato com o papel de filtro e abertos pela borda anti-mesentérica, todo o conteúdo luminal foi retirado sem danos à mucosa. Estes foram transferidos para um recipiente contendo a solução de Bouin, com 2% de ácido acético glacial por um período de 10 minutos para pré-fixação. Os órgãos, já pré-fixados, foram colocados sobre uma superfície plana e enrolados em uma espiral com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (rocambolos), da porção distal em direção à proximal. Os rolos foram amarrados com linha e fixados por imersão em solução de formol a 4% por 24 horas e, após, a solução de formol foi trocada, para melhor fixação. As amostras de intestino delgado e fígado de cinco animais de cada grupo foram processadas para inclusão em parafina, e submetidas à microtomia para obtenção de cortes histológicos de quatro µm de espessura. As lâminas do íleo e jejuno foram coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) para interpretação histológica de rotina, realizou-se também cortes adicionais, nos quais as lamina do íleo foram coradas pela técnica combinada de Alcian Blue e Ácido Periódico Combinado de Schiff (PAS/AB) com adaptações da técnica descrita por McManus & Mowry (1960).

Esta técnica tem como objetivo corar em azul as células produtoras de mucopolissacarídeos ácidos e na cor rósea as produtoras de mucopolissacarídeos neutros.

5 **4.8.1. Coloração HE**

Cortes de quatro µm dos órgãos de cada animal foram desparafinizados em dois banhos de xilol, 15 minutos cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%) por 3 minutos cada, e hidratados em água corrente por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram corados por Hematoxilina de Harris por 50 segundos e lavados em água corrente durante 20 minutos sendo, em seguida, corados por Eosina por 1 minuto e 30 segundos. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool e diafanizadas em xilol. Os cortes histológicos foram montados com Entellan (Merck) e lamínulas de vidro.

15

4.8.2. Técnica combinada de PAS/Alcian Blue

As lâminas contendo cortes de íleo, já desparafinados, foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram mergulhados em solução de equilíbrio (ácido acético 3%) por 3 minutos e depois lavados com solução de equilíbrio e água destilada. Após essa etapa, mergulhou-se as lâminas em solução aquosa de ácido periódico 0,5% por 5 minutos e incubadas em reativo de Schiff por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente (10 minutos), contra-coradas por Hematoxilina de Harris e lavadas, novamente, em água corrente, por 15 minutos. Após a coloração, os cortes foram desidratados e as lâminas montadas em Entellan.

25

4.8.3. Análise das lâminas e fotodocumentação

Todas as lâminas codificadas foram observadas e analisadas sequencialmente pelo Prof. Dr. Ênio Ferreira (Laboratório de Patologia comparada, Departamento de Patologia, ICB, UFMG). As amostras foram decodificadas após o laudo ter sido emitido pela patologista. Imagens obtidas ao microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) foram transferidas por meio de vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) para um sistema de vídeo acoplado ao computador por meio do

30

programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) para documentação fotográfica.

4.8.4. Análises morfométricas

5 Para as análises morfométricas do intestino, foram obtidas fotografias em aumento de 20X de modo a abranger a maior área possível do órgão. Posteriormente foi feita a análise do comprimento das vilosidades do íleo e quantificação das células caliciformes.

Comprimento das vilosidades: O comprimento das vilosidades foi mensurado da sua base ao seu ápice e os dados foram expressos em micrômetros utilizando programa ImageJ (versão 1.47f, Wayne Rasband/National Institutes of Health, USA - disponível *online* no site <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>).

Quantificação das células caliciformes: Após montagem das lâminas foram capturadas imagens de dez campos de aumento, com objetiva de 40x, em microscópio Olympus BX41, acoplado ao sistema de captura de imagem spot insight color, e as células caliciformes intactas foram contadas em cada. Os dados foram expressos em valor médio de vesículas por campo de maior aumento.

4.9. Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos e eosinófilos através da quantificação de suas enzimas correspondentes: MPO (mieloperoxidase) e EPO (peroxidase eosinofílica).

4.9.1. Medida da atividade de MPO

A avaliação da atividade da enzima MPO foi utilizada como índice de recrutamento de neutrófilos nos tecidos (SOUZA *et al.*, 2000). Sumariamente, fragmentos do tecido dos animais foram removidos e congelados a -80°C. Após o descongelamento, o tecido foi homogeneizado em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaH₂PO₄.1H₂O, 0,015 M Na₂-EDTA) (100 mg de tecido em 1,9 mL de tampão), utilizando-se o homogeneizador de tecidos (Ultra-turrax IKA T10 basic), centrifugado a 10.000 *rpm* (Eppendorf 5430 R, São Paulo, SP, Brasil) por 10 minutos a 4°C e o precipitado foi submetido à lise hipotônica (500 µL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos após) para lise de hemácias. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em tampão NaH₂PO₄ 0,05 M (pH

5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% (Sigma) e re-homogeneizado. Alíquotas de um mL da suspensão foram transferidas para tubos de microcentrifugação de 1,5 mL e submetidos a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e a atividade da MPO no precipitado ressuspensionado foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (DO) à 450 nm utilizando tetrametilbenzidina (TMB) (1,6 mM) (Sigma) e H₂O₂ (0,5 mM). A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc., USA) e os resultados foram expressos como unidades relativas.

4.9.2. Medida da atividade de EPO

A atividade da enzima EPO, como quantidade relativa de eosinófilos no tecido, foi avaliada por meio de testes enzimáticos como descrito por Strath e colaboradores (1985). Segundo a metodologia, para cada 100 mg de tecido pesado, foi adicionado 1,9 mL de PBS 5X (pH 7,2), em seguida o tecido foi homogeneizado (Ultra-turrax IKA T10 basic) e centrifugado a 10.600 g/10.000 rpm (Eppendorf 5430 R, São Paulo, SP, Brasil) por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi submetido à lise hipotônica por adição de 500 µL de salina 0,2%, seguido pela adição de 500 µL de salina 1,6%, suplementada com glicose 5%. Em seguida, o material foi novamente centrifugado sob as mesmas condições anteriormente utilizadas e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspensionado em 1,9 mL de PBS (pH 7,4), contendo HTAB (Brometo de hexadeciltrimetil amônio; Sigma) 0,5% para cada 100 mg de amostra, feito isso, os tubos foram imersos em nitrogênio líquido por 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Essa amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificação da peroxidase. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo que em cada poço 75 µL de amostra ou branco (PBS/HTAB 0,5%) foi incubada com 75 µL de substrato [1,5 mM de o-fenilenodiamina, (OPD, Sigma) em tampão Tris-HCl - 0,075 µM pH 8,0 suplementado de H₂O₂ 6,6 mM]. A placa foi incubada a 20°C, no escuro, por aproximadamente 30 minutos e a reação interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 1 M. A leitura ocorreu em leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.) com filtro de 492 nm.

4.10. Dosagem de sIgA

A determinação do nível de sIgA no fluido intestinal foi realizada pelo método de ELISA. Após o sacrifício dos animais, o intestino delgado foi removido pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo foi retirado, pesado e lavado com PBS, pH 7,2, suplementado com inibidores de protease (1 μ M de aprotinina; 25 μ M de leupeptina; 1 μ M de pepstatina e 1 mM de PMSF), na proporção de 2,0 mL de PBS para cada 500 mg do conteúdo. Depois de centrifugado a 9500 rpm, por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e congelado a -20°C, para análises posteriores. Para a determinação da sIgA foi feito o revestimento das microplacas com anticorpos anti-IgA (M-8769, SIGMA) de camundongos desenvolvidos em cabra. Para a detecção da sIgA foi utilizado anticorpo conjugado a peroxidase anti-IgA de camundongo (A-4789, SIGMA). A concentração de sIgA total foi determinada utilizando um padrão de IgA purificado (0106-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA). As leituras foram realizadas, a 492 nm, em um leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, USA) e a concentração de sIgA foi dada em μ g/mL de fluido intestinal.

4.11. Quantificações de enterobactérias no fluido intestinal

A quantificação de enterobactérias no lúmen do intestino delgado foi realizada por método dependente de cultivo. Uma alíquota de 100 μ L do fluido intestinal, obtido como descrito no item 4.10, antes do processo de centrifugação, foi diluído em série em solução salina estéril até a diluição 10^{-4} . Um volume de 100 μ L das diluições 10^{-1} a 10^{-4} e do fluido sem diluir foram plaqueadas por *Spread plate* em ágar MacConkey (Acumedia). As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C durante 24 h e, após este período, as colônias foram contadas, sendo os dados expressos em log de UFC/mL de fluido intestinal.

4.12. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão e analisados usando análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey ou Bonferroni. Todos os experimentos foram repetidos no mínimo duas vezes para confirmação dos resultados. Os gráficos e as análises estatísticas foram

realizados no programa *GraphPad Prism* versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA) e consideradas significativas as diferenças de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação clínica dos animais e consumo de alimento

A avaliação da variação de peso dos animais está mostrada na figura 7. As curvas dos grupos CTL e Lc se mostraram semelhantes, evidenciando que o tratamento com o probiótico não influenciou na variação de peso. Em relação ao grupo CTL, os grupos 5-FU e 5-FU + Lc já apresentaram perda de peso no primeiro dia após a administração da droga e, ao terceiro dia após a administração do quimioterápico, os animais apresentaram uma perda de peso mais significativa ($p < 0,001$). O probiótico aplicado ao grupo 5-FU + Lc, não conseguiu impedir, significativamente, a perda de peso dos animais (14,4% para o grupo 5-FU e 13,5% para o grupo 5-FU + Lc).

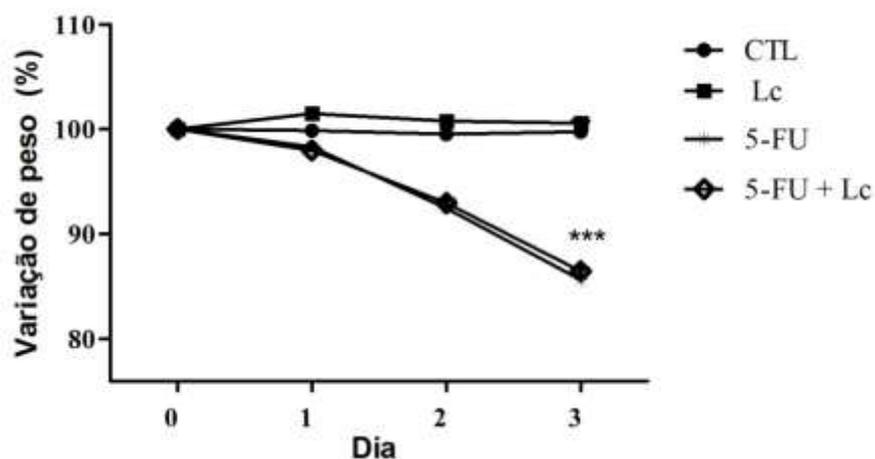


Figura 7: Variação de peso. Variação do peso dos camundongos (em porcentagem) em relação ao peso no início do tratamento com 5-FU (dia 0). O *** ($p < 0,001$) representa diferenças estatísticas em relação ao grupo CTL. Teste: ANOVA two-way, seguido por pós-teste de Bonferroni ($n = 10$). CTL: Controle, Lc: *L. casei*, 5-FU: 5- fluororacil.

O consumo de ração e água, também foi quantificado por gaiola. A figura 8 mostra que a inoculação do quimioterápico nos grupos 5-FU e 5-FU + Lc, provocou uma redução considerável no consumo de ração (gráfico A, $p < 0,01$) e água (gráfico B, $p < 0,05$) dos animais, em relação ao consumo dos animais do grupo CTL. O uso do probiótico não impediu a redução da ingestão de alimentos pelos animais com mucosite induzida.

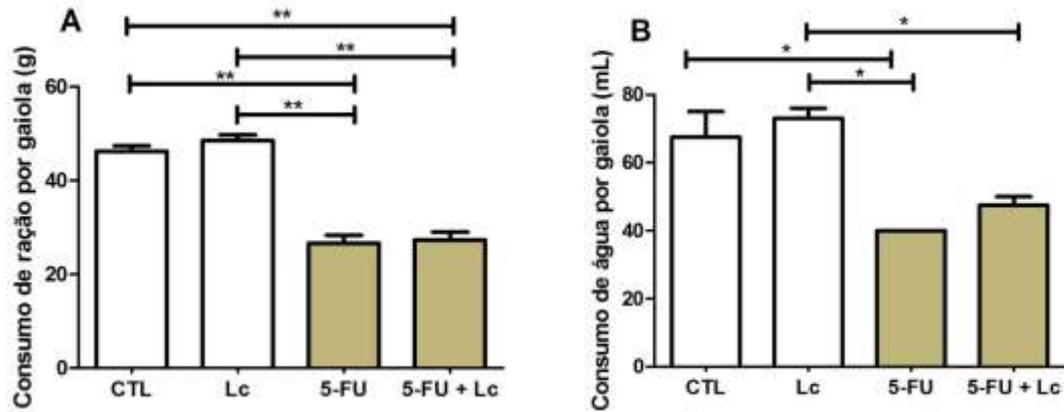


Figura 8: Avaliação do consumo de alimentos por gaiola: A: Consumo de ração. B: Consumo de água. Teste: ANOVA one-way, seguido por pós-teste de Tukey. (*= p<0,05; **= p<0,01) (n = 2).

5 5.2. Permeabilidade intestinal

A avaliação da permeabilidade intestinal foi feita por meio da quantificação da radiação emitida pelo ^{99m}Tc-DTPA, que permeou da barreira intestinal para o sangue. Os animais do grupo 5-FU apresentaram aumento significativo da permeabilidade intestinal, em relação aos grupos CTL e Lc (p<0,001). O grupo 5-FU + Lc apresentou uma redução da permeabilidade intestinal em relação ao grupo Lc (p<0,01) e em relação ao grupo controle (p<0,05), quando em comparação ao grupo 5-FU. (Figura 9).

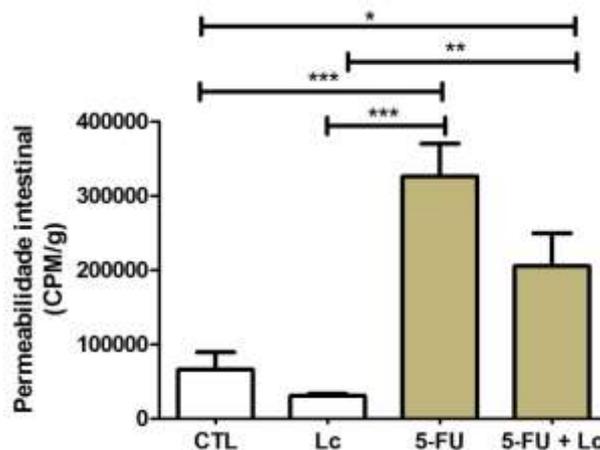


Figura 9: Avaliação da permeabilidade intestinal. Teste: ANOVA one-way, seguido por pós-teste de Tukey. (*= p<0,05; **= p<0,01, ***= p<0,001)(n = 5).

5.3. Análises histopatológicas do fígado, íleo e jejuno

Para as análises histopatológicas, foram observadas lâminas do fígado e intestino delgado (jejuno e íleo) de cinco animais de cada um dos quatro grupos.

5.3.1. Fígado

5 Os órgãos de todos os grupos se mostraram preservados (Figura 10), sem focos inflamatórios, com níveis normais de células de Kupffer, sem a presença de neutrófilos. Esses dados sugerem que não houve translocação da microbiota indígena e nem do probiótico *L. casei* usado no tratamento, para o fígado dos animais.

10

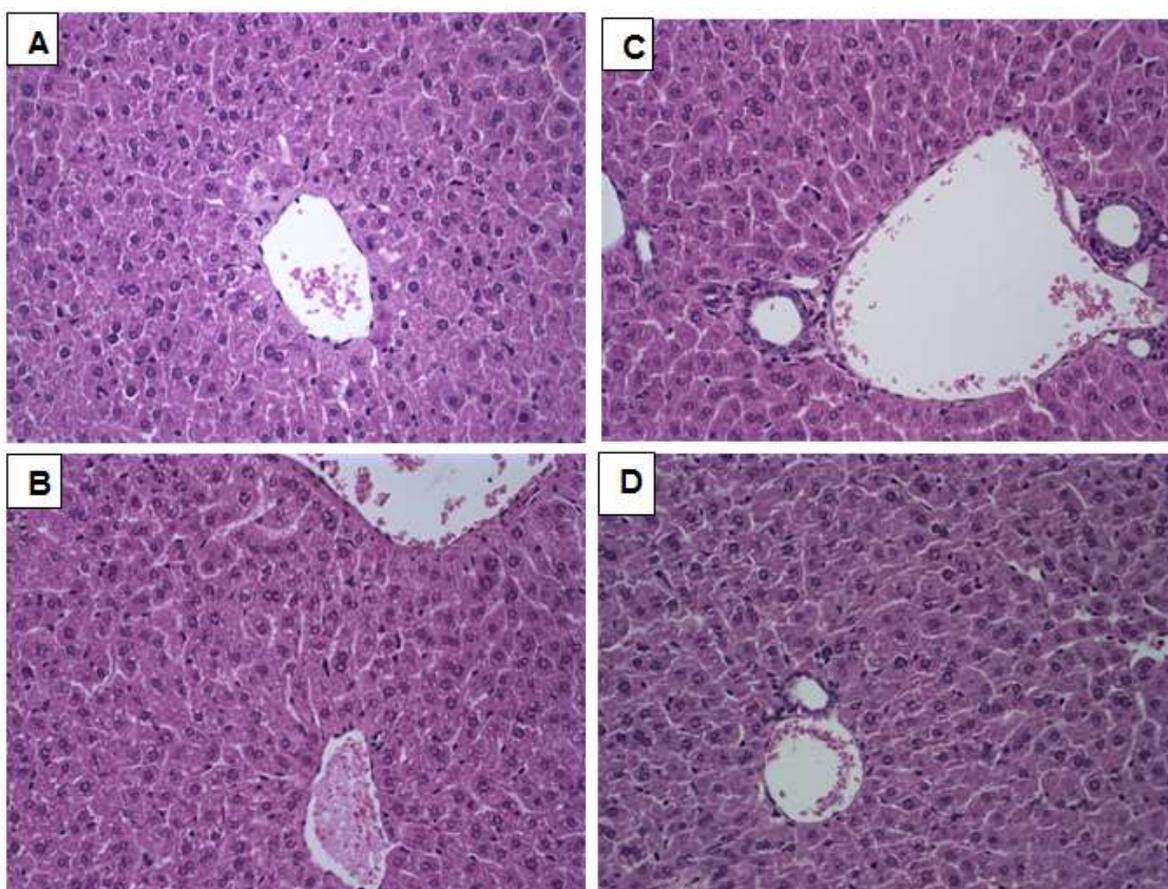


Figura 10: Fotomicrografias do fígado de camundongos BALB/c: A) CTL, B) Lc, C) 5-FU, D) 5-FU + Lc. Coloração HE. Aumento: objetiva 40X (n = 5).

15 5.3.2. Jejuno e íleo

As fotografias representativas do jejuno e íleo, de todos os grupos, estão apresentadas nas figuras 11 e 12, respectivamente. O jejuno (Figura 11B) e o íleo (Figura 12B) dos animais do grupo Lc apresentaram-se sem lesões, com

preservação da mucosa e vilosidades, assim como no grupo CTL (Figuras 11A; 12A), sem aumento de infiltrados inflamatórios, com atividade celular normal. Nas duas porções do intestino, no grupo Lc, foi possível observar, em alguns animais, um leve edema, mas sem danos ao arranjo intestinal. No grupo 5-FU (Figuras 5 11C, 12C), observou-se que a mucosite alterou a estrutura física do jejuno e do íleo, apresentando achatamento das vilosidades, edema e inflamação evidente na camada submucosa, aumento de infiltrados inflamatórios com predominância de células inflamatórias mononucleares, extensas áreas de erosão e, em alguns casos, foi possível observar algumas áreas com necrose, com perda de grande 10 parte das células caliciformes..

Já no grupo 5-FU + Lc (Figura 11D) na porção do jejuno, também foi observado grandes áreas com erosão, contudo houve uma discreta preservação da mucosa intestinal e uma diminuição dos infiltrados inflamatórios, as áreas de necrose também foram encontradas, mas em menor extensão quando 15 comparadas ao grupo 5-FU (Figura 11C). Na porção do íleo, no grupo 5-FU + Lc (Figura 12D) apareceram grandes áreas de ulceração e necrose apenas em um animal, nos demais foi observado áreas menores de erosão, com poucas áreas de ulceração, leve diminuição do achatamento das vilosidades e uma moderada preservação das mesmas, assim como uma melhor preservação da mucosa. Nos 20 grupos tratados com o probiótico (5-FU + Lc, figura 11D e 12D), não foi observado prevenção da perda das células caliciformes.

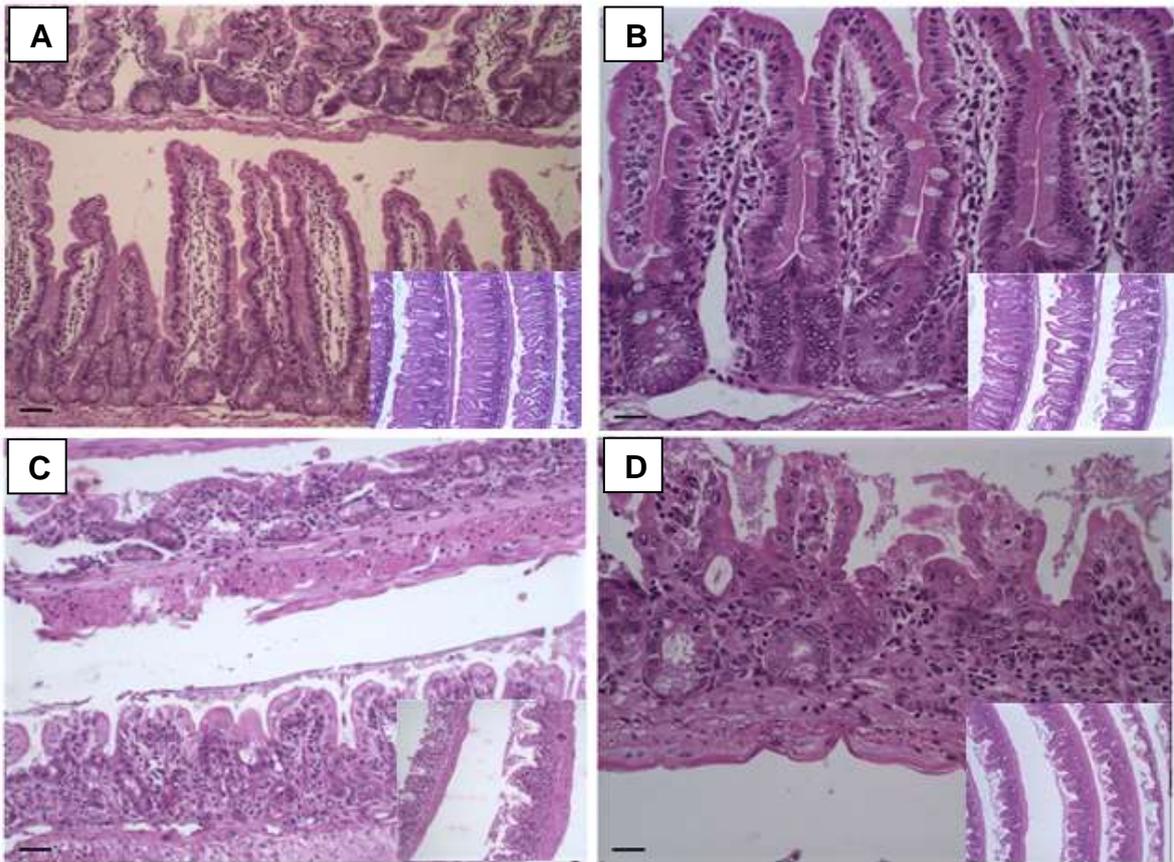


Figura 11: Fotomicrografias do jejuno de camundongos BALB/c: A) CTL, B) Lc, C) 5-FU, D) 5-FU + Lc. Coloração HE. Aumento: objetiva 20X e inserto: objetiva 10X. Barra de escala = 50 μ m. (n = 5).

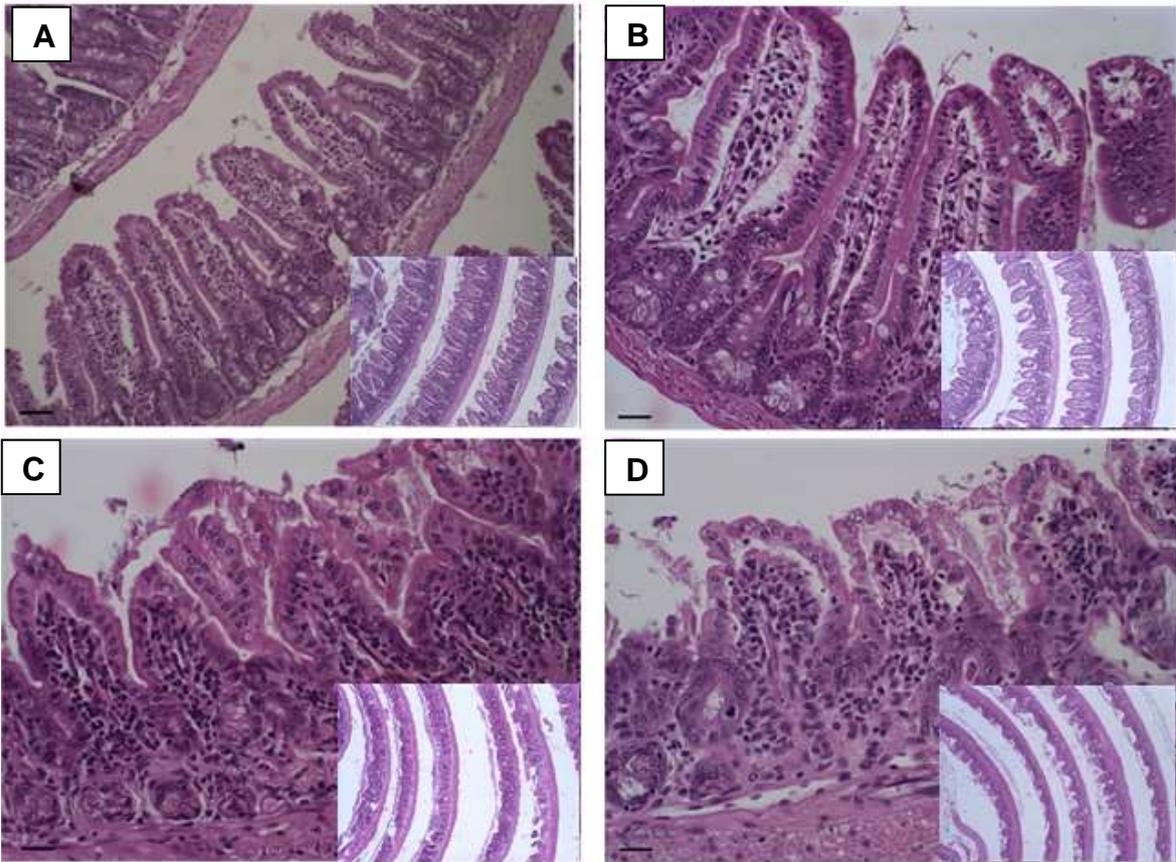


Figura 12: Fotomicrografias do íleo de camundongos BALB/c: A) CTL, B) Lc, C) 5-FU, D) 5-FU + Lc. Coloração HE. Aumento: objetiva 20X e inserto: objetiva 10X. Barra de escala = 50 µm. (n = 5).

5

5.4. Análises morfométricas

5.4.1. Altura das vilosidades intestinais

O uso do quimioterápico nos grupos 5-FU e 5-FU + Lc, provocou a redução da altura das vilosidades intestinais, em relação ao grupo CTL. O uso do probiótico não preveniu o dano causado pelo quimioterápico no grupo 5-FU + Lc, assemelhando-se ao grupo 5-FU, sem tratamento. (Figura 13).

10

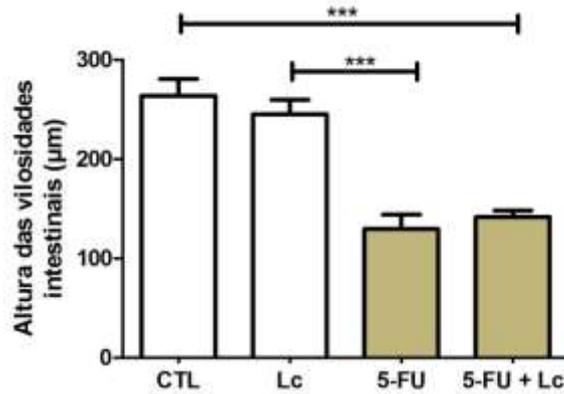
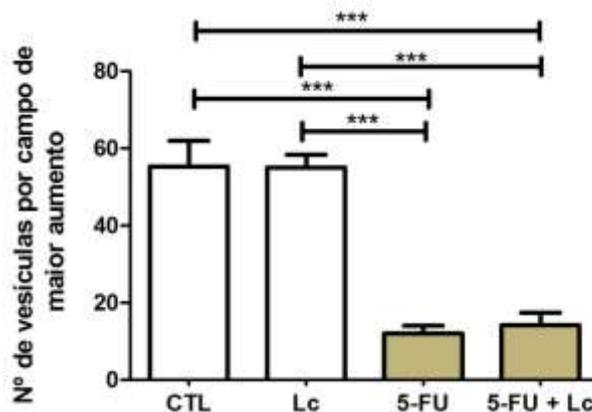


Figura 13: Altura das vilosidades intestinais. Teste: ANOVA one-way, seguido por pós-teste de Tukey. (***= $p < 0,001$) ($n = 5$).

5 5.4.2. Quantificação das células caliciformes

O quimioterápico diminuiu significativamente a quantidade de células caliciformes ($p < 0,001$) nos grupos 5-FU e 5-FU + Lc, quando comparado ao grupo CTL (Figura 14). O uso do probiótico no grupo Lc não provocou alteração no número dessas células, quando comparado ao grupo CTL, como também não preveniu a diminuição das células caliciformes no grupo que recebeu o quimioterápico (grupo 5-FU + Lc), assemelhando-se ao grupo com mucosite induzida e sem tratamento (grupo 5-FU).



15 **Figura 14: Quantificação de células caliciformes.** Teste: ANOVA one-way, seguido por pós-teste de Tukey. (***= $p < 0,001$) ($n = 5$).

5.4. Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos e eosinófilos pela quantificação de suas enzimas correspondentes: MPO e EPO

20 5.4.1. Medida da atividade de MPO

O uso do quimioterápico provocou aumento na produção da enzima MPO (Figura 15) no grupo 5-FU, quando comparado ao grupo CTL, na porção do jejuno (gráfico A) ($p < 0,05$) e na porção do íleo (gráfico B) ($p < 0,01$). O probiótico não promoveu a diminuição dessa produção da enzima no grupo tratado (gráficos A e B, grupo 5-FU + Lc), quando comparado grupo sem tratamento (grupo 5-FU), e na porção do íleo (gráfico B) pôde ser observado que o uso do probiótico provocou um leve aumento da MPO em relação ao grupo 5-FU.

Em comparação ao grupo CTL, na porção do íleo (gráfico B), observamos que o grupo 5-FU + Lc teve um aumento mais significativo ($p < 0,001$) do que o grupo 5-FU, sem tratamento ($p < 0,01$), fato também observado no grupo Lc, que quando comparado ao CTL, a enzima MPO se mostra aumentada, porém de maneira não significativa.

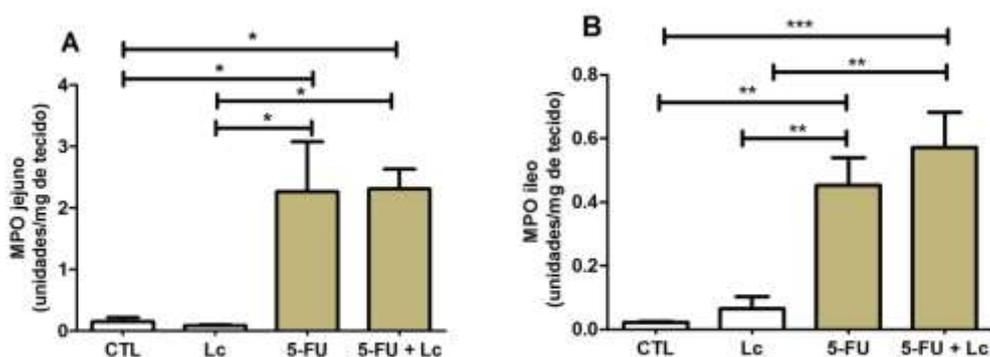


Figura 15: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). A: Jejuno, B: íleo. Teste: ANOVA one-way, seguido por pós-teste de Tukey. (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$) (n= 5).

5.4.2. Medida da atividade de EPO

A inoculação do 5-FU levou a um grande aumento na produção da enzima EPO (Figura 16), no jejuno (gráfico A) ($p < 0,001$) e no íleo (gráfico B) ($p < 0,01$), em relação ao grupo CTL. A administração do probiótico, no grupo com mucosite induzida (grupo 5-FU + Lc), levou a uma discreta redução, porém não significativa, na produção da enzima na porção do jejuno (gráfico A), em comparação com o grupo 5-FU, sem tratamento. Já na porção do íleo (gráfico B), o probiótico levou a um ligeiro aumento, também não significativo, da EPO no grupo 5-FU + Lc, quando comparado ao grupo 5-FU.

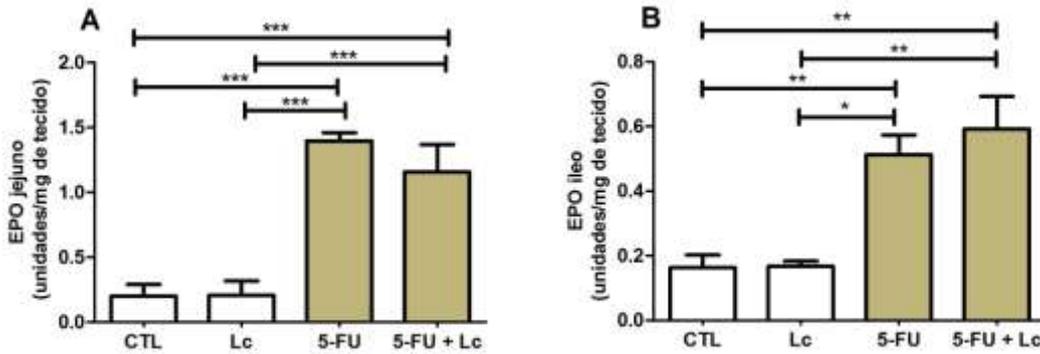


Figura 16: Avaliação da atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO). A: Jejuno, B: íleo. Teste: ANOVA one-way, seguido por pós-teste de Tukey. (*= $p<0,05$; **= $p<0,01$, ***= $p<0,001$) (n= 5).

5

5.5. Concentração de sIgA no fluido intestinal

Como esperado, a quimioterapia diminuiu, significativamente ($p<0,05$), a concentração de sIgA no fluido intestinal, em relação ao grupo controle (Figura 17). O uso do probiótico no grupo com mucosite induzida (5-FU + Lc) provocou um discreto aumento do sIgA, porém não significativo.

10

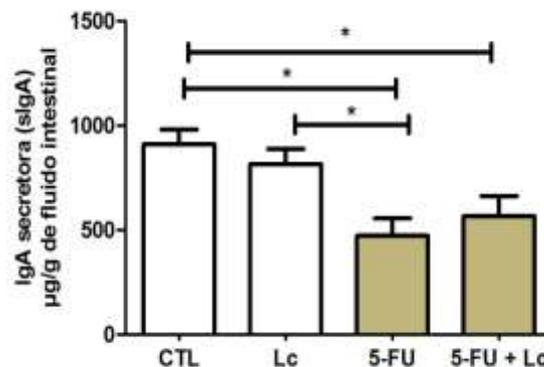


Figura 17: Concentração de imunoglobulina A secretora no fluido intestinal. Teste: ANOVA one-way, seguido por pós-teste de Tukey (* = $p<0,05$) (n = 5).

15

5.4. Quantificação de enterobactérias no fluido intestinal

A avaliação, de forma quantitativa, do perfil de enterobactérias, demonstrou que o 5-FU provocou um aumento na concentração desses micro-organismos, porém não significativo ($p>0,05$). O probiótico, utilizado para amenizar o desequilíbrio da microbiota intestinal, ocasionado pelo uso do quimioterápico, não levou a uma diminuição significativa dessas bactérias.

20

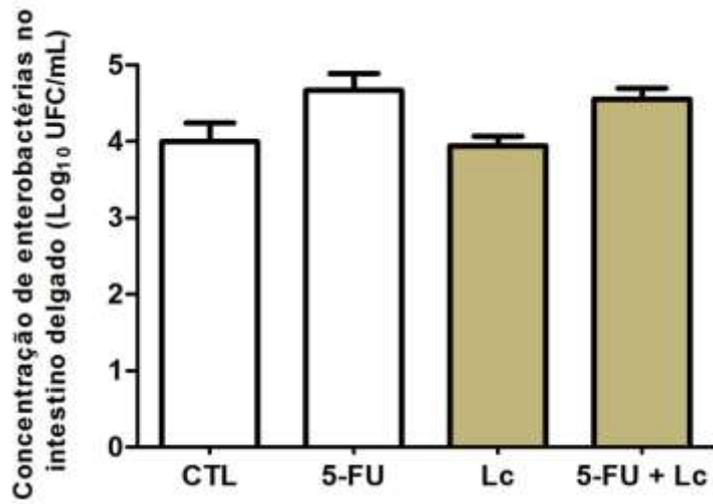


Figura 18: Concentração de enterobactérias no intestino delgado. Teste: ANOVA one-way, seguido por pós-teste de Tukey (n = 5).

6. DISCUSSÃO

O 5-FU é uma das drogas mais utilizadas na clínica para o tratamento de câncer. Apesar de sua eficácia, o fármaco não atinge somente células cancerosas, mas também as saudáveis (GIBSON & KEEFE, 2006; PRISCIANDARO *et al.*, 2012). Um de seus efeitos colaterais é o desenvolvimento da mucosite, que é uma das consequências mais debilitantes de tratamentos quimioterápicos, sendo que vários de seus efeitos, como a desnutrição, desidratação, vômitos, dor abdominal e diarreia levam o paciente à debilitação (KEEFE *et al.*, 2000; KHAN & WINGARD, 2001; KEEFE, 2004).

Ocorre, também, além dos efeitos colaterais, elevação do gasto financeiro com os pacientes, devido à necessidade de adjuntos nutricionais, incluindo a substituição da alimentação por dietas líquidas e, muitas vezes por nutrição parenteral total, além de, nos pacientes, o risco de infecções se tornar maior, sendo o uso de antibióticos muito comum entre os pacientes com mucosite, elevando ainda mais os custos (BLIJLEVENS *et al.*, 2000; ELTING *et al.*, 2003; ELTING *et al.*, 2007). Pelo fato de o 5-FU ser um dos quimioterápicos mais utilizados na clínica e, seus efeitos, frequentemente, estarem associados ao desenvolvimento da mucosite, com consequente disbiose intestinal (STRINGER, 2009; PRISCIANDARO *et al.*, 2012), este fármaco foi escolhido para indução da mucosite.

Um das consequências da mucosite é a disbiose, o uso do quimioterápico provoca um desbalanço, no qual ocorre a redução da microbiota indígena, eliminando micro-organismos benéficos ao hospedeiro e dessa forma, levando ao aumento da taxa de micro-organismos, que em excesso podem ser prejudiciais ao hospedeiro. Assim, os probióticos podem ser usados para proporcionar micro-organismos importantes ao intestino. Estudos demonstram que a microbiota possui um papel importante no desenvolvimento da mucosite, pois os benefícios que determinados micro-organismos trazem ao hospedeiro, por meio de suas interações com a mucosa intestinal e sistema imune, e também via seus metabólitos, podem atuar reduzindo os efeitos colaterais da mucosite (MAUGER *et al.*, 2007; VAN VLIET *et al.*, 2010; BELLAVIA, 2014).

Lactobacillus casei DN114001 é uma linhagem probiótica, capaz de sobreviver no TGI (OOZEER *et al.*, 2002). Isolado a partir do produto comercial

Actimel®, esse micro-organismo foi escolhido por nosso grupo, com o objetivo de avaliar seu efeito probiótico sobre o quadro de mucosite induzida pelo 5-FU, em animais Balb/c. O uso de animais, principalmente camundongos, é uma importante ferramenta, e muitas vezes insubstituível, pois devido a similaridade em alguns aspectos, , é possível que seja um modelo para reproduzir doenças humanas e, dessa forma, estudar resultados que os diversos tratamentos possam vir a causar (SHANKS, 2009).

Inicialmente, nós avaliamos a variação de peso nos animais, e a administração do *L. casei* não ocasionou aumento ou diminuição do peso, assemelhando-se ao grupo CTL. Já nos animais em que foi inoculado o quimioterápico, ocorreu uma grande perda de massa corpórea, quando comparado ao grupo controle. Essa perda de massa pode ser explicada, provavelmente pela diminuição do consumo de alimentos pelos animais, a qual pode estar diretamente relacionada ao fato de que uma das consequências da mucosite é a dor, causada pela degradação da mucosa, não só intestinal, mas também oral, com áreas de erosão e até mesmo úlceras (DUCAN & GRANT, 2003). Outro fator agravante é a redução no tempo do esvaziamento gástrico, que também leva os animais a reduzirem a ingestão de alimentos, como demonstrado por Soares e colaboradores (2008).

Maioli e colaboradores (2014) em seu estudo, demonstraram que os camundongos que sofreram indução da mucosite com o 5-FU, também apresentaram diminuição no consumo de alimentos com conseqüente perda de peso, e a administração da levedura *S. boulardii* não foi suficiente para reverter o quadro. Entretanto, Justino e colaboradores (2014), também apresentaram dados em um estudo de dose-resposta, demonstrando que *S. boulardii* em doses mais baixas não causou modificação no peso de animais, com mucosite induzida também por 5-FU, mas em doses maiores, a levedura preveniu, significativamente, a perda de peso dos animais. Esses dados corroboram com os resultados encontrados por nosso grupo, além de corroborar com os encontrados na clínica, os quais os aspectos mais evidentes do tratamento quimioterápico em pacientes, são a perda de apetite, e a conseqüente perda de peso (KEEFE, 2004).

A terapia probiótica nos animais com mucosite induzida não foi capaz de melhorar o consumo de alimentos e nem evitar a perda de peso, sendo seu efeito

semelhante ao grupo que recebeu apenas o quimioterápico. Esse fato pode ser explicado devido ao grande dano que o 5-FU causa às células no intestino, com consequente perda na arquitetura intestinal e áreas ulcerativas, danos que afetam diretamente no processo de alimentação do animal (NYHLEN *et al.*, 2002; SCULLY *et al.*, 2004), nas quais o probiótico não foi suficiente para prevenir.

Um dos maiores danos causados pela mucosite é a degradação da mucosa intestinal, onde a barreira intestinal passa a entrar em contato com o conteúdo luminal, provocando diversas reações como o aumento da permeabilidade intestinal (SONIS *et al.*, 2004, STRINGER & LOGAN, 2015). O ⁹⁹mTc-DTPA é um composto complexo com peso molecular de 549 Daltons (Da), muito utilizado para medir a permeabilidade intestinal, pois é facilmente detectável no sangue. A barreira intestinal quando em condições normais, não permite a passagem de moléculas de mais de 150 Da. Dessa forma, a permeabilidade intestinal é considerada aumentada quando moléculas com peso molecular superior a 150 Da permeiam através do intestino e são detectadas no sangue (KATOUZIAN *et al.*, 2005; GENEROSO *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, avaliamos se o *L. casei* impediria o aumento da permeabilidade intestinal decorrente da mucosite, e o método utilizado foi o de detecção do ⁹⁹mTc-DTPA no sangue dos animais. Como esperado, o uso do quimioterápico aumentou significativamente a permeabilidade intestinal. O *L. casei* não causou alterações na permeabilidade quando comparado ao grupo controle. Já no grupo 5-FU+Lc, foi observado que a utilização do probiótico causou uma diminuição da permeabilidade intestinal, quando comparado ao grupo 5-FU, porém não significativa, demonstrando não ser capaz de auxiliar na manutenção da integridade da mucosa. Dessa forma, essa tendência a diminuir a permeabilidade intestinal é reforçada com os achados histológicos, onde uma leve preservação do tecido foi observada no grupo 5-FU+Lc.

Em um estudo apresentado por Maioli e colaboradores (2014) foi demonstrado que o probiótico *S. boulardii* também não foi capaz de prevenir a diminuição da permeabilidade causada pela mucosite induzida com 5-FU, em camundongos. Outro estudo demonstrou que o *L. casei* Shirota não foi capaz de manter a integridade da barreira intestinal e consequentemente reduzir a permeabilidade intestinal, em pacientes com síndrome metabólica (STADLBAUER *et al.*, 2015). Por outro lado, um estudo realizado em 1993 por Isolauri e

colaboradores, a linhagem *L. rhamnosus* preveniu o aumento da permeabilidade intestinal em ratos amamentados com leite de vaca, demonstrando que a efetividade do tratamento depende do modelo e da linhagem escolhida.

Uma grande preocupação na administração de probióticos, principalmente em pacientes imunossuprimidos pelo uso de quimioterápicos (NAPÉÑAS *et al.*, 2007), é o desenvolvimento de efeitos colaterais, que podem desencadear problemas graves como infecções generalizadas, respostas inflamatórias exacerbadas e a translocação de micro-organismos vivos para outros órgãos e tecidos do corpo (LIONG, 2008; WASSENARR & KLEIN, 2008). Devido ao processo inflamatório causado pela mucosite, é observado o alargamento das junções de oclusão, com consequente aumento da permeabilidade intestinal, podendo levar à translocação bacteriana que, através da corrente sanguínea, chegam a outros órgãos locais (SÁNCHEZ *et al.*, 2014; STRINGER & LOGAN, 2015). Diante disso, realizamos cortes histológicos do fígado para certificar que a bactéria, utilizada neste estudo, não estaria translocando, e nos grupos estudados não foram encontrados infiltrados inflamatórios. Em um estudo, Yeung e colaboradores (2015) utilizaram quatro bactérias probióticas, entre elas uma linhagem de *L. casei* e outros dois *Lactobacillus*, em um modelo de mucosite em camundongos. Ao verificar a segurança para o uso desses probióticos, também não encontraram micro-organismos no fígado, baço e sangue.

Outro aspecto importante da patobiologia da mucosite é a perda da arquitetura intestinal (KEEFE, 2007). O 5-FU, cujo mecanismo principal é bloquear a síntese de DNA e RNA, via inibição da enzima timidilato sintase (LONGLEY *et al.*, 2003), leva a uma disfunção intestinal, caracterizada por um processo inflamatório que leva à degradação da mucosa, e também de outras camadas mais internas do intestino, podendo levar à formação de úlceras (BARASCH & PETERSON, 2003; KEEFE, 2007).

Os resultados obtidos pelas análises histológicas do jejuno e íleo, de animais que receberam o 5-FU, condizem com os dados descritos na literatura, pois foram observados sintomas como a destruição da mucosa intestinal, úlceras, inflamação, e encurtamento das vilosidades. Esses danos acontecem como resultado da morte celular, em resposta aos numerosos eventos de sinalização do processo inflamatório (SONIS *et al.*, 2004; AL-DASOOQI *et al.*, 2009). O grupo com mucosite induzida e tratado com o probiótico no jejuno e íleo, apresentou-se

em alguns aspectos, de maneira semelhante ao grupo sem tratamento, apresentando achatamento de vilosidades, aumento de infiltrados inflamatórios, muitas áreas de erosão; contudo, pôde ser observado que houve uma discreta preservação da mucosa e vilosidades na maioria dos animais, com áreas menores de ulceração na maioria dos animais. Prisciandaro e colaboradores (2011) demonstraram histologicamente que o uso do sobrenadante das bactérias *E. coli* Nissle 1917 e *L. fermentum* BR11, reduziu os danos causados pela mucosite, induzida por 5-FU em camundongos, resultados observados em cortes histológicos do intestino delgado. Southcott e colaboradores (2006) testando dois iogurtes em modelo de mucosite induzida por metotrexato, sendo que um deles, contendo *L. johnsonii*, não protegeu de maneira eficiente contra os danos, assemelhando-se ao grupo 5-FU, sem tratamento.

Em nosso estudo, a administração do probiótico no grupo Lc que não recebeu o quimioterápico, provocou um ligeiro edema nas vilosidades, com placas de Peyer discretamente aumentadas, quando comparado ao grupo controle. Provavelmente houve uma pequena indução inflamatória pela bactéria. As demais características morfológicas se assemelharam ao grupo controle.

Para investigar melhor se o *L. casei* poderia de alguma maneira estar causando alterações no intestino dos animais, fizemos a contagem de células caliciformes, responsáveis pela produção de muco, que confere proteção ao intestino (ROBBE *et al.*, 2004). O comensalismo bacteriano é também mantido por meio das mucinas presentes no intestino, que por sua vez também protegem a mucosa intestinal contra uma proliferação excessiva de micro-organismos, evitando que eles transloquem para outros órgãos (ROBBE *et al.*, 2004; STRINGER *et al.*, 2007). O muco é vantajoso para as bactérias intestinais, pois elas podem utilizá-lo como fonte de alimento, como fonte de carboidratos e peptídeos, além de possuir receptores que promovem a adesão de proteínas específicas, conferindo vantagem de colonização (DEPLANCKE & GASKINS, 2001; GUSILS, 2004).

Devido a variados estímulos, que podem ser irritações químicas ou físicas, ou em resposta à presença de bactérias ou agentes nocivos presentes no lúmen intestinal, as células caliciformes podem descarregar toda ou quase toda a sua mucina, armazenada em suas vesículas, podendo essa secreção diferenciada ser um mecanismo de proteção da mucosa intestinal (DEPLANCKE & GASKINS,

2001; ROBBE *et al.*, 2004). Dessa maneira, acreditamos que os probióticos são capazes de causar estímulos às células intestinais, e como consequência haver maior secreção de muco, preparando o intestino contra os danos causados pela mucosite.

5 Stringer e colaboradores (2009) mostraram que o 5-FU altera a composição, distribuição e a secreção das mucinas, demonstrando uma depleção do número de células caliciformes, dados também encontrados em nosso trabalho, no qual o grupo 5-FU demonstrou uma redução drástica no número de células caliciformes. O grupo tratado pelo probiótico não preveniu a perda dessas
10 células, se comportando de maneira semelhante ao grupo sem o tratamento. O probiótico não modificou o número de células, quando comparado ao grupo controle. Yeung e colaboradores (2015) demonstraram em seu estudo que uma mistura de *L. casei* + *L. rhamnosus*, conseguiu prevenir a perda de células caliciformes causada pela mucosite.

15 Micro-organismos são importantes para a ativação e manutenção do sistema imune, sejam eles comensais ou patógenos. Eles são reconhecidos no intestino por meio de receptores como, por exemplo, os TLRs, que sinalizam na ativação de fatores como o NF- κ B. Esse fator está envolvido no recrutamento de células que produzem citocinas pró-inflamatórias. A ativação desse e outros
20 fatores é importante para a fase de sinalização e regulação da mucosite (SONIS, 2004; STRINGER, 2013). Células Treg são linfócitos com propriedades imunossupressivas e de indução da tolerância imunológica. A ativação dessas células é de grande importância, principalmente para o desenvolvimento e manutenção da tolerância imunológica no intestino, pois por meio da produção de
25 citocinas anti-inflamatórias, neutralizam a ação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (BELKAID & TARBELL, 2009; HARIBHAI *et al.*, 2011; JOSEFOWICZ *et al.*, 2012).

Em nosso trabalho, no nível imunológico, avaliamos a produção de sIgA. Essa imunoglobulina, juntamente com outras barreiras de proteção como as
30 junções de oclusão e camada de muco, restringem o crescimento microbiano e reagem à penetração de patógenos (SOMMER & BÄCKHED, 2013). Foi observado em camundongos deficientes na produção de IgA, um aumento de IgG (imunoglobulina G) no soro, indicando uma redução da proteção na mucosa intestinal, promovendo a passagem de micro-organismos (MACPHERSON, 2000).

No grupo dos animais com mucosite (grupo 5-FU) observou-se uma redução na produção de sIgA, em relação ao no grupo CTL, e que igualmente ao grupo Lc a imunoglobulina se manteve aumentada. Em comparação ao grupo CTL, a administração do probiótico não provocou alterações nos níveis de sIgA, 5 diferentemente dos grupos 5-FU e 5-FU+Lc, que receberam o quimioterápico, a concentração dessa imunoglobulina se apresentou menor. Sabe-se que a produção dessa imunoglobulina no intestino é produzida por células B associadas à mucosa intestinal (HAPFELMEIER *et al.*, 2010). Assim, acreditamos que a redução de sIgA nos grupos que receberam o quimioterápico é devido ao grande 10 dano ocasionado à mucosa, com conseqüente dano às células produtoras de IgA.

Como supracitado, a imunoglobulina sIgA tem como função proteger o intestino impedindo a passagem de microrganismos, principalmente patógenos através da barreira epitelial, e a redução em sua produção pode levar a um 15 desequilíbrio microbiológico, provocando o aumento, por exemplo de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, com conseqüente redução na concentração de bactérias como *Bifidobacterium* e *Bacteroides* (HAPFELMEIER *et al.*, 2010; KAWAMOTO *et al.*, 2012). Os probióticos são usados, dentre outras funções que vêm sendo descobertas, para restabelecer o equilíbrio da microbiota intestinal e inibir os efeitos adversos que enterobactérias possam vir a causar (SHANAHAN, 20 2000; ISOLAURI *et al.*, 2002). A utilização do irinotecano (outro quimioterápico de ampla utilização na clínica) também provocou aumento na concentração de *Clostridium* e *Enterobacteriaceae* no intestino de ratos (BOWEN *et al.*, 2007). Resta-Lenert & Barrett (2003) mostraram que *Streptococcus thermophilus* e *L. acidophilus* inibiram a adesão e invasão de linhagens invasivas de *E. coli* em 25 células intestinas humanas. O probiótico utilizado nesse trabalho, não reduziu de maneira significativa a concentração de enterobactérias no grupo 5-FU+Lc, aumentadas devido ao quimioterápico.

Para avaliar a presença de infiltrados inflamatórios, foi avaliado a presença das enzimas MPO e EPO. A mensuração da atividade dessas enzimas é uma 30 ferramenta importante, uma vez que a MPO é encontrada, em sua maioria, em neutrófilos e a EPO em eosinófilos, que são células abundantes em tecidos inflamados, como no caso da mucosite (VIEIRA *et al.*, 2009; REINKE *et al.*, 2015). Oh e colaboradores (2017) mostraram resultados positivos ao observar a

diminuição que o *L. acidophilus* A4 provocou na enzima MPO em tecidos do intestino delgado e cólon de ratos com mucosite induzida por 5-FU.

Em nosso trabalho, a indução da mucosite, como esperado, provocou o aumento da atividade enzimática da MPO e EPO no jejuno e no íleo, demonstrando o processo inflamatório agudo causado pela mucosite, no qual o probiótico não conseguiu reverter. O *L. casei*, no grupo Lc, ocasionou, na porção do íleo, um leve aumento da atividade da enzima MPO, o que corrobora com dados encontrados na histologia, nos quais o micro-organismo parece estar induzindo uma ligeira inflamação. O *L. casei* DN114001 parece atuar de maneira superficial no intestino. Os resultados da MPO e EPO demonstram que o probiótico, aqui estudado, não possui propriedades para reverter o quadro inflamatório da mucosite, Estudos com probióticos ainda são relativamente novos, e mais pesquisas são necessárias para que haja um melhor entendimento de sua complexidade, pois nem todos probióticos são benéficos em todas as circunstâncias. Assim é importante determinar qual linhagem é mais eficiente para determinada doença ou qual a concentração de micro-organismos deve ser utilizada (RIJKERS *et al.*, 2011).

7. CONCLUSÃO

O uso de maneira preventiva/curativa do *L. casei* DN114001 não amenizou, de maneira significativa, os sintomas, aqui testados, da mucosite, sendo esse micro-
5 organismo, na dose utilizada, ineficaz no tratamento dessa doença.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DASOOQI N. *et al.* Matrix metalloproteinases: key regulators in the pathogenesis of chemotherapy induced mucositis? **Cancer Chemother Pharmacol.** 64: 1-9; 2009.
- ALMEIDA CC. *et al.* Beneficial effects of long-term consumption of a probiotic combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* Yakult may persist after suspension of therapy in lactose-intolerant patients. **Nutr Clin Pract.** 27(2): 247–251; 2012.
- ARANTES RME, NOGUEIRA AMMF. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. **Cell Tissue Res.** 290(1): 61-69; 1997.
- ARUMUGAM M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature.** 473(7346): 174-80; 2011.
- BALZAN S. *et al.* Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. **J Gastroenterol Hepatol.** 22: 464-471, 2007.
- BARASCH A, PETERSON DE. Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: Unanswered questions. **Oral Oncol.** 91–100; 2003.
- BARBIERI N. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 nasal administration improves recovery of T-cell mediated immunity against pneumococcal infection in malnourished mice. **Benef Microbes.** 8(3):393-405; 2017.
- BELLAVIA M. *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* supplementation reduces tissue damage of intestinal mucosa and liver after 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid treatment in mice. **J Biol Regul Homeost Agents.** 28(2):251–61; 2014.

- BELKAID Y, TARBELL K. Regulatory T cells in the control of host microorganism interactions. **Annu Rev Immunol.** 27: 551–589; 2009.
- 5 BEVINS CL, SALZMAN NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. **Nat Rev Microbiol.** 9(5): 356-68; 2011.
- 10 BLIJLEVENS NMA, DONNELLY JP, DE PAUW BE. Mucosal barrier injury: biology, pathology, clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: an overview. **Bone Marrow Transplant.** 25: 1269-1278; 2000.
- BORRUEL NM. *et al.* Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. **Gut.** 51:659–664; 2002.
- 15 BORRUEL NF. *et al.* Effects of nonpathogenic bacteria on cytokine secretion by human intestinal mucosa. **Am J Gastroenterol.** 98:865–870; 2003.
- 20 BOUSKRA D. *et al.* Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. **Nature.** 456:507–10; 2008.
- BOURLIOUX P. *et al.* The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine". **Am J Clin Nutr.** 73: 675-683; 2006.
- 25 BOWEN JM. *et al.* Irinotecan changes gene expression in the small intestine of the rat with breast cancer. **Cancer Chemother Pharmacol.** 59, 337–348. 2007.
- 30 BRANDI G. *et al.* Intestinal microflora and digestive toxicity of irinotecan in mice. **Clin Cancer Res.** v. 12, n. 4, p. 1299-1307; 2006.
- BROADBENT JR. *et al.* Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. **J Bacteriol.** 192: 2445–2458; 2010.

- CALVERT RJ, OTSUKA M, SATCHITHANANDAM S. Consumption of raw potato starch alters intestinal function and colonic cell proliferation in the rat. **J Nutr.** 119(11): 1610-1616; 1989.
- 5 CARIO E. Innate immune signalling at intestinal mucosal surfaces: a fine line between host protection and destruction. **Curr Opin Gastroenterol.** 24: 725–32; 2008.
- 10 DEKANEY CM. *et al.* Regeneration of intestinal stem/progenitor cells following doxorubicin treatment of mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 297: 461-470, 2012.
- 15 DEL CARMEN S. *et al.* A novel interleukin-10 DNA mucosal delivery system attenuates intestinal inflammation in a mouse model. **J Inflamm (Lond).** 11: 641, 2013.
- 20 DEPLANCKE B, HRISTOVA KR, OAKLEY HA. Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract. **Appl Environ Microbiol.** 66:2166–74; 2000.
- DIETRICH CG, KOTTMANN T, ALAVI M. Commercially available probiotic drinks containing *Lactobacillus casei* DN-114001 reduce antibiotic-associated diarrhea. **World J Gastroenterol.** 20(42):15837-15844; 2014.
- 25 DOGI CA, GALDEANO CM, PERDIGÓN G. Gut immune stimulation by non-pathogenic Gram(+) and Gram(–) bacteria, comparison with a probiotic strain. **Cytokine.** 41: 223-31; 2008.
- 30 DOUILLARD FP. *et al.* Comparative Genomic and Functional Analysis of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* Strains Marketed as Probiotics. **Appl Environ Microbiol.** 79(6): 1923–1933; 2013
- DUNCAN M, GRANT G. Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. **Aliment Pharmacol Ther.** v. 18, n. 9, p. 853-874; 2003.

- ELOE-FADROSH EA. *et al.* Functional Dynamics of the Gut Microbiome in Elderly People during Probiotic Consumption. **MBio.** 6: 1–12; 2015.
- 5 ELSEA CR. *et al.* Inhibition of p38 MAPK suppresses inflammatory cytokine induction by etoposide, 5-fluorouracil, and doxorubicin without affecting tumoricidal activity. **PLoS One.** 3:e2355; 2008.
- ELTING LS. *et al.* The burdens of cancer therapy. Clinical and economic
10 outcomes of chemotherapy-induced mucositis. **Cancer.** 98(7):1531–1539; 2003.
- ELTING LS. *et al.* Risk, outcomes, and costs of radiation induced oral mucositis among patients with head-and-neck malignancies. **Int J Radiat Oncol Biol
15 Phys.** 68(4):1110–1120; 2007.
- FALK PG. *et al.* Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. **Microbiol Mol Biol Rev.** 62:1157–70; 1998.
- 20 FAO/WHO Report. **Food and Agricultural Organization/World Health Organization Working Group.** Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada. 2002.
- 25 FERREIRA TM. *et al.* Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. **Lipids.** v. 47, p. 669-678; 2012.
- FIJLSTRA M. *et al.* Lactose maldigestion during methotrexate-induced
30 gastrointestinal mucositis in a rat model. **Am J Physiol Gastrointest Liver.** v. 300, p. G283-G291; 2011.
- FILICKO J, LAZARUS HM, FLOMENBERG N. Mucosal injury in patients undergoing hematopoietic progenitor cell transplantation: new approaches to prophylaxis and treatment. **Bone Marrow Transplant.** 31: 1–10; 2003.

FORSTNER JF, OLIVER MG, SYLVESTER FA. Production, structure, and biologic relevance of gastrointestinal mucins. Infections of the gastrointestinal tract. **New York, N.Y. : Raven Press.** p. 71–88; 1995.

5

FOUTS DE. *et al.* Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease. **J Hepatol.** 56(6):1283-1292; 2012.

GENEROSO SV, VIANA M, SANTOS R. *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 protects against bacterial translocation, preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. **Arch Microbiol.** 192(6): 477-484; 2010.

GENEROSO SV. *et al.* Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. **Eur J Nutr.**, v. 50, p. 261-269; 2011.

GIBSON RJ. Gut microbiome and intestinal mucositis. **Cancer Biol Ther.** 8(6): 512-513; 2009.

GIBSON RJ, KEEFE DM. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. **Support Care Cancer.** 14(9):890–900; 2006.

25

GOLDIN, B. R. Health benefits of probiotics. **Br J Nutr.** v. 80, n. 4, p. S203-7; 1998.

HAJELA N. *et al.* Health impact of probiotics – vision and opportunities. **Gut Pathog.** 4: 1757–4749; 2012.

30

HAMON E. *et al.* Investigation of biomarkers of bile tolerance in *Lactobacillus casei* using comparative proteomics. **J Proteome Res.** 11: 109– 118; 2012.

- HAN DJ. *et al.* Growth inhibition of hepatocellular carcinoma Huh7 cells by *Lactobacillus casei* extract. **Yonsei Med J.** 54: 1186-93; 2013.
- HAPFELMEIER S. *et al.* Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA Immune Response. **Science.** V. 328, pp. 1705-1709; 2010.
- HARIBHAI D. *et al.* A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. **Immunity.** 35: 109–122; 2011.
- HERRERA M. *et al.* Dietary supplementation with *Lactobacilli* improves emergency granulopoiesis in protein-malnourished mice and enhances respiratory innate immune response. **PLoS One.** 9(4):e90227; 2014.
- HOOPER LV, MACPHERSON AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nat Rev Immunol.** 10:159–69; 2010.
- HOOPER LV, LITTMAN DR, MACPHERSON AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science.** 336:1268–73; 2012.
- HUANG TY, CHU HC, LIN YL. Minocycline attenuates 5- fluorouracil-induced small intestinal mucositis in mouse model. **Biochem Biophys Res Commun.** 389: 634-639; 2009.
- HUTTENHOWER C. *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature.** 486(7402):207-14; 2012.
- IMAOKA A. *et al.* Improvement of human faecal flora associated mouse model for evaluation of the functional foods. **J Appl Microbiol.** 96: 656–63; 2004.
- INGRASSIA I, LEPLINGARD A, DARFEUILLE-MICHAUD A. *Lactobacillus casei* DN114 001 inhibits the ability of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. **Appl Environ Microbiol.** 71: 2880–2887; 2005.

- ISOLAURI E. *et al.* *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. **Gastroenterology**. 105(6):1643–1650. 1993.
- 5
- ISOLAURI E, KIRJAVAINEN PV, SALMINEN S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? **Gut**. 2002; (Suppl. 3): III54–III59.
- JOSEFOWICZ SZ, LU LF, RUDENSKY AY. Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function. **Annu Rev Immunol**. 30: 531–564; 2012.
- 10
- JUSTINO PF. *et al.* 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; 2014.
- 15
- JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. **Histologia Básica**. 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. c.15, O trato digestivo; p. 284-316; 2004.
- KANDLER O, WEISS N. Genus *Lactobacillus*. In: SNEATH PHA, MAIR NS, SHARPE ME, HOLT JG, editors. Bergey's **Manual of Systematic Bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; pp. 1063–1065; 1986.
- 20
- KATO I, ENDO-TANAKA K, YOKOKURA T. Suppressive effects of the oral administration of *Lactobacillus casei* on type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. **Life Sci**. 63: 635-44; 1998.
- 25
- KATOULI M. *et al.* Host species-specific translocation of *Escherichia coli*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 28: 1095-1103; 2009.
- KATOUZIAN F. *et al.* Dual sugar gut-permeability testing on blood drop in animal models. **Clin Chim Acta**. 352:191–197; 2005.
- 30
- KAWAMOTO S. *et al.* The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. **Science**. 336, 485–489; 2012.

KEEFE DM. *et al.* Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. **Gut**. 47(5): 632–637, 2000.

5

KEEFE, D.M. Gastrointestinal mucositis: A new biological model. **Support Care Cancer**. 12, 6–9; 2004.

10

KEEFE DM. Intestinal mucositis: mechanisms and management. **Curr Opin Oncol**. 19:323–7; 2007.

KEEFE DM, GIBSON RJ. Mucosal injury from targeted anticancer therapy. **Support Care Cancer**. 15(5): 483-490; 2007.

15

KITAZAWA H. *et al.* Development of molecular immunoassay system for probiotics via toll-like receptors based on food immunology. **J Anim Sci**. 79:11-21; 2008.

20

KLAENHAMMER TR. *et al.* Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. **Microbiol Rev**. 29(3): 393:409; 2005.

25

KLEEREBEZEM M, VAUGHAN EE. Probiotic and gut *Lactobacilli* and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. **Annu Rev Microbiol**. 63: 269–290; 2009.

30

KRISHNAN AV, SWAMI S, FELDMAN D. Equivalent anticancer activities of dietary vitamin D and calcitriol in an animal model of breast cancer: importance of mammary CYP27B1 for treatment and prevention. **J Steroid Biochem Mol Biol**. 136: 289-95; 2013.

LEYER GJ. *et al.* Probiotic effects on cold and influenza-like symptom incidence and duration in children. **Pediatrics**. 124: e172–e179; 2009.

- LIONG MT. Safety of probiotics: Translocation and infection. **Nutr Rev.** 66(4):192–202; 2008.
- LI Q. *et al.* Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction. **Clinical Immunology.** 126: 67-80, 2008.
- LOGAN RM. *et al.* The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: Pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer Treat Rev.** v. 33, p. 448-460; 2007.
- LONGLEY DB, HARKIN DP, JOHNSTON PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nat Rev Cancer.** 3:330–8; 2003.
- MACPHERSON AJ, HARRIS NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nat Rev Immunol.** 4:478–85; 2004.
- MACPHERSON AJ. *et al.* A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. **Science.** 288, 2222–2226; 2000.
- MAIOLI TU. *et al.* Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. **J Negat Results Biomed.** 13:6; 2014.
- MCMANUS JFA, MOWRY RW. **Staining Methods, Histologic and Histochemical.** New York: Hober, 1960.
- MAJAMAA H, ISOLAURI E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. **J Allergy Clin Immunol.** 99(2): 179-85, 1997.
- MAKAROVA K. *et al.* Comparative genomics of the lactic acid bacteria. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 103 (42): 15611–6; 2006.

- MARCO ML, PAVAN S, KLEEREBEZEM M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. **Curr Opin Biotechnol.** 17:204– 210; 2006.
- 5 MAUGER CA. *et al.* Probiotic effects on 5-fluorouracil-induced mucositis assessed by the sucrose breath test in rats. **Dig Dis Sci.** 52(3):612–9; 2007.
- MERENSTEIN D. *et al.* Use of a fermented dairy probiotic drink containing *Lactobacillus casei* (DN-114 001) to decrease the rate of illness in kids: the DRINK study. A patient-oriented, doubleblind, cluster-randomized, placebo-controlled, clinical trial. **Eur J Clin Nutr.** 64: 669–677; 2010.
- 10
- NAPEÑAS JJ, BRENNAN MT, BAHRANI-MOUGEOT FK. Relationship between mucositis and changes in oral microflora during cancer chemotherapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 103(1):48–59; 2007.
- 15
- NEUTRA MR, FORSTNER JF. Gastrointestinal mucus: synthesis, secretion and function. In: Johnson LR, ed. Physiology of the gastrointestinal tract. **New York, N.Y. : Raven Press.** 975–1009; 1987.
- 20
- NYHLEN A. *et al.* Impact of combinations of antineoplastic drugs on intestinal microflora in 9 patients with leukaemia. **Scand J Infect Dis.** 34: 17-21; 2002.
- OH NS. *et al.* Mulberry leaf extract fermented with *Lactobacillus acidophilus* A4 ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. **Lett Appl Microbiol.** 64(6):459-468; 2017.
- 25
- OOZEER RN. *et al.* *Lactobacillus casei* is able to survive and initiate protein synthesis during its transit in the digestive tract of human flora-associated mice. **Appl Environ Microbiol.** 68:3570–3574; 2002.
- 30
- OOZEER R. *et al.* Survival of *Lactobacillus casei* in the human digestive tract after consumption of fermented milk. **Appl Environ Microbiol.** 72, 5615–5617; 2006.

- PEDONE CA. *et al.* Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. **Int J Clin Pract.** 54:568–571; 2000.
- 5
- PEDROSO SH. *et al.* Evaluation of mucositis induced by irinotecan after microbial colonization in germ-free mice. **Microbiology.** v. 161, n. 10, p. 1950-1960; 2015.
- 10
- PENDERS J. *et al.* Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics.** 118(2):511-21; 2006.
- PRISCIANDARO LD, GEIER MS, BUTLER RN. Probiotic factors partially improve parameters of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. **Cancer Biol Ther.** 11, 671–677; 2011.
- 15
- PRISCIANDARO LD. *et al.* 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; 2012.
- 20
- OUWEHAND AC, SALMINEN S, ISOLAURI E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie Van Leeuwenhoek;** 82(1-4): 279-89; 2002.
- 25
- RAKOFF-NAHOUM S. *et al.* Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell.** 118: 229–41; 2004.
- RAPIN JR, WIERNSPERGER N. Possible links between intestinal permeability and food processing: a potential therapeutic niche for glutamine. **Clinics,** 65(6): 635-43; 2010.
- 30
- REID G. *et al.* Potential uses of probiotics in clinical practice. **Clin Microbiol Rev.** 16(4):658-72; 2003.

- REINKE D. *et al.* Herbal substance, acteoside, alleviates intestinal mucositis in mice. **Gastroenterol Res Pract.** 2015.
- RESTA-LENERT S, BARRETT KE. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). **Gut.** 52:988–997; 2003.
- RIJKERS GT. *et al.* Health benefits and health claims of probiotics: bridging science and marketing. **Br J Nutr.** 106(9):1291-6; 2011.
- ROBBE C. *et al.* Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. **Biochem J.** 384(2):307–316; 2004.
- ROBERFROID, MB. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **Am J Clin Nutr.** 71(6): 1682S–90S; 2000.
- ROCHAT T. *et al.* Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. **Microb Cell Fact.** 6: 22; 2007.
- ROCHET V. *et al.* Modulation of *Lactobacillus casei* in ileal and fecal samples from healthy volunteers after consumption of a fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114 001Rif. **Can J Microbiol.** 54, 660–667; 2008.
- SALZMAN NH, UNDERWOOD MA, BEVINS CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. **Semin Immunol.** 19(2): 70-83; 2007.
- SÁNCHEZ DE MF. *et al.* Intestinal Inflammation and Mucosal Barrier Function. **Inflamm Bowel Dis.** 20:2394–2404; 2014.
- SANTOS R. *et al.* Glutamine supplementation decreases intestinal permeability and preserves gut mucosa integrity in an experimental mouse model. **J Parenter Enteral Nutr.** 34:408–413; 2010.

- SAXELIN M. *et al.* Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. **Curr Opin Biotechnol.** 16:204–211; 2005.
- 5 SBCAL/COBEA - Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Legislação e Ética.** 2006. <http://www.sbcal.org.br/>.
- 10 SCULLY C, EPSTEIN J, SONIS S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy. Part 2: diagnosis and management of mucositis. **Head Neck.** 26:77–84; 2004.
- SENDER R, FUCHS S, MILO R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. **PLoS Biol.** p. 036; 2016.
- 15 SHANAHAN, F. Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? **Inflamm Bowel Dis.** 6:107–115; 2000.
- 20 SHANKS N, GREEK R, GREEK J. Are animal models predictive for humans? **Philos Ethics Humanit Med.** 4:2; 2009.
- SHARMA M, DEVI M. Probiotics: a comprehensive approach toward health foods. **Crit Rev Food Sci Nutr.** 54: 537-52; 2014.
- 25 SHARMA R. *et al.* Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. **Gut.** 36, 209–214; 1995.
- 30 SHIOMI H. *et al.* Relations among circulating monocytes, dendritic cells, and bacterial translocation in patients with intestinal obstruction. **World J Surg Oncol.** 31:1806-1812; 2007.
- SMITH CL. *et al.* *Lactobacillus fermentum* BR11 and fructo-oligosaccharide partially reduce jejunal inflammation in a model of intestinal mucositis in rats. **Nutr Cancer.** 60(6):757-67; 2008.

- SOARES PM. *et al.* Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemother Pharmacol.** 63:91–98; 2008.
- 5
- SO JS. *et al.* *Lactobacillus casei* suppresses experimental arthritis by down-regulating T helper 1 effector functions. **Mol Immunol.** 45: 2690-2699; 2008.
- SOMMER F, BÄCKHED F. The gut microbiota – masters of host development and
10 physiology. **Nat Rev Microbiol.** 11(4): 227-38; 2013.
- SONIS ST. The pathobiology of mucositis. **Nat Rev Cancer.** v.4, n. 4, p. 277-284; 2004.
- 15 SONIS, ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. **Oral Oncol.** 34, 39–43; 1998.
- SONIS ST. *et al.* Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients.
20 **Cancer.** 9:1995–2025; 2004.
- SONIS ST, FEY EG. Oral complication of cancer therapy. **Oncology.** 16: 680-686; 2002.
- 25
- SOUTHCOTT E. *et al.* Yoghurts containing probiotics reduce disruption of the small intestinal barrier in methotrexate-treated rats. **Dig Dis Sci.** 53(7): 1837–1841; 2008.
- 30 SOUZA DG, *et al.* 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.** v. 131, p. 1800-1808; 2000.

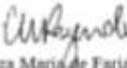
- STADLBAUER V. *et al.* *Lactobacillus casei* Shirota supplementation does not restore gut microbiota composition and gut barrier in metabolic syndrome: a randomized pilot study. **PLoS One**. 10:e0141399; 2015.
- 5 STRATH M, WARREN DJ, SANDERSON CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **J Immunol Methods**. v. 83, p. 209-215; 1985.
- STRINGER AM. Interaction between host cells and microbes in chemotherapy
10 induced mucositis. **Nutrients**. 5: 1488–99; 2013.
- STRINGER AM. *et al.* Chemotherapy-induced mucositis: The role of gastrointestinal microflora and mucins in the luminal environment. **J Support Oncol**. 5, 259–267; 2007.
- 15 STRINGER AM. *et al.* Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. **Exp Biol Med**. 4(4):430-41; 2009.
- 20 STRINGER AM, LOGAN RM. The role of oral flora in the development of chemotherapy-induced oral mucositis. **J Oral Pathol Med**. 44(2):81–87; 2015.
- SYMONDS RP. Treatment-induced mucositis: an old problem with new remedies. **Br J Cancer**. 77: 1689–95; 1998.
- 25 TAKASUNA K. *et al.* Involvement of beta-glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. **Cancer Res**. 56, 3752–3757; 1996.
- 30 TEANPAISAN R, HINTAO J, DAHLÉN G. Oral *Lactobacillus* species in type 2 diabetic patients living in southern Thailand. **Anaerobe**. 15: 160-3; 2009.

- TIMMERMAN HM. *et al.* Monostrain, multistrain and multispecies probiotics – A comparison of functionality and efficacy. **Int J Food Microbiol.** v. 96, p. 219-233; 2004.
- 5 TOUCHEFEU Y. *et al.* Systematic review: the role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis—current evidence and potential clinical applications. **Aliment Pharmacol Ther.** 40(5):409–21; 2014.
- 10 TOIVANEN P, VAAHTOVUO J, EEROLA E. Influence of major histocompatibility complex on bacterial composition of fecal flora. **Infect Immun.** 69: 2372-2377; 2001.
- TURRONI F, SINDEREN D, VENTURA M. Genomics and ecological overview of
15 the genus *Bifidobacterium*. **Int J Food Microbiol.** v. 149, n. 1, p. 37-44; 2011.
- UEMATSU, S. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. **Nat Immunol.** 9, 769–776; 2008.
- 20 VLIET MJ. *et al.* The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. **PLoS Pathog.** 6: e1000879; 2010.
- 25 VIEIRA AT. *et al.* Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. **Am J Pathol.** 175, 2382–2391; 2009.
- VIEIRA AT, TEIXEIRA MM, MARTINS FDS. The role of probiotics and prebiotics
30 in inducing gut immunity. **Front Immunol.** v. 4, p. 445; 2013.
- VON BULTZINGSLOWEN I. *et al.* 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: 278–84; 2003.

- WALTER J. Ecological Role of Lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. **Appl Environ Microbiol.** 74: 4985-96; 2008.
- 5
- WASSENARR TM, KLEIN G. Safety aspects and implications of regulation of probiotic bacteria in food and food supplements. **J Food Prot.** 71(8):1734-1741; 2008.
- 10
- WHITFORD EJ. *et al.* *Streptococcus thermophilus* TH-4 reduces intestinal crypt fission in rats treated with 5-fluorouracil (5-FU). **Cancer Biol Ther.** 8:505-11; 2009.
- WIEST R, RATH HC. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.** 7:397-425; 2003.
- 15
- WIRTZ S. *et al.* Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nat Protoc.** 2: 541-546; 2007.
- 20
- YEUNG CY. *et al.* Amelioration of Chemotherapy-Induced Intestinal Mucositis by Orally Administered Probiotics in a Mouse Model. **PLoS One.** 10(9): e0138746; 2015.
- YEUNG CY. *et al.* In vitro prevention of *Salmonella* lipopolysaccharide-induced damages in epithelial barrier function by various *Lactobacillus* strains. **Gastroenterol Res Pract.** 2013:973209; 2013.
- 25
- ZAKOSTELSKA Z. *et al.* Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. **PLoS One.** 6: e27961; 2011.
- 30

9. ANEXOS

9.1. Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFMG

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO/CERTIFICATE	
<p>Certificamos que o Protocolo nº. 186/2012, relativo ao projeto intitulado "<i>Estudo das alterações intestinais associadas ao uso de quimioterápicos e a terapêutica da ação de probióticos em experimentação animal</i>", que tem como responsável Flaviano dos Santos Martins, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 04/07/2012. Este certificado expira-se em 03/07/2017.</p> <p>Aprovada a prorrogação até 03/07/2019 - (reunião de 22/05/2017)</p> <p>We hereby certify that the Protocol nº. 186/2012, related to the Project entitled "<i>Study of intestinal disorders associated with the use of chemotherapy and the therapeutic action of probiotics in animal experiments</i>", under the supervision of Flaviano dos Santos Martins, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 07/04/2012. This certificate expires in 07/03/2017.</p> <p>New valid date: July-03/2019 – (Approve by CEUA in 05/22/2017)</p> <p>Beio Horizonte, 10/07/2012.</p> <p> Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenadora da CEUA/UFMG</p> <p><small>Av. Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha - Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2003 31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil Telefone: (31) 3409-4128 - Fax: (31) 3409-4191 www.ufmg.br/comitea/ceua - ceua@ceua.ufmg.br</small></p>	