

ISABEL DAVID DE MATOS

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE LACTATO EM MODELO EXPERIMENTAL
DE MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE ENFERMAGEM

Belo Horizonte, 2021

ISABEL DAVID DE MATOS

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE LACTATO EM MODELO EXPERIMENTAL
DE MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Nutrição e Saúde da Escola de Enfermagem Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Nutrição e Saúde.

Linha de Pesquisa: Nutrição e Saúde

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone de Vasconcelos Generoso

Coorientador: Prof. Dr. Valbert N. Cardoso

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte, 2021

Ficha catalográfica

Matos, Isabel David de.

M433e Efeitos da suplementação de lactato em modelo experimental de Mucosite Induzida por 5-Fluorouracil [manuscrito]. / Isabel David de Matos. -- Belo Horizonte: 2021. 91f.: il.

Orientador (a): Simone de Vasconcelos Generoso.

Coorientador (a): Valbert N. Cardoso.

Área de concentração: Nutrição e Saúde.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem.

1. Mucosite 2. Fluoruracila. 3. Probióticos. 4. Enterócitos. 5. Dissertação Acadêmica. I. Generoso, Simone de Vasconcelos. II. Cardoso, Valbert N.. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WU 140

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E SAÚDE

ATA DE NÚMERO 71 (SETENTA E UM) DA SESSÃO DE ARGUIÇÃO E DEFESA DA DISSERTAÇÃO APRESENTADA PELA CANDIDATA ISABEL DAVID DE MATOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM NUTRIÇÃO E SAÚDE.

Aos 04 (quatro) dias do mês de agosto de dois mil e vinte e um, às 14:00 horas, realizou-se por videoconferência, a sessão pública para apresentação e defesa da dissertação "EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE LACTATO EM MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL", da aluna **Isabel David de Matos**, candidata ao título de "Mestre em Nutrição e Saúde", linha de pesquisa "Nutrição Clínica e Experimental". A Comissão Examinadora foi constituída pelos professores doutores Simone de Vasconcelos Generoso, Valbert Nascimento Cardoso, Tatiani Uceli Maioli e Marco Aurélio Ramirez Vinolo, sob a presidência da primeira. Abrindo a sessão, a Senhora Presidente da Comissão, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata, para julgamento e expedição do seguinte resultado final:

- APROVADO;
 APROVADO COM AS MODIFICAÇÕES CONTIDAS NA FOLHA EM ANEXO;
 REPROVADO.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Senhora Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, eu, Mateus Gomes Pedrosa, Secretário do Colegiado de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada será assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 04 de agosto de 2021.

Prof^a. Dr^a. Simone de Vasconcelos Generoso
Orientadora (UFMG)

Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso
Coorientador (UFMG)

Prof^a. Dr^a. Tatiani Uceli Maioli
Membro Titular (UFMG)

Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo

Membro Titular (UNICAMP)

Mateus Gomes Pedrosa

Secretário do Colegiado de Pós-Graduação



Documento assinado eletronicamente por **Simone de Vasconcelos Generoso, Subcoordenador(a)**, em 05/08/2021, às 14:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Valbert Nascimento Cardoso, Professor do Magistério Superior**, em 05/08/2021, às 16:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Tatiani Uceli Maioli, Professora do Magistério Superior**, em 09/08/2021, às 15:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Marco Aurélio Ramirez Vinolo, Usuário Externo**, em 13/08/2021, às 13:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Mateus Gomes Pedrosa, Assistente em Administração**, em 13/08/2021, às 14:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0875931** e o código CRC **280D7032**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e irmãos pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim e apoiarem meu sonho de me tornar nutricionista.

A minha orientadora Dra. Simone de Vasconcelos Generoso por seus ensinamentos, apoio e contribuições para o trabalho e por sempre confiar no meu potencial.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso, pelas valiosas contribuições.

Ao professor, Dr. Geovanni Cassali por disponibilizar seu laboratório para as colaborações e contribuições nas análises histológicas.

A professora Dra. Maria Emília Rabelo Andrade pela contribuição, experiências compartilhadas e sugestões.

Ao professor Dr. Flaviano dos Santos Martins por ter disponibilizado seu Laboratório e seus alunos Bruno Galotti e Samantha pelo apoio.

A Prof^a. Dr^a. Jacqueline Isaura Alvarez Leite pela disponibilidade de seu laboratório e sua aluna Dra. Paola Caroline Lacerda Leocadio pela colaboração nas análises.

A colegas Luísa Trindade e Aline Souza pela amizade e parceria, desde a iniciação científica até a conclusão do mestrado.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Farmácia, Adelaide e ao Batista pelo cuidado com os animais e pelo suporte sempre que necessário.

Aos colegas do grupo PENCE, que sempre contribuem muito com meu trabalho e pelos ensinamentos nas reuniões.

Aos meus amigos Andrea, Gustavo, Luiza, Ursula e inúmeros amigos corredores que fazem a minha vida mais divertida e feliz.

Ao meu cachorro Theodoro, por suportar as faltas de passeios enquanto terminava a dissertação.

À CAPES, CNPq e Fapemig, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O 5-fluorouracil (5-FU) é um dos quimioterápicos mais utilizados em tipos avançados de câncer; porém, seu mecanismo de ação não específico resulta em efeitos colaterais, como náuseas, leucopenia, alopecia, mielossupressão, diarreia e mucosite gastrointestinal. Além disso, O 5-FU também promove alterações na composição da microbiota entérica que têm sido associadas à gravidade da mucosite. Nos últimos anos, estudos têm demonstrado efeitos benéficos da suplementação de probióticos na prevenção e no tratamento da mucosite. Contudo, sabe-se que os probióticos produzem diversas substâncias denominadas posbióticos, como o lactato, com funções ainda desconhecidas, principalmente na mucosite. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação de lactato nas concentrações de 10mM, 100mM e 200mM no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por 5-FU. Camundongos machos BALB-c foram divididos aleatoriamente em oito grupos (n=6). Controle (CTL) + salina; Controle + Lactato 10mM (CTL 10); Controle + Lactato 100mM (CTL 10); Controle + Lactato 200mM (CTL 200); Mucosite (MUC)+ salina; Mucosite + Lactato 10mM (MUC 10); Mucosite + Lactato 100mM (MUC 100); Mucosite+ Lactato 200mM (MUC 200). No 10º dia da suplementação, os camundongos dos grupos MUC, MUC 10, MUC 100 e MUC 200 receberam injeção intraperitoneal (IP) (300 mg/Kg) de 5-FU para indução da mucosite, enquanto que os animais dos grupos controle e controle + lactato receberam salina. Os camundongos foram sacrificados após 72h da indução da mucosite e sangue, íleo, fluido intestinal e fezes foram retirados para as análises. Foi observado redução significativa de peso, consumo alimentar e permeabilidade intestinal nos animais do grupo MUC, comparado ao grupo CTL ($p < 0.05$). A suplementação com lactato, independente da concentração, não foi capaz de reverter esses parâmetros ($p > 0.05$). O quimioterápico também provocou o encurtamento do intestino quando comparado ao grupo controle. Entretanto, o tratamento com lactato (100 e 200 mM) foi capaz de prevenir essa alteração. Avaliamos a histologia dos animais e observamos que os animais do grupo MUC apresentaram epitélio intestinal com encurtamento das vilosidades, infiltração de células inflamatórias na lâmina própria, células achatadas e vacuoladas e perda da arquitetura tecidual quando comparado com o grupo CTL. Achados semelhantes ao encontrados no grupo MUC 10. No entanto, houve melhora na integridade do epitélio

intestinal e redução do escore histológico nos animais do grupo MUC 200, apresentando morfometria semelhantes ao grupo CTL. Os maiores danos observados nos grupos MUC e MUC 10, levaram ao aumento da expressão relativa do mRNA de zonulas de oclusão-1 (ZO-1) nos enterócitos. O 5-FU também reduziu a produção de muco pelas células caliciformes em comparação ao grupo CTL ($p < 0,05$). A suplementação de lactato de 200 mM foi capaz de reverter essa redução ($p < 0,05$). Foi observado aumento da concentração de MPO e EPO nos grupos MUC e MUC 10 em comparação ao grupo CTL ($p < 0,05$). Já, a administração de lactato nas concentrações de 100 e 200mM preveniu o aumento do recrutamento desses leucócitos quando comparado ao grupo MUC ($p < 0,05$). Observamos também, aumento da peroxidação lipídica no grupo MUC comparado ao grupo CTL ($p < 0,05$). Entretanto, apesar da suplementação com lactato a 200 mM aumentar a expressão da enzima SOD no grupo MUC 200, esse aumento não foi suficiente para evitar a formação de hidroperóxidos e TBARS. A ação do 5-FU gerou redução nas concentrações de acetato, propionato e butirato nas fezes quando comparado ao grupo CTL e apenas a suplementação com lactato de 100mM foi capaz de aumentar essas concentrações. Concluímos que o tratamento com lactato, exceto na concentração de 10 mM, foi capaz de prevenir parcialmente os danos causados pela mucosite de forma dose-dependente, com resultados mais significativos para a solução 200mM.

Palavras chave: Mucosite. 5-Fluorouracil. Lactato. Probióticos.

ABSTRACT

5-Fluorouracil (5-FU) is one of the most used chemotherapeutics in advanced types of cancer, but its non-specific mechanism of action results in side effects, such as nausea, leukopenia, alopecia, myelosuppression, diarrhea and gastrointestinal mucositis. In addition, 5-FU also promotes changes in the composition of the enteric microbiota, that associated with the severity of mucositis. In last years, studies have shown beneficial effects with the supplementation of probiotics in the prevention and treatment of mucositis. It is known that probiotics produce several substances called postbiotics, such as lactate, with functions that are still unknown, especially in mucositis. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of lactate supplementation at concentrations of 10mM, 100mM and 200mM on the development of 5-FU-induced mucositis. Male BALB-c mice were randomly divided into eight groups (n=6): Control (CTL) + saline; Control + 10mM Lactate (CTL 10); Control + 100mM Lactate (CTL 100); Control + 200mM Lactate (CTL 200); Mucositis (MUC) + saline; Mucositis + 10mM lactate (MUC 10); Mucositis + Lactate 100mM (MUC 100); Mucositis+ Lactate 200mM (MUC 200). On the 10th day of supplementation, mice in the MUC, MUC 10, MUC 100 and MUC 200 groups received intraperitoneal (IP) injection (300 mg/kg) of 5-FU for induction of intestinal mucositis, while the animals in the control and control groups + lactate received saline. The animals were sacrificed after 72h, and blood, ileum, intestinal fluid and feces of colon were removed for analysis. There was a significant reduction in weight and food consumption of animals in the MUC, MUC 10, MUC 100 and MUC 200 group compared to the control groups ($p < 0.05$). The chemotherapy action also led to an increase in intestinal permeability in the MUC group when compared to the CTL group ($p < 0.05$). However, lactate supplementation, regardless of concentration, was not able to revert these parameters ($p > 0.05$). Chemotherapy also caused shortening of the intestine when compared to the control group. However, treatment with lactate (100 and 200 mM) was able to prevent this change. We also evaluated the histology of the animals and observed that animals in the MUC group presented intestinal epithelium with shortening of the villi, infiltration of inflammatory cells in the lamina propria, flattened and vacuolated cells and loss of tissue architecture when compared to the CTL group, and these findings were similar to those found in the MUC 10 group. However, there was an improvement in the integrity of the intestinal epithelium

and a reduction in the histological score in the animals in the MUC 200 group, with similar morphometry to the CTL group. The greatest damage observed in the MUC and MUC 10 groups led to an increase in the relative expression of occlusion zonule-1 (ZO-1) mRNA in enterocytes. 5-FU also reduced mucus production by goblet cells compared to the CTL group ($p < 0.05$) and only acetate supplementation of 200 mM was able to reverse this reduction ($p < 0.05$). There is an increase in the concentration of MPO and EPO in the groups MUC and MUC 10 compared to the CTL group ($p < 0.05$). On the other hand, the administration of lactate at concentrations of 100 and 200mM prevented the increase in the recruitment of these leukocytes when compared to the MUC group ($p < 0.05$). We also observed an increase in lipid peroxidation in the MUC group compared to the CTL group ($p < 0.05$). However, despite supplementation with 200 mM of lactate partially increasing the expression of the SOD enzyme in the MUC 200 group, this increase was not enough to prevent the formation of hydroperoxides and TBARS. The action of 5-FU decreased the acetate, propionate and butyrate concentrations in the feces. And only supplementation with 100mM lactate was able to increase these concentrations. We conclude that treatment with lactate, except at a concentration of 10 mM, was able to partially prevent the data caused by mucositis in a dose-dependent manner, with more significant results when using the 200 mM solution.

KEY WORDS: Mucositis. 5-fluorouracil. Lactate. Postbiotics

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -Alfa β

- Beta

γ - Gamak

- Kappa μ -

Micro

μ L - Microlitros

$^{\circ}$ C - Graus Celsius

5-FU - 5-fluorouracil

99m Tc - Tecnécio- 99m

99m Tc-DTPA - Ácido Dietilenotriaminopentacético marcado com tecnécio- 99m

AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta

ANOVA - Análise de variância

ARRIVE- *Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*

BAL - Bactérias Ácido Lácticas

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CLA - Ácido Linoleico Conjugado

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CTL - Controle

DII - Doenças Inflamatórias Intestinais

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DSS - Sulfato de Dextrano de Sódio

DTPA - Ácido Dietilenotriaminopentacético

EPO - Peroxidase eosinófilica

EPS - Exopolissacarídeos

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FCC - *Food Chemicals Codex*

FdUMP - Monofosfato de fluorodeoxiuridina

FdUTP - Trifosfato de fluorodeoxiuridina

FOS - Frutooligossacarídeos

FUTP - Trifosfato de fluorouridina

GPR81 - Receptor 81 acoplado à proteína G

HCAR1 - Receptor 1 do ácido hidroxicarboxílico

HE - Hematoxilina e Eosina

IECs - Células epiteliais intestinais

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

IgA - Imunoglobulina A

IL - Interleucina

IP - Intraperitoneal

INCA – Instituto Nacional do Câncer

Lr - *Limosilactobacillus rhamnosus*

LcS - *Limosilactobacillus casei* Shirota

LP - Lâmina própria

Kg - Quilogramas

kJ - Quilojoule

MBq - Megabecquerel

mg - Miligramas

mL - Mililitros

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno

MMPs - Metaloproteinases da matriz extracelular

mMol - Milimolar

MPO - Mieloperoxidase

mRNA – RNA mensageiro

MUC - Mucosite

NF- κ B - Fator Nuclear kappa B

PAS - Ácido Periódico-*Schiff*

PAS/AB - Ácido Periódico combinado de *Schiff* e *Alcian Blue*

PBS - Solução de tampão fosfato

pH - Potencial Hidrogeniônico

PI - Permeabilidade Intestinal
pKa - Constante de acidez
PKC - Proteína quinase C
PRR - Receptores de Reconhecimento Padrão
QT - Quimioterapia
RNA - Ácido ribonucleico
rpm - Rotações por minuto
SEM - Desvio padrão da média
slgA - Imunoglobulina do tipo A secretória
SnCl₂·2H₂O - Cloreto estânico
TGI - Trato Gastrointestinal
TJ - *tight junctions*
TLR - *toll like receptor*
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa
TS - Timidilato Sintase
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
ZO-1 – Zonulina 1

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

Figura 1. Esquema para formação de acetato, propionato e butirato.....	32
Figura 2 – Via GPR81 inibe conversão IL1 – Figura adaptada de Lerch et al(140)...	34
Figura 3 – Via GPr81 ativa recrutamento das células estromais.....	35
Figura 4 – Via GPR31 ativação de protusão dendrítica.....	36
Figura 5. Representação esquemática do delineamento experimental do estudo.....	40
Figura 6 - Variação ponderal dos animais antes e após a indução da mucosite (A) Consumo alimentar diário dos animais nos três dias após indução da mucosite (B)	49
Figura 7. Permeabilidade intestinal 72 horas após a indução da mucosite	51
Figura 8. Expressão gênica por Real Time PCR das proteínas <i>tight junctions</i> – ZO-1 e Ocludina - 72 horas após a indução da mucosite.....	56
Figura 9. Análise histológica do íleo 72 horas após a indução da mucosite.....	52
Figura 10. Análise histológica do íleo 72 horas após a indução da mucosite.....	53
Figura 11. Escore histológico do íleo 72 horas após a indução da mucosite	54
Figura 12. Análise morfométrica. do íleo 72 horas após a indução da mucosite.....	55
Figura 14 –Avaliação da concentração da enzima MPO e EPO no íleo dos animais 72h após a indução da mucosite	58
Figura 15 – Estresse oxidativo no íleo dos animais 72h após indução da mucosite.	59
Figura 16. Dosagem de ácidos graxos de cadeia e lactato curta nas fezes dos animais 72h após indução da mucosite.....	60
Figura 17. Análise da secreção de muco	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades dos isômeros do ácido láctico	33
Tabela 2 - Parâmetros avaliados para determinação dos escores histopatológicos na porção do íleo.....	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Tratamentos Oncológicos.....	20
2.2. 5-FU e mucosite.....	23
2.3. Mucosite Intestinal.....	25
2.4. Barreira Intestinal.....	25
2.5. Microbiota Intestinal.....	28
2.6. Probióticos.....	29
2.6.1. Bactérias Ácido-Láticas.....	29
2.7. Posbióticos.....	31
2.7.1. Ácido Graxo de Cadeia Curta (AGCC).....	33
2.7.2. Ácido Lático.....	34
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Animais.....	39
4.2 Lactato.....	40
4.3. Delineamento experimental.....	40
5. ANÁLISES REALIZADAS	42
5.1. Consumo alimentar e alteração ponderal.....	42
5.2. Tamanho Intestino.....	42
5.3. Determinação da permeabilidade intestinal.....	42
5.4. Análises histopatológicas.....	43
5.5. Análises morfométricas.....	44
5.6. Análise da expressão gênica por <i>Real Time</i> PCR das proteínas das <i>tight junctions</i> – <i>ZO-1</i> e <i>Ocludina</i>	44
5.7. Determinação muco.....	46
5.8. Infiltrado inflamatório.....	46
5.9. Estresse oxidativo.....	48
5.10. <i>Análise AGCC</i>	49
5.11. Análises estatísticas.....	50

6. RESULTADOS.....	51
6.1. Variação ponderal e consumo alimentar	51
6.2. Tamanho do Intestino	51
6.3. Permeabilidade Intestinal.....	52
6.4. Análises Histológicas	53
6.5. Expressão gênica por <i>Real Time</i> PCR das proteínas <i>tight junctions</i> – ZO-1 e Occludina 57	
6.6. Muco.....	58
6.7. MPO e EPO.....	59
6.8. Estresse oxidativo	60
6.9. Dosagem de AGCC nas fezes.....	61
7. DISCUSSÃO	63
8. REFERÊNCIAS.....	74
9. ANEXO.....	94
10. APÊNDICE.....	95

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado ao conjunto de mais de 100 doenças caracterizado pelo crescimento desordenado de células que formam massas conhecidas como tumores. É considerada a segunda principal causa de óbitos em todo o mundo. Para 2020/2022, a estimativa do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) é a ocorrência de cerca de 625 mil casos novos de câncer no Brasil para cada ano (1). Atualmente, os tratamentos mais utilizados para redução e remoção desses tumores são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia(2).

O tratamento quimioterápico consiste no uso de fármacos que culminam em apoptose das células cancerosas por meio de danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) ou a inibição de processos essenciais às células, como a síntese proteica e o metabolismo celular(3,4) O 5-fluorouracil (5-FU) é um dos quimioterápicos mais utilizados em tipos avançados de câncer como: colorretal, cabeça e pescoço, mama, estômago e alguns cânceres de pele(3,5). O mecanismo de ação desse fármaco leva a produção de subprodutos que inibem a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e interferem no processamento e funcionalidade do ácido ribonucleico (RNA) das células de rápida proliferação, tanto as cancerígenas quanto as saudáveis, como medula óssea e mucosa intestinal. Esse mecanismo de ação não específico do 5-FU resulta em efeitos colaterais, como náuseas, cardiotoxicidade, leucopenia, alopecia, mielossupressão, diarreia e mucosite oral e intestinal(6,7).

A mucosite é uma inflamação da mucosa do trato gastrointestinal que leva ao desenvolvimento de ulcerações, dano morfológico, alteração na motilidade intestinal e redução na ingestão alimentar. Ela acomete entre 20% a 40% dos pacientes submetidos à quimioterapia convencional e até 90% dos pacientes que recebem altas doses de quimioterapia(8). A mucosite pode gerar dor ao deglutir, perda de apetite, vômitos, distensão abdominal e diarreia, além de alteração na barreira intestinal levando ao aumento de infecções(9–11). Esses sintomas podem comprometer o estado nutricional do paciente, diminuir a capacidade de tolerância ao tratamento e prolongar o tempo de internação e custos hospitalares(12–15).

A fisiopatologia da mucosite é multifatorial e envolve aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), de citocinas inflamatórias e da ativação de

fatores de transcrição (16–18). Além disso, estudos mais recentes têm associado a gravidade da mucosite à redução na quantidade e diversidade da microbiota entérica, causada pelos quimioterápicos(19,20). Dessa forma, alternativas que levem a modulação da microbiota como a administração de probióticos, simbióticos e posbióticos, poderia ser benéfica para controle da disbiose e redução de complicações da mucosite intestinal(21,22).

Algumas cepas probióticas estudadas para a prevenção e tratamento da mucosite são bactérias gram-positivas pertencentes ao grupo de bactérias ácido lácticas (BAL), como *Lactococcus lactis*, *Limosilactobacillus plantarum*, *Limosilactobacillus acidophilus*, *Limosilactobacillus delbrueckii*, *Limosilactobacillus rhamnosus* (23–27). As BAL podem conferir benefícios para saúde do hospedeiro pela produção de moléculas denominadas posbióticos, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Além disso, a suplementação com BAL pode levar também ao aumento das concentrações de lactato no lúmen intestinal, em virtude do metabolismo energético ser baseado principalmente na fermentação láctica(28). Em recente trabalho, Gargari et al. observaram que adultos saudáveis suplementados com uma cápsula de probiótico (*B. animalis* subsp. *lactis* BI-04 $5,25 \times 10^{10}$, *L. acidophilus* La-14 $1,4 \times 10^{10}$ UFC, *L. plantarum* SDZ-11 $2,8 \times 10^9$ UFC e *L. paracasei* SDZ -22 (7×10^8 UFC por cápsula), durante duas semanas, apresentaram aumento significativo nas concentrações de lactato nas fezes, variando entre 2,0 a 2,5mMol/100g(29).

Estudos tem demonstrado que o lactato é uma molécula bioativa que atua como sinalizador de funções do sistema imunológico, regulando a atividade de macrófagos e das células dendríticas, além da produção de citocinas pró- inflamatórias. Entretanto, as concentrações de lactato utilizadas variam e ainda não há um consenso de qual seria a melhor dosagem, assim como seu mecanismo de ação(14,30–32). Além disso, apesar de alguns estudos demonstrarem que o lactato tem papel importante na regulação da atividade inflamatória, podendo ser benéfico no tratamento de doenças inflamatórias como a colite, seu efeito é desconhecido em outras situações, especialmente na mucosite(32–35).

Trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, ainda não publicado, avaliou as diferenças na suplementação de *Limosilactobacillus rhamnosus* vivo e inativado no modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU. Os resultados demonstraram que a

suplementação de *L. rhamnosus* vivo aumentou as concentrações de lactato nas fezes dos camundongos, entretanto, esses animais apresentaram resultados menos satisfatórios na redução da permeabilidade intestinal (PI) e melhora dos parâmetros histológicos e morfométricos, em comparação ao grupo tratado com *L. rhamnosus* inativado. Dessa forma, torna-se necessário avaliar os efeitos desse metabólito na mucosite.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tratamentos Oncológicos

O câncer é definido é um grupo de doenças gerado por alteração nos mecanismos de proliferação e apoptose celular, levando ao crescimento desordenado de células e à formação de massa anormal de tecido, denominada neoplasia ou tumor. As neoplasias ou tumores benignos têm seu crescimento de forma lenta e organizada e apresentam limites bem nítidos. Geralmente, são formados por células diferenciadas, porém com estrutura típica do tecido de origem. Alguns exemplos de neoplasias benignas são lipoma (tecido gorduroso), o mioma (tecido muscular liso) e o adenoma (tumor benigno das glândulas). Já, as neoplasias malignas ou tumores malignos são formado por células anaplásicas e manifestam grau maior de autonomia, sendo capazes de invadir tecidos vizinhos, provocando metástases(1).

Os tipos de câncer mais incidentes (exceto pele não melanoma) esperados para 2020, 2021 e 2022, por ano, no Brasil, são: câncer de mama (29,7%), câncerde próstata (29,2%), câncer de cólon e reto (9,2%), câncer de pulmão (7,9%), Câncer do colo do útero (7,4%), câncer de estômago (5,9%), câncer de tireoide (5,4%) e câncer da cavidade oral (boca) (5,0%). (1).

O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese ou oncogênese e pode ser dividido em três etapas. No estágio de iniciação a célula sofre ação dos agentes cancerígenos que provocam modificações em alguns de seus genes e no estágio de promoção a célula alterada sofre o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. Já, a multiplicação descontrolada e irreversível da célula ocorre no estágio de progressão. Na maioria dos casos a

evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna acontece durante o ciclo de divisão celular, quando a célula sai da Fase G0 e inicia as fases G1, S, G2 e M. Na fase G0 o DNA da célula apresenta-se superenovelado, com atividade nuclear baixa. A fase G1 é a fase preparatória para a duplicação do DNA, nela ocorre síntese intensa de proteínas e RNA para que na fase seguinte, fase S, ocorra a duplicação das cromátides dos cromossomos. Na fase G2 há a síntese de componentes para a mitose, como a tubulina, necessária para a formação dos microtúbulos. Por último a célula entra na fase M, onde ocorre a divisão celular, também chamada de fase mitótica(36). Nessas fases existem diversos mecanismos reguladores que irão afetar a multiplicação celular como, fatores de crescimento e os controles de retroalimentação. Entre as fases existe uma pausa na progressão do ciclo celular chamada ponto de checagem para reparar possíveis danos ao DNA. Caso o dano ao DNA seja muito grave para ser reparado, a célula pode ativar cascatas de sinalização apoptótica para prevenir a transmissão do DNA danificado para suas células filhas. Esses controles são necessários para deter a multiplicação anormal dessa célula, evitando a formação de tumores (37)

Entender os mecanismos de iniciação do câncer é importante, pois contribui para o desenvolvimento de ferramentas que facilitem o diagnóstico precoce(1). Além disso, para determinar o melhor curso do tratamento faz-se necessário a realização do estadiamento do tumor. O sistema de estadiamento mais utilizado atualmente é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. Nesse sistema, a extensão anatômica da doença é classificada utilizando como base a avaliação de três componentes: a extensão do tumor primário (T), a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais (N) e a ausência ou presença de metástase à distância (M). Esses parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente. Além disso, a classificação das neoplasias malignas também deve considerar: localização, tipo histopatológico, produção de substâncias e manifestações clínicas do tumor, além de sexo, idade, comportamentos e características biológicas do paciente. Dependendo do grau de estadiamento é determinada a melhor conduta terapêutica. (1).

Após realizado diagnóstico preciso a partir da história clínica e de exames físico detalhados, são determinadas as formas de tratamento, sendo as principais

metas: cura, prolongamento da vida e melhora da qualidade de vida. As terapias mais utilizadas no tratamento oncológico incluem procedimentos cirúrgicos, radioterapia, quimioterapia e transplant/e de medula óssea, aplicadas em associação ou isoladas(2). Na maioria dos casos é necessário combinar mais de um tipo de tratamento para alcançar resultados satisfatórios. A escolha dependerá do tipo de câncer, grau do tumor, agressividade, bem como o estado físico e imunológico do paciente(38). Neste contexto, a quimioterapia antineoplásica (QT) tem se tornado uma das formas mais importantes e promissoras para combater o câncer(1,39).

O tratamento quimioterápico consiste na administração intravenosa ou oral de fármacos antineoplásicos, como o 5-Fluorouracil (5-FU), irinotecano e cisplatina, administrados em intervalos regulares, com objetivo de reduzir o crescimento do tumor ou promover apoptose das células tumorais, principalmente para tumores sólidos e hematopoiéticos(9,16). A quimioterapia pode ser feita com a aplicação de um ou mais quimioterápicos e o protocolo de tratamento é definido de acordo com a finalidade do tratamento, podendo ser previa ao procedimento operatório ou iniciada após o tratamento cirúrgico(1,39).

Os quimioterápicos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química e função ou de acordo com sua especificidade no ciclo celular. De acordo com a especificidade de atuação no ciclo celular, podem ser divididas em drogas ciclo celular específicas e ciclo celular não específicas(40).

- *Ciclo específico*: atua somente nas células que se encontram em proliferação (ex.: ciclofosfamida).
- *Ciclo inespecífico*: atua nas células que estão ou não no ciclo proliferativo (ex.: mostarda nitrogenada).
- *Fase específica*: atua em determinadas fases do ciclo celular (ex.: metotrexato (fase S), etopósido(fase G2), e vincristina (fase M)).

Ainda, de acordo com sua estrutura química e função, os quimioterápicos podem ser classificados em agentes alquilantes, antibióticos antitumorais, nitrosuriais, alcalóides da vinca, miscelânea e medicamentos hormonais e agentes antimetabólitos(39,41,42).

Os agentes antimetabólitos incorporam-se à célula bloqueando a produção de enzimas ou interpondo-se às cadeias do DNA e RNA, impedindo a multiplicação e as funções normais da célula, causando a morte celular. Eles apresentam estrutura e função semelhantes aos metabólitos envolvidos na síntese dos ácidos nucleicos e são distribuídos em três classes: os análogos da purina, da pirimidina ou do ácido fólico. Dentre os fármacos antimetabólitos pode ser citado o 5-FU, classificado como análogo da pirimidina (42–44)

Entretanto os agentes antimetabólicos não atuam somente nas células tumorais, atingindo também as células de rápida proliferação, em especial as do tecido hematopoiético, germinativo, do folículo piloso e do epitélio de revestimento gastrointestinal, gerando efeitos colaterais precoces e imediatos como as náuseas, vômitos, mal-estar, adinamia, artralguas, exantemas, flebites, constipação intestinal, diarreias, mielossupressão e mucosites(45).

2.2. 5-FU e mucosite

O 5-FU é um agente quimioterápico desenvolvido em 1957, classificado como antimetabólito, fase específico (ativo na fase S e G1 do ciclo celular), análogo da uracila. Se difere da uracila pela substituição de um átomo de hidrogênio por flúor na quinta posição da molécula. Ele atua pela sua substituição, sendo incorporado ao DNA e/ou RNA da célula e assim interfere na biossíntese ou função dos ácidos nucleicos, causando alterações na duplicação celular e induzindo apoptose. Esse quimioterápico tem grande utilização nos tratamentos do câncer colorretal, devido a sua capacidade de inibição de processos essenciais para as células, como a síntese proteica e o metabolismo celular(12,18). Atua também, inibindo a atividade da enzima timidilato sintase (TS) e conseqüentemente afetando a produção do nucleotídeo timina e produção e reparação de DNA(18).

A principal via de administração do 5-FU é a via intravenosa. Após administrado ele entra rapidamente nas células, por meio do transporte facilitado e é ativado metabolicamente, gerando por reações enzimáticas os compostos trifosfato de fluorouridina (FUTP), monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP) ou trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP)(18).

Apesar de efetivo, sua ação difusa induz apoptose também de células saudáveis localizadas em tecidos de renovação constante, como a mucosa do trato

gastrointestinal (TGI), gerando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), promoção do estresse oxidativo, ativação de fatores de transcrição e aumento da produção de citocinas inflamatórias que amplificam os danos causados pelo quimioterápico(16,18). Esse aumento acarreta em inflamação e diversos efeitos colaterais, como diarreia, hemorragia, disbiose e mucosite intestinal(46,47). A mucosite intestinal é um dos principais efeitos colaterais resultantes da quimioterapia, caracterizando-se pela inflamação e perda celular na barreira epitelial que reveste o TGI.

2.3. Mucosite Intestinal

A mucosite intestinal é uma doença caracterizada por uma inflamação da mucosa do intestino, principalmente o intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), e acomete 20 a 40% dos pacientes tratados com dose padrão desse medicamento (entre 10 e 15 mg / kg de peso corporal, para 3-4 dias por via intravenosa) e cerca de 80-100% dos pacientes tratados com altas doses (entre 350 e 500 mg / kg de peso corporal)(48). É caracterizada por alterações nas estruturas das vilosidades intestinais, ulcerações, redução da barreira intestinal, diarreia, desnutrição, perda de peso e, conseqüentemente, piora do estado nutricional e qualidade de vida desses pacientes(6,46). Além disso, gera redução do número de células caliciformes, infiltração de células inflamatórias na lâmina própria, bem como a afrouxamento das *tight junctions* (TJ) e aumento da permeabilidade intestinal, podendo levar à infecções graves e sepse (21,45,49). Devido a essas complicações, a mucosite pode interferir no processo de terapia antineoplásica, levando a necessidade de redução da dose ou até a interrupção do tratamento(50–52). Dessa forma, pode prolongar o tempo de internação dos pacientes, aumentando custos hospitalares(12).

Em 2004, Sonis propôs modelo para explicar a fisiopatologia da mucosite dividindo sua evolução em cinco fases: iniciação; regulação positiva e geração de mensagem; sinalização e amplificação; ulceração e cura. A primeira fase ocorre imediatamente após a exposição a agentes citotóxicos, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e lesão celular que atinge as células do epitélio basal, bem como o endotélio da submucosa. Na segunda fase ocorre ativação de fatores de transcrição importantes, em particular o NF- κ B, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o Fator Necrose Tumoral (TNF), a Interleucina 1 β (IL-1 β) e a Interleucina 6 (IL-6), agravando o dano tecidual, redução

da oxigenação e a apoptose das células epiteliais basais. Essas citocinas geram ampliação da resposta inflamatória por feedback positivo, ativando outras vias de sinalização e fatores de transcrição na terceira fase, dentre eles as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), o fator p21 e a protease caspase 3, o que acarreta aumento do dano tecidual. A partir do aumento do dano tecidual, os sintomas associados a doença ficam mais evidentes, caracterizando a fase de ulceração. Após a interrupção do tratamento, a fase final é cicatrização ou cura(16).

Entretanto, estudos têm demonstrado que a microbiota intestinal também está envolvida na patogênese e gravidade da mucosite intestinal(53,54). Dessa forma, VLIET, et al(54), propuseram cinco vias nas quais a microbiota pode influenciar a barreira intestinal e, conseqüentemente o desenvolvimento da mucosite: influenciando o processo inflamatório e estresse oxidativo, a permeabilidade intestinal, a composição da camada de muco, o reparo epitelial e a ativação e liberação de moléculas efetoras imunes. De forma mais detalhada, microbiota se liga aos receptores do tipo *toll* (TLRs), gerando uma cascata de eventos e translocação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) levando a uma diminuição nos níveis de endotoxinas e níveis plasmáticos de IL-6 e aumentando a produção da citocina anti-inflamatória Interleucina 10 (IL-10)(53). A estimulação do TLR2 também leva a fosforilação, de proteína quinase C (PKC), levando a melhora da integridade da barreira epitelial intestinal associada a Zonulina 1(ZO-1) e, conseqüentemente, reduzindo a permeabilidade intestinal (55). A microbiota também pode atuar no aumento da expressão dos genes MUC 2 e MUC 3 aumentando a síntese de mucina e aumentando a camada de muco epitelial e na ativação e liberação de moléculas efetoras imunes. Já na etapa de cicatrização, a microbiota contribuir para estimular os processos de reparação tecidual (53).

Conclui-se que a etiologia da mucosite intestinal é provocada por uma cascata de eventos, iniciada pela apoptose das células intestinais pela ação dos quimioterápicos, como o 5-FU, potencializado pelo efeito inflamatório e pela presença de toxinas bacterianas (54). Como consequência, leva ao dano funcional e estrutural do epitélio, afetando barreira intestinal, gerando aumento da permeabilidade intestinal e o risco de a translocação bacteriana(56).

2.4. Barreira Intestinal

O TGI é formado pela faringe, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e reto e atua nos processos de digestão, absorção de nutrientes e manutenção da homeostase intestinal. É um dos maiores meios de integração do organismo com o meio externo(57,58), sendo revestido por quatro camadas: serosa, muscular, submucosa e mucosa(59,60).

A camada serosa é a camada mais externa da parede do intestino e é formada por vasos sanguíneos e linfáticos, tecido adiposo e tecido conjuntivo frouxo(59,60). A camada muscular é formada por uma camada de músculo liso e é responsável pela ruptura mecânica e o peristaltismo dos alimentos dentro do lúmen(59). A submucosa é uma camada de tecido conjuntivo subjacente ao epitélio constituída por vasos sanguíneos e linfáticos, glândulas submucosas e plexo de *Meissner*(60). A camada mais interna do tubo gastrointestinal, denominado de túnica mucosa é composta por três tecidos: muscular da mucosa, conjuntivo ou lâmina própria (LP) e epitelial de revestimento (61,62).

O epitélio intestinal é a primeira barreira física que separa o interior do hospedeiro dos patógenos e toxinas advindos do ambiente. É composto por camada única de células epiteliais intestinais (IECs) (57,63). Morfologicamente, o epitélio se estende formado estruturas e invaginações, denominadas vilosidades e criptas de *Lieberkuhn*, que se projetam para dentro do lúmen, com a finalidade de aumentar a área de superfície da mucosa e a absorção de nutrientes(64). Essas estruturas são formadas por quatro tipos celulares principais: enterócitos, células caliciformes, células enteroendócrinas e as células de *Paneth*(57,63). Os enterócitos apresentam borda em escova, caracterizada por densa matriz de vilosidades em sua superfície apical e são ligadas por complexos juncionais que consistem em junções firmes (*tight junctions*), junções aderentes (*adherens junctions*) e desmossomos (*desmosomal junctions*). Esses complexos são responsáveis pelo controle do transporte paracelular do epitélio e o seu enfraquecimento resultar no aumento da permeabilidade intestinal (PI)(65–68). Devido a essas características, são responsáveis pela absorção e funções metabólicas e digestivas(58,69–71). Já as células enteroendócrinas, de *Paneth* e caliciformes são células secretoras importantes para o processo digestivo e função de barreira do epitélio(72,73).

As células enteroendócrinas secretam diversos hormônios intestinais, dentre os quais peptídeos e catecolaminas. As células de *Paneth* residem nas criptas do

intestino delgado e secretam peptídeos e outros agentes antimicrobianos (como as defensinas e lisozimas). Além disso, as atuam na homeostase das células-tronco, pela produção do fator de crescimento epidérmico (EGF), o ligante Notch Dll4 e ligantes Wnt(74). Já as células calciformes estão distribuídas no epitélio de revestimento e nas glândulas intestinais e produzem mucinas que compõe a camada de muco(57). A mucina 2 é a mais abundante e essencial para a organização da camada de muco na superfície do cólon(72,73). Além de limitar o contato direto das bactérias com o epitélio, a camada de muco consegue reter outras substâncias, como os peptídeos antimicrobianos, liberados pelas células de *Paneth*, e a imunoglobulina A secretora (sIgA), aumentando a interação com o sistema imune da mucosa(72,75–78).

Além das barreiras físicas, o intestino contém o maior número e diversidade de compartimentos imunológicos e células imunológicas do corpo, como os tecidos linfóides associados ao intestino (GALT)(79). O GALT de humanos e camundongos é formado por tecidos linfóides multifolículos, de forma isolada no intestino grosso ou formando agregados como nas placas de Peyer no íleo e faz parte tanto do sistema imune inato, quanto adaptativo(80,81).

O início da resposta imune inata celular é mediado pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) pelos receptores celulares de reconhecimento de padrões (PRRs). Os receptores do tipo *toll* (TLRs) são os mais importantes nos mamíferos e estão presentes nas células epiteliais intestinais (enterócitos), macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T e células do estroma(82). Os TLR atuam ativando respostas antimicrobianas inatas e adaptativas que resultam na ativação do NF- κ B e na produção de citocinas e quimiocinas que promovem o recrutamento de várias células inflamatórias. Além disso, a sinalização de TLRs no intestino estimula a proliferação de células epiteliais, produção de IgA, a manutenção das *tight junctions* e expressão de peptídeos antimicrobianos por células epiteliais(82). Os TLR também atuam na formação/disponibilidade de receptores do tipo NOD presentes no plasma celular (NLR), principalmente o NLRP3, induzindo a formação de complexos proteicos responsáveis pela ativação de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , desencadeando o processo inflamatório (83,84).

A interação da microbiota com TLRs contribui para a homeostase intestinal potencializando a função da barreira intestinal. (81,85).

2.5. Microbiota Intestinal

O intestino dos mamíferos abriga grande número bactérias, fungos, protozoários e vírus, que formam uma comunidade ecológica e simbiótica denominada microbiota intestinal. A composição e a densidade dessas espécies variam consideravelmente ao longo do TGI e oferecem vários benefícios ao hospedeiro como, nutrição, metabolismo, imunidade e manutenção da homeostase(31,80). Sua densidade aumenta da região proximal para a distal, de forma que baixas concentrações e diversidade bacteriana são encontradas no TGI superior, como estômago e duodeno que apresentam em média 10^1 - 10^3 células microbianas por grama de conteúdo. Já, na porção inferior as concentrações variam entre 10^4 - 10^7 no jejuno e íleo e 10^{11} - 10^{12} no cólon(86). A maioria das bactérias que colonizam o TGI são anaeróbias e principalmente dos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* (57,87). Essa composição é determinante na homeostase intestinal e quando ocorre desequilíbrio, denominada disbiose, pode gerar o desenvolvimento de doenças infecciosas, bem como contribuir para o desencadeamento de doenças inflamatórias crônicas e autoimunes(88).

A disbiose pode ser definida como mudança não natural na composição da microbiota e o desequilíbrio entre bactérias protetoras e aumento da concentração de bactérias nocivas, como as do gênero *Clostridium*, que induzem as células epiteliais intestinais, macrófagos e células dendríticas ativadas a secretar citocinas pro inflamatórias como IL- 1β , IL-6, Interleucina 12 (IL-12), e Interleucina (IL-23)(88– 90).

Diversas situações podem levar a disbiose intestinal como, a alimentação, estilo de vida, presença de doenças, uso de medicamentos e algumas drogas como os quimioterápicos(10,11,19,91–93). Estudos indicam que o tratamento com 5-FU, leva a redução da população de *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp., e um aumento de *Escherichia* spp e *Enterobacter*(94,95). Essa disbiose pode ser responsável por reduzir os efeitos terapêuticos e aumentar a toxicidade, regulando a resposta do indivíduo aos regimes de quimioterapia(96,97).

Dada a possibilidade de que a mucosite intestinal esteja intimamente relacionada à disbiose da microbiota intestinal, microrganismos probióticos foram apresentados como tratamento alternativo devido às suas propriedades benéficas no trato gastrointestinal(12,19,33,98–100) .

2.6. Probióticos

Probióticos são microrganismos vivos isolados ou em preparações que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (101,102). Para que um microrganismo seja considerado probiótico, deve sobreviver ao estresse fisiológico causado pelo Potencial Hidrogeniônico (pH) do lúmen gástrico, à ação da bile e das secreções pancreática e intestinal e não apresentar qualquer risco para o hospedeiro(103,104).

Os organismos probióticos são cruciais para a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal humana e assim conferem benefícios, como colonização e regulação de uma microbiota intestinal disbiótica, efeitos antagônicos à microrganismos patogênicos, adesão competitiva à mucosa e epitélio (atividade antimicrobiana), aumento da produção de muco e IgA, aumento da integridade da barreira (aumento da função de barreira), modulação do sistema imunológico humano (imunomodulação) e produção de substâncias antimicrobianas, como ácido acético e lático e AGCC(105–110).

Para ser empregada como probiótico, a bactéria precisa ter efeito benéfico ao hospedeiro comprovado in vivo e in vitro por meio de uma dose conhecida, ser capaz de se aderir ao muco ou epitélio intestinal e oferecer segurança comprovada. Em sua maioria, pertencem a uma lista limitada de gêneros, basicamente, *Limosilactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp(111). Os *Limosilactobacillus* ou bactérias do ácido láticas (BAL), por serem membros importantes da microbiota humana e possuírem diversos efeitos na saúde do hospedeiro estão entre os probióticos mais amplamente usados.

2.6.1. Bactérias Ácido-Láticas

As BAL são gram-positivas, podem ter formato de cocos ou bastonetes, não esporulantes, citocromo ausentes, não móveis, tolerantes a ácidos, anaeróbica, mas

aerotolerantes e catalase-negativos. A maioria faz parte do filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* e ordem *Lactobacillales*, que inclui seis famílias, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* e *Streptococcaceae*. Possuem limitadas habilidades biossintéticas e necessitam de complexidade de nutrientes para crescimento e multiplicação, como vitaminas B, purinas, pirimidinas e vários aminoácidos. Além disso, não possuem a capacidade de produção de proteínas heme, de modo que seu metabolismo energético é majoritariamente fermentativo(112) e seu metabolismo é caracterizado pela produção de ácido láctico como o principal produto da fermentação de carboidratos(28,113).

A fermentação pode ser feita por duas vias metabólicas, homofermentativa e heterofermentativa. A primeira via é baseada na glicólise com produção predominante de ácido láctico. Alguns gêneros homofermentativos são *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e alguns *Lactobacillus*. Já a segunda via, é realizada por bactérias que não possuem a enzima glicolítica frutose 1,6 bifosfato aldolase. Dessa forma, utilizam a via da pentose fosfato, caracterizada pela produção de lactato e de CO₂ e etanol ou acetato. Alguns gêneros heterofermentativos são *Leuconostoc*, *Oenococcus*, e algumas espécies de *Limosilactobacillus* (28,112,113). O lactato produto da fermentação bacteriana é constituído por uma mistura dos estereoisômeros D(-)-lactato e L(+)-lactato, sendo que o isômero ótico D(-)-lactato não é metabolizado pelos tecidos e é considerado um composto não fisiológico(114,115).

O uso de probióticos contendo cepas de BAL tem apresentado efeitos positivos na ativação da imunidade mucosa e sistêmica e resistência a doenças infecciosas.(33,116) Há evidências de que o uso de bactérias probióticas pode ter efeitos terapêuticos em distúrbios gastrointestinais, como doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino irritável e mucosite, devido a seu potencial imunomodulador e aumento da proliferação de enterócitos(25,26,117,118).

Os principais mecanismos de ação no hospedeiro descritos para BAL incluem: inibição da ativação da via de sinalização NF-κB; fortalecimento de *tight junctions*; modulação das respostas do sistema imune inato e / ou adaptativo do hospedeiro por meio da interação com células epiteliais, células dendríticas, monócitos, macrófagos e linfócitos; indução da produção de mucina; competição por locais de adesão da mucosa e produção de metabólitos como AGCC, substâncias

antimicrobianas, como ácidos acéticos e lácticos, e bacteriocinas(119). Esses metabólitos podem ser secretado por bactérias viáveis ou liberado após sua lise e são denominados posbióticos(120).

2.7. Posbióticos

O termo pósbiótico é a combinação da palavra 'biótico', definido como "relacionado a ou resultante de organismos vivos" e 'pós', um prefixo que significa 'depois'. Por ser um termo recente, ainda não existe consenso sobre sua definição. Artigo recente publicado na revista *Nature*, propõe que pós-biótico é uma “preparação de microrganismos inanimados e / ou seus componentes que confere um benefício à saúde do hospedeiro”(121). Podem ser incluídos fatores solúveis (produtos ou subprodutos metabólicos) secretados por bactérias vivas ou liberados após a lise bacteriana, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), enzimas, peptídeos, ácidos teicóicos, muropeptídeos derivados de peptidoglicanos, endo- e exo-polissacarídeos, proteínas de superfície celular, vitaminas, plasminogênios e ácidos orgânicos, como o ácido láctico(122–124). Para melhor definição, alguns critérios foram propostos para se qualificar como um pós-biótico:

- Caracterização molecular dos microrganismos progenitores;
- Descrição detalhada do procedimento de inativação e a matriz;
- Confirmação de que a inativação ocorreu;
- Evidência de benefício para a saúde do hospedeiro a partir de umensaio controlado de alta qualidade;
- Descrição detalhada da composição da preparação pós-biótica;
- Avaliação da segurança da preparação pósbiótica no hospedeiro alvo para o uso pretendido.

Os posbióticos podem ser classificados por sua composição básica, incluindo; proteínas (lactocepina, p40, molécula p75 (solúvel proteínas), lipídios (butirato, propionato, plasmalogênio derivado de dimetil acetil), carboidratos (polissacarídeos ricos em galactose e ácidos teicóicos), ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido propiônico e 3-fenil láctico), vitaminas (vitaminas do grupo B) e moléculas

complexas, como ácidos lipoteicóicos e muropeptídeos derivados de peptidoglicanos(124).

Estes possuem diversas funções biológicas que incluem imunomodulação, efeitos anti-inflamatório, hipocolesterolêmico, anti-obesogênico, anti-hipertensivo, antiproliferativo e antioxidantes(125). Os mecanismos envolvidos ainda não são totalmente elucidados. Salminen e Colaradores (2021) propuseram possíveis vias de ação dos pós-bióticos descritos a seguir:

- Modulação benéfica da microbiota: estudos indicam possíveis efeitos antimicrobianos dos pósbióticos por competirem com microorganismos residentes por locais de adesão devido presença de adesinas (como fímbrias e lectinas)(126–129)
- Melhorar a função de barreira epitelial: estudo demonstrou que acetato (0,5 mM), propionato (0,01 mM) e butirato (0,01 mM), sozinhos ou em combinação, aumentaram a resistência transepitelial e estimularam a formação de *tight junctions* em células epiteliais intestinais Caco-2. O mecanismo proposto foi a inibição da formação do inflamassoma de NLRP3 e a autofagia(130). Butirato demonstrou reduzir a permeabilidade paracelular por meio da ativação da lipoxigenase promovendo a acetilação da histona em linhagens celulares Caco-2(131).
- Modulação das respostas imunológicas: estudo demonstrou que derivados de indol gerados por *Limosilactobacillus reuteri* podem ativar o receptor de aril-hidrocarboneto em células T CD4 + no intestino de camundongo, induzindo a diferenciação em linfócitos intraepiteliais CD4 + CD8 α + duplo-positivos(132).

Além disso, os benefícios do uso de pósbióticos têm sido cada vez mais estudados devido a suas vantagens frente aos probióticos, como sua estabilidade inerente, tanto durante os processos industriais quanto no armazenamento e sua possível redução dos riscos associados à administração de microorganismos vivos como bacteriemia ou fungemia(121,133).

Os posbióticos preparados a partir de BAL contêm vários metabólitos bioativos, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), carboidratos, peptídeos

antimicrobianos, enzimas, vitaminas, cofatores, compostos de sinalização imunológica e agentes complexos e ácidos orgânicos, como piruvato e ácido lático. A quantidade e o tipo de produtos estão relacionados principalmente ao tipo de cepa bacteriana, tipo de meio de cultura e outros(134).

A importância dos probióticos foi demonstrada por Watanabe e colaboradores(33) ao comparar a suplementação com *Limosilactobacillus casei* Shirota (LcS) viável e inativado por calor. O tratamento diário, por uma semana com LcS viável (10^7 - 10^9 unidades formadoras de colônia) foi capaz de prevenir lesão intestinal induzida por indometacina em ratos e inibiu aumento na atividade da mieloperoxidase e expressão de RNA mensageiro (mRNA) para fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Entretanto ao tratar os animais com LcS inativado não foi observado os mesmos resultados. Os animais do grupo LcS inativado apresentaram escore de lesão semelhante ao grupo não tratado, ou seja, o probiótico inativado não foi capaz de prevenir as lesões intestinais causadas por indometacina, indicando que um possível mecanismo de ação estaria relacionado a liberação de metabólitos como AGCC, durante o metabolismo. (33).

2.7.1. Ácido Graxo de Cadeia Curta (AGCC)

Ácidos Graxos de Cadeia curta são produzidos pela metabolização dos carboidratos não digeríveis da dieta pela microbiota intestinal. Os principais AGCC são acetato, butirato, propionato e são encontrados em altas concentrações no trato intestinal, principalmente no cólon. As concentrações variam de 70 a 140 mm³ no cólon proximal e 20 a 70 mm³ no cólon distal(135). Os AGCC desempenham papel na homeostase do epitélio intestinal por meio dos seus efeitos na proliferação e apoptose dos colonócitos, além de melhorar a defesa imunológica(136). Eles são capazes também de induzir a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 e de inibir a ativação da via de sinalização NF- κ B. Tanto o acetato quanto o propionato e o butirato podem também ser produzidos pela utilização do lactato por espécies bacterianas fermentadoras de lactato conforme a via apresentada na figura 1 (34).

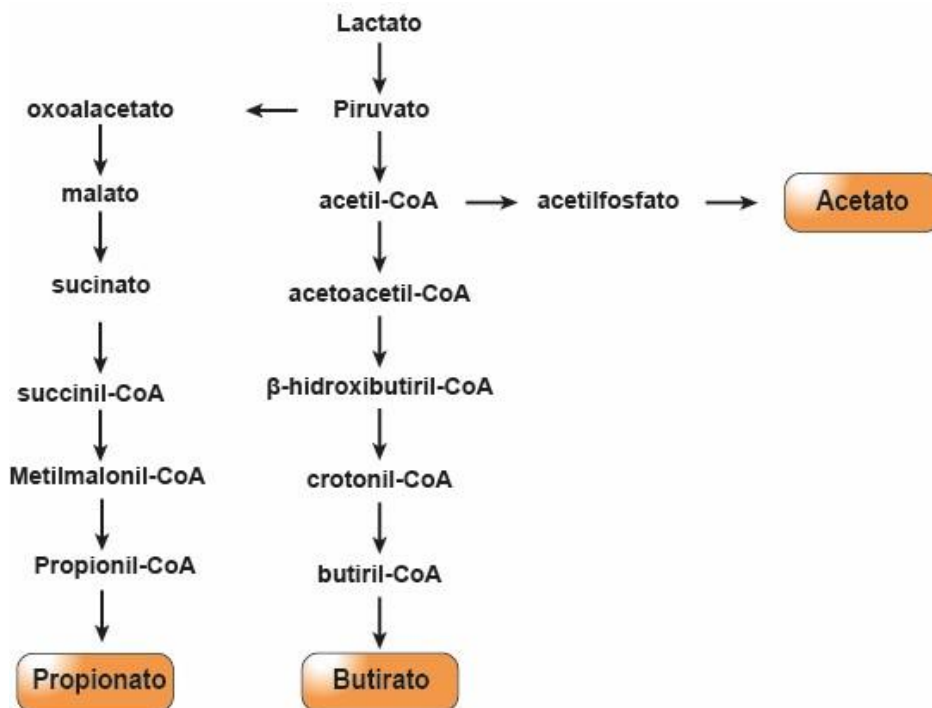


Figura 1. Esquema para formação de acetato, propionato e butirato. Figura adaptada de Esquivel-Elizondo(137) e Stams(138). Para conversão em acetato e butirato e propionato, o lactato é convertido em piruvato pela lactato desidrogenase. Em seguida é oxidado em acetil coenzima A (acetil-CoA). Para a formação de butirato, duas moléculas de acetil-CoA são condensadas em uma molécula de acetoacetil-CoA e, subsequentemente, reduzidas a butiril-CoA e convertidas em butirato pela enzima acetil-CoA. Já para acetato, o acetil-CoA é convertido em acetilfosfato pela enzima fosfato acetiltransferase e a acetato pela acetato quinase. O lactato também pode ser convertido a propionato pela via do Metilmalonil-CoA. (DUNCAN, 2004; REHM, 1991)

2.7.2. Ácido Lático

Ácido láctico é um ácido hidroxicarboxílico, de fórmula $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$ sendo uma molécula quiral com dois enantiômeros ópticos, dextrógiro (D) e levógiro (L) (139). Pode ser produzido por síntese química ou fermentação microbiana, principalmente das bactérias ácido lácticas, incluindo Lactobacilos, Bifidobactérias, Enterococos e Streptococos e também pode ser produzido por anaeróbios estritos, como *Eubacterium spp* (113,140). Suas características dependem se ele se encontra na forma (D) ou (L), ou na forma racêmica (mistura dos enantiômeros), de acordo com a tabela 1(141).

Propriedades	Valores	Forma
Massa molar (g/mol)	90,08	D, L, DL
	52,8	D

Ponto de fusão (°C)	53,0	L
	16,8	DL
Ponto de ebulição (°C) a 0,5mmHg	82,0	DL
Ponto de ebulição (°C) a 14mmHg	122,0	DL
Constante de dissociação (pKa) a 25°C	3,83	D
	3,79	L
Capacidade calorífica (J/mol°C) a 20°C	190	DL
Calor de solução (kJ/mol) a 25°C	7,79	L
Calor de fusão (kJ/mol)	16,86	L
	11,33	DL

Tabela 1. Propriedades dos isômeros do ácido láctico.

Devido a sua constante de dissociação ser entre 3,79 e 3,83, 99% do ácido láctico presente nos fluídos corporais encontram-se dissociados nos íons lactato e H⁺. Dessa forma, costuma-se denominar o ácido láctico de “lactato”(142).

A concentração de lactato intestinal e fecal depende do equilíbrio entre a produção bacteriana e a absorção do hospedeiro, associado à utilização microbiana. Em condições de homeostase o lactato produzido é praticamente todo consumido pelas bactérias utilizadoras de lactato e sua concentração nas fezes variam de 1mM/L a 5mM/L(143). Entretanto, em algumas condições clínicas, como doenças inflamatórias intestinais, essa concentração pode aumentar para uma média de 21,4mM, em distúrbios intestinais, como colite ulcerativa(144).

Considerada uma molécula bioativa, o lactato atua como sinalizador de funções do sistema imunológico via receptor 1 do ácido hidroxicarboxílico (HCAR1), anteriormente conhecido como receptor 81 acoplado à proteína G (GPR81) em macrófagos e pela via TLR4 em monócitos e GPR31 nas células dendríticas(31,145–147). Em macrófagos o lactato atua recrutando a molécula adaptadora intracelular ARRB2 e conseqüentemente inibindo a ação do inflamassoma de NLRP3, reduzindo ação do NF-κB e diminuição da conversão de pró-IL-1β em IL-1β ativa pela enzima caspase 1(146,147). (Figura 2)

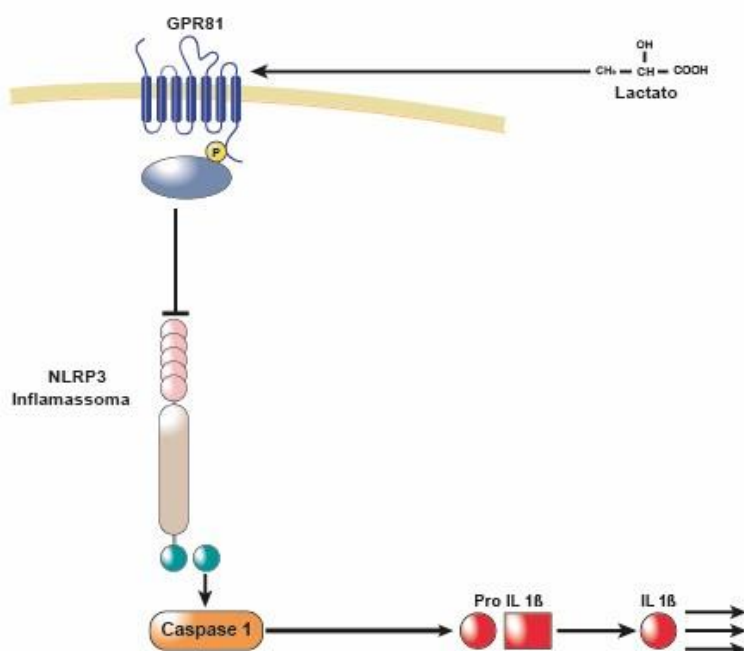


Figura 2 – Via GPR81 inibe conversão IL1 – Figura adaptada de Lerch et al(147). Lactato atua via receptor GPR81, recrutando a molécula adaptadora intracelular ARRB2 e consequentemente inibindo a ação do inflamassoma de NLRP3, reduzindo a conversão de pró-IL-1 β em IL-1 β ativa pela enzima caspase 1.

Resultados de IRAPORDA et al. corroboram com essa via de sinalização do lactato, no qual demonstraram que o lactato presente no leite fermentado Kefir inibiu a sinalização de NF- κ B nas células, além de inibir a ativação de células epiteliais intestinais desencadeadas por IL-1 β , TNF- α ou flagelina, regulando dessa forma os processos inflamatórios(30).

O lactato também atua na recuperação celular via receptor GPR81 aumentando expressão do gene *Wnt3* nas células de *Paneth* e células estromais e a produção da proteína *Wnt3a*. Essa proteína se liga ao receptor *Frizzled*, levando a um aumento na concentração da proteína β -catenina, que, ao translocar para o núcleo age como fator de transcrição e induz o crescimento e proliferação de célula- tronco intestinal que expressam o Receptor 5 acoplado a proteína G rico em repetição de leucina (Lgr5+ ISCs). As Lgr5+ ISCs mantêm a homeostase intestinal dividindo-se para extinguir ou substituir ISCs (31) (Figura 3).

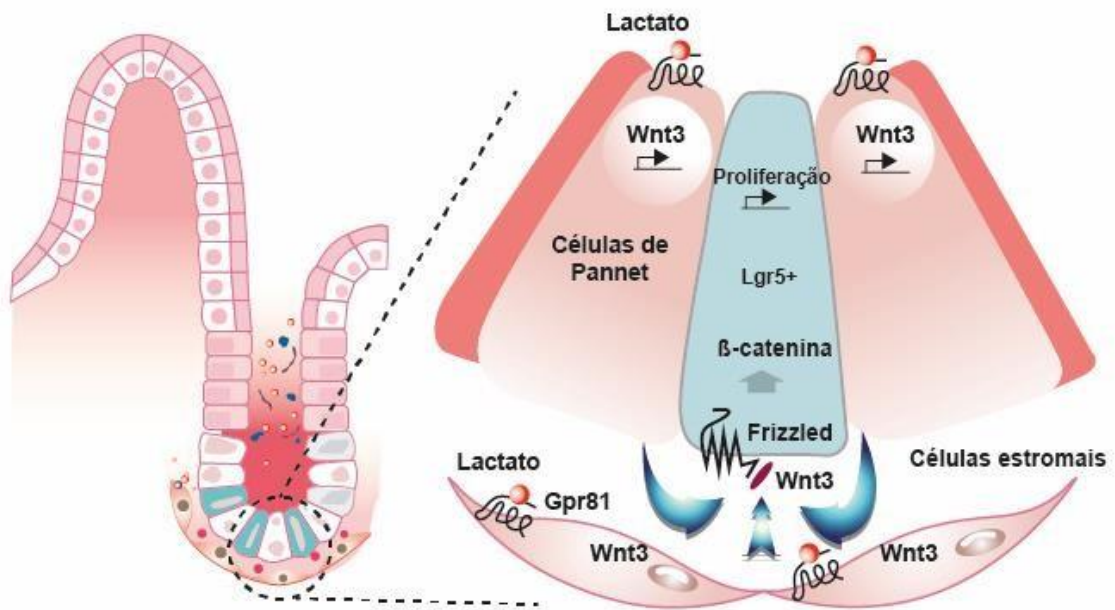


Figura 3 – Via GPr81 ativa recrutamento das células estromais. Figura adaptada de LEE et al, 2018. Lactato age via receptor GPR81 aumentando a produção das proteína Wnt3 e β -catenina, que, ao translocar para o núcleo age como fator de transcrição e induz o crescimento e proliferação de célula-tronco intestinal Lgr5+.

Além disso, o lactato também contribui para respostas imunológicas aprimoradas, induzindo a protrusão dendrítica via GPR31 em células dendríticas, Dessa forma, aumenta a resposta imune a bactérias patogênicas e a resistência a infecções (Figura 4)(145).

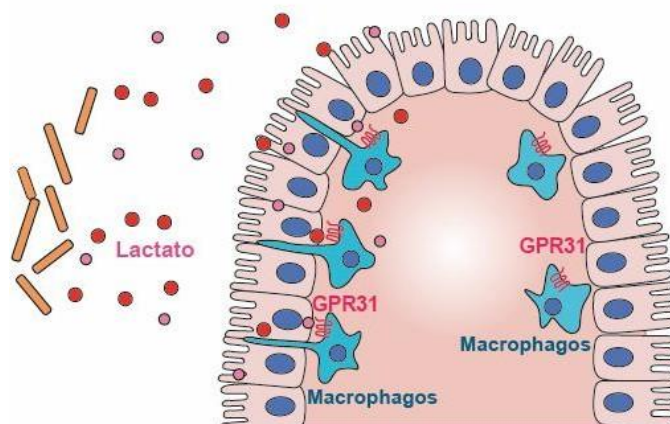


Figura 4 – Via GPR31 ativação de protusão dendrítica. Figura adaptada de MORITA, et al 2019. Lactato estimula protusão dendrítica via receptor GPR31.

Estudo realizado por Lee e colaboradores demonstram que o lactato derivado de BAL desempenhou papel fundamental na promoção do desenvolvimento epitelial mediado por célula-tronco intestinais, de uma maneira dependente de receptor específico para lactato Gpr81. Ratos alimentados por 5 dias com probióticos VSL#3 contendo BAL, como *Bifidobacterium* e *Limosilactobacillus spp* apresentaram aumento da altura da cripta, das célula-tronco intestinais, das células Paneth e das células caliciformes no intestino delgado, comparado aos ratos alimentados com PBS. Entretanto, esse efeito não foi observado com a suplementação de *L. plantarum* sem atividade de lactato desidrogenase(31).

Contudo, o lactato também pode exercer efeitos negativos, como redução do pH intestinal, que pode levar a mudanças na microbiota e crescimento de bactérias redutoras de sulfato. O produto do metabolismo dessas bactérias é o sulfeto de hidrogênio (H₂S), pois as mesmas usam sulfato como um aceptor de elétrons terminal em seu metabolismo. Esse gás afeta negativamente a mucosa intestinal e as células epiteliais, inibe o crescimento de colonócitos, causa a morte de bactérias intestinais, principalmente *Limosilactobacillus*, e induz hiperproliferação e anormalidades metabólicas de células epiteliais, levando ao desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais(148–150). Estudo avaliou a relação da comunidade de bactérias utilizadoras de lactato com os sintomas gastrointestinais infantis em uma coorte de 40 bebês saudáveis. Os resultados mostraram um desequilíbrio na colonização de bactérias produtoras e utilizadoras de lactato, levando ao acúmulo de lactato e H₂S, o que contribuiu para uma alta prevalência de flatulência e dor nos primeiros meses de vida(150). Outro estudo avaliou a relação entre lactato fecal e inflamação intestinal ou má absorção em 100 pacientes internados em um centro de referência para distúrbios gastrointestinais. Os resultados mostraram que 21% dos pacientes tinham concentrações de DL-lactato (intervalo, 8-95 mmol / l) acima do limite de 95% (6,1 mmol / l) em indivíduos saudáveis. Sendo que o pior resultado é observado nos pacientes com proctite, pois 11 de 15 pacientes apresentaram aumento da lactato fecal (média 32 mM; variação, 8-95 mM)(151).

Diante de resultados contraditórios sobre o efeito e mecanismos de ação e baseado nos dados não publicados no nosso grupo de pesquisa em que avaliou as

diferenças da suplementação de *L. Rhamnosus* vivo e inativado na mucosite e observou melhora mais significativa dos efeitos colaterais nos animais tratados com Lr inativado, como redução da permeabilidade intestinal (PI) e melhora dos parâmetros histológicos e morfométricos, torna-se necessário avaliar os efeitos desse metabólito na prevenção e tratamento da mucosite.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação de lactato nas concentrações de 10mM, 100mM e 200mM e se seu uso é capaz de melhorar as lesões da mucosite intestinal induzida por 5-FU.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar se a suplementação com lactato influencia na evolução ponderal e consumo dos animais;
- Avaliar se a suplementação com lactato interfere no tamanho do intestino, na permeabilidade intestinal e na expressão de mRNA das proteínas de junções firmes;
- Avaliar as alterações histológicas, morfológicas e produção de muco induzidas pela mucosite intestinal e pela suplementação com lactato;
- Avaliar o infiltrado inflamatório no intestino dos animais com mucosite intestinal e a interferência do lactato;
- Avaliar os efeitos da mucosite intestinal e da suplementação com lactato no estresse oxidativo;
- Avaliar as concentrações dos ácidos graxos de cadeia curta nas fezes dos animais com mucosite intestinal e suplementados com lactato.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos machos BALB-c, entre 6 a 8 semanas de idade e pesando entre 16 e 23 gramas, foram mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia da

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com controle da iluminação (ciclo de luz claro/escuro de 12 horas), com acesso à água e comida *ad libitum*. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG), sob o protocolo nº 186/2012, (ANEXO I) e está em conformidade com o guia recomendado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para o cuidado e uso de animais de laboratório(152). Além disso, todas as normas determinadas pelo guia *Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*(153)- ARRIVE de experimentação animal foram respeitadas.

4.2 Lactato

Foi utilizado solução de lactato da marca Sigma- Aldrich ®, teor 85%, código W261106 e lote MKCD2387, padrão de qualidade *Food Chemicals Codex* (FCC). O lactato concentrado foi mantido em temperatura ambiente e as soluções foram preparadas diariamente diluindo em água destilada para atingir as concentrações de 10mM, 100mM e 200mM. Considerando que o lactato possui massamolar: 90,08 g/mol e densidade 1220gg/L e a solução utilizada é composta por 85% de lactato, foi calculada quantidade suficiente em µl para obter as soluções com a concentração desejada.

10mMol/L – 0,01 mol x 90,08g – 0,9g/L

100mMol/L – 0,1mol – 90,08g 9g/L

200mMol/L – 0,2 mol – 90,08g 18g/L

Cada animal recebeu 200µL de solução conforme modelo descrito por IRAPORDA(154).

4.3. Delineamento experimental

Foram utilizados 48 camundongos divididos aleatoriamente em oito grupos (n=6): Controle (CTL) – salina; sem indução da mucosite; Controle + Lactato 10mM (CTL 10) - lactato sem indução da mucosite; Controle + Lactato 100mM (CTL 100)- lactato sem indução da mucosite; Controle + Lactato 200mM (CTL 200)- lactato sem indução da mucosite; Mucosite (MUC) salina; indução da mucosite, Mucosite +

Lactato 10mM (MUC 10)- lactato indução da mucosite, Mucosite + Lactato 100mM (MUC 100)- lactato indução da mucosite, Mucosite Lactato 200mM (MUC 200)- lactato indução da mucosite.

Os camundongos dos grupos CTL e MUC receberam 0,2 mL de salina por gavagem. Já os animais dos grupos MUC 10, MUC 100 e MUC 200 receberam, por gavagem, 0,2 mL de solução de lactato nas concentrações de 10, 100 e 200mM respectivamente. A suplementação ocorreu durante 13 dias (D1-D13) e a gavagem foi administrada sempre no mesmo horário (Figura 5).

A indução da mucosite foi realizada no 10º dia, da suplementação com lactato, por injeção intraperitoneal (IP) de 5-FU (300 mg/Kg)foi realizada no 10ºdia, da suplementação com lactato, e foi baseada no de acordo com o método já estabelecido em estudos anteriores do nosso grupo(56). Os animais dos grupos MUC, MUC 10, MUC 100 e MUC 200 receberam o quimioterápico, enquanto os animais dos grupos CTL receberam injeção IP com o mesmo volume de salina(NaCl 99%).

Após 72 horas da indução da mucosite (D13), os animais foram anestesiados intraperitonealmente com solução contendo 0,2mL de Cetamina (Dopalen®) e 0,2mL Xilazina (Dopaser®) e 1,2 mL de Solução Salina (NaCl 2%). Cada animal recebeu 0,0150mL IP. Em seguida o sangue foi colhido da veia axilar com o auxílio de pipeta de Pasteur e os animais foram então eutanasiados por deslocamento cervical sob anestesia para a coleta das amostras para as análises (Figura 5).

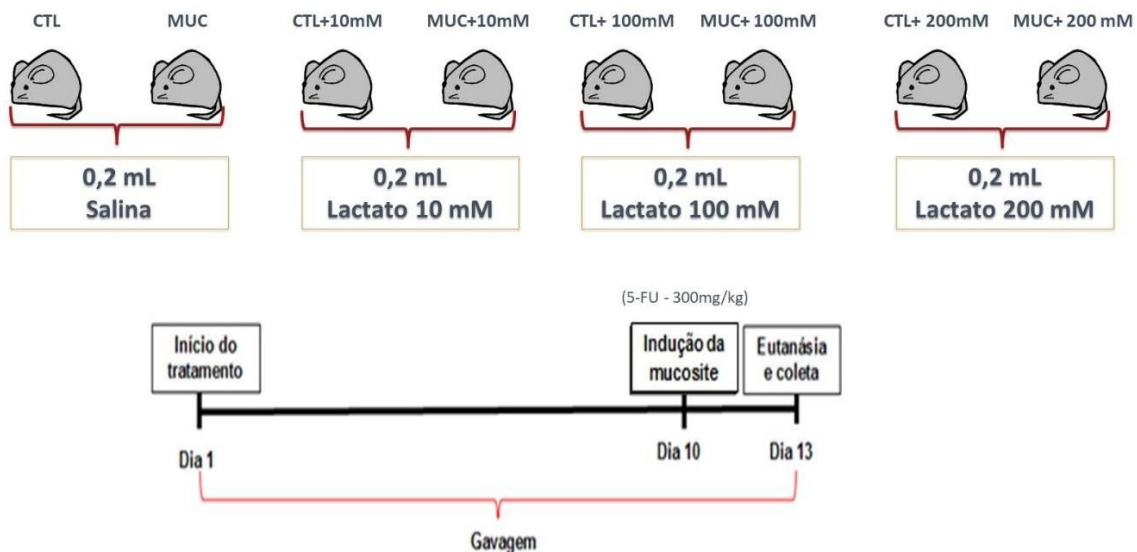


Figura 5. Representação esquemática do delineamento experimental do estudo.

Dia 1 – Início do tratamento. Dia 10 – Indução da mucosite pelo quimioterápico 5-FU. Dia 13 – Eutanásia dos animais e coleta das amostras

5. ANÁLISES REALIZADAS**5.1. Consumo alimentar e alteração ponderal**

Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração comercial da linha laboratório para ratos e camundongos da marca Presence®. A quantidade ingerida foi mensurada, diariamente, por meio da diferença entre o peso da ração ofertada e a sobra. O consumo foi calculado pela diferença da ração ofertada e a sobra após 24h. Os animais foram pesados diariamente em balança semi-analítica Shimadzu® modelo BL3200H, sempre no mesmo horário. A perda de peso foi calculada pela diferença de peso no dia da indução da mucosite e antes da eutanásia.

5.2. Tamanho Intestino delgado

Imediatamente após a remoção, o intestino delgado foi medido em centímetros (cm), desde o duodeno ao íleo (80).

5.3. Determinação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi avaliada no 13º dia de acordo com método proposto por BARROS e TRINDADE e colaboradores(56,155). Foi utilizada solução composta por ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) marcado com elemento radioativo 99m-Tecnécio (^{99m}Tc) contendo 18,5MBq (megabecquerel) de atividade. A solução foi preparada com reagente liofilizado contendo 10 mg de DTPA e 0,5 mg do agente redutor cloreto estano (SnCl₂); salina e o radiofármaco. O radiofármaco pertecnetato de sódio foi obtido do gerador de Molibdênio-99/Tecnécio-99m fornecido pelo Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares de São Paulo. Os reagentes foram misturados e a solução mantida em temperatura ambiente por 15 minutos

Todos os animais receberam gavagem contendo 0,1mL de solução de ^{99m}Tc -DTPA. Após 4 horas da administração, os animais foram anestesiados com solução de xilazina (15 mg/Kg de peso vivo) e cloridrato de cetamina (80mg/kg de peso vivo) IP e o sangue foi coletado por punção axilar da veia cava superior e pesado em balança analítica. A correção de decaimento da radioatividade do ^{99m}Tc foi medida por meio de padrões, em alíquotas de 0,1 mL de ^{99m}Tc - DTPA da mesma marcação administrada aos camundongos

A radioatividade do sangue e dos padrões foi medida em contador de radiação gama *Perkin Elmer Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter (Perkin Elmer Inc., Waltham, EUA)*, (56). Os dados foram comparados com o padrão da dose e expressos em dose %, utilizando a seguinte equação(65):

$$\% \text{ dose no sangue} = \frac{[(\text{cpm/g do sangue} \times 100) / \text{cpm da dose administrada}]}$$

* cpm = contagem por minuto

5.4. Análises histopatológicas

Após a eutanásia, foi retirado 10cm do segmento do intestino delgado distal correspondente ao íleo. O segmento foi aberto longitudinalmente em contato com uma tira de papel de filtro pela borda anti-mesenterica, com a porção distal voltada para baixo. Foi retirado do tecido o conteúdo luminal e líquido e em seguida lavado com PBS (tampão fosfato salina) e formol tamponado 4%. Em seguida o íleo foi enrolado, armazenado em cassete mergulhado em formol tamponado para fixação. Após 24h o material foi banhado com álcool 70% e parafinizados(156).

Cortes de 4 μm do íleo 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. As lâminas foram coradas 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(156).

As lamínulas foram fotografadas em microscópio *Olympus BX51* acoplado à câmera digital por meio do programa SPOT Advanced e foram revisadas por patologista, Prof. Dr. Geovanni Cassali Dantas (Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas/UFMG), e lesões da mucosa e muscular foram avaliadas de acordo com método proposto por SOARES(157) (Tabela 2).

ESCORES	ACHADOS MICROSCÓPICOS
0	Achados histológicos normais.
1	Mucosa: vilos encurtados, perda da arquitetura das criptas, infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. Muscular: normal.
2	Mucosa: vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. Muscular: Normal.
3	Mucosa: vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema. Muscular: edema, vacuolização e infiltrado neutrófilos.

Tabela 2 - Parâmetros avaliados para determinação dos escores histopatológicos na porção do íleo Fonte: Soares et al., 2008, p.92.

5.5. Análises morfométricas

As lâminas com os segmentos do íleo foram fotografadas em aumento de 10x e as altura das vilosidades e profundidade das criptas foram medidas em micrômetros utilizando programa *ImageJ* versão 1.47f, Wayne Rasband/National Institutes of Health, USA - disponível *on line* no site <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>(158).

5.6. Análise da expressão gênica por *Real Time* PCR das proteínas das *tight junctions* – *ZO-1* e *Ocludina*

A análise foi feita conforme método descrito por y Freire et al. (2016)(159). O RNA total foi extraído das amostras de íleo (50mg) adicionando 500µL do reagente TRIzol® (Invitrogen/Life Technologies, Grand Island, NY, USA), seguida de 200µL de clorofórmio. Os tubos foram então agitados vigorosamente por 30 segundos, incubados a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugados a 13.000rpm, 4°C (15 minutos). A fase superior foi transferida para outro tubo contendo 250µL de isopropanol e misturadas por inversão durante um minuto. Os tubos foram então incubados por 90 minutos a -80°C, para precipitação do RNA. As amostras foram, então, centrifugadas a 13.000rpm, a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet formado lavado com 500µL de etanol 75%. Após centrifugação por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado. O pellet foi seco em temperatura ambiente por cerca de 20 minutos. Depois de seco, o pellet foi ressuspensão em água e incubado em banho-maria a 55°C por 10 minutos. Espectrofotômetro foi utilizado para determinação da concentração (ng/µL) e da pureza do RNA (por meio da razão 260/280) (Spectrophotometer ND-1000).

Para a síntese do cDNA, utilizou-se 1 µg do RNA total diluído em 5µL de água livre de RNase e DNase. Adicionou-se 0,5µL de Oligo(dT) primer (50 µM) e 1,25µL de água. Após homogeneização com a pipeta, os tubos foram colocados em termociclador a 72°C por 5 minutos (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems). Em seguida, 3,25µL do mix contendo 0,5µL de M-MLV RT (200 U), 2µL de tampão M-MLV 5x, 0,5µL de dNTP Mix (10 mM), 0,1µL de RNAsin (40.000 U/mL) e 0,25µL de água foram adicionados. Os tubos foram novamente colocados no termociclador a 42°C por três horas e, em seguida, 72°C por 15 minutos.

O cDNA sintetizado foi amplificado pela técnica de Real Time PCR, utilizando primers específicos. As amostras foram diluídas em água livre de RNase (1:10) e 2,5µL foram adicionados à 7,5µL do mix em placa de 96 poços específica para a técnica. O mix foi composto de 0,75µL de primer forward, 0,75µL de primer reverse, 1µL de água e 5µL de iTaq Universal SYBR® Green Supermix (BIO-RAD #1725121). A análise foi feita em máquina específica (ABiPrism – 7900HT SequenceDetection System) e analisados o programa SDS 2.4. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e a quantidade de mRNA normalizada pelo GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Os valores foram expressos em quantidade de gene amplificado em comparação ao grupo controle ($2^{-\Delta\Delta CT}$). *Primers* utilizados:

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

5.7. Determinação muco

Cortes do íleo foram corados pela técnica combinada de Alcian Blue e Ácido Periódico Combinado de Schiff (PAS/AB) com adaptações da técnica descrita por MCMANUS; MOWRY, 1960(160). As células produtoras de mucopolissacarídeos neutros ficam coradas na cor rósea. Em seguida foram fotografados 4 campos aleatórios de cada animal em microscópio com aumento de 40x e essas imagens foram usadas para mensurar a quantidade de pixels referente à coloração da marcação PAS com auxílio do plugin colour deconvolution do software ImageJ®. Os resultados foram expressos em média dos valores de pixels (161,162).

5.8. Infiltrado inflamatório

A avaliação do infiltrado celular intestinal foi realizada conforme método descrito por Leonel et al(163) a partir da medida da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO). Foi retirado 1cm do íleo para a análise de MPO e 1 cm para a análise de EPO. As amostras foram armazenadas em freezer - 80°C, até o momento da análise.

Para a atividade de MPO, as amostras foram homogeneizadas em Buffer 1 gelado (proporção: 1,9mL/100mg de tecido) e centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e em seguida foram adicionadas solução de NaCl 0,2%, e solução de NaCl 1,6% com glicose 5% (proporção: 1,5mL/100mg de tecido). As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi removido, e ao remanescente foi adicionado Buffer 2, em temperatura ambiente (proporção: 1,9mL/100mg de tecido).

As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas em água à temperatura ambiente, alternadamente, por três vezes e, em seguida, centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. Uma alíquota de 25µL foi adicionada à placa de 96 poços com 25µL do substrato 3'3', 5'5' - tetrametilbenzidina(SigmaAldrich®), previamente diluídos em dimetil sulfóxido (DMSO) e incubadas à 37°C, por cinco minutos. Em seguida, foram adicionados 100µL de peróxido de hidrogênio 0,002% a cada poço e realizada nova incubação (37°C, por cinco minutos). Por fim, foram adicionados 100µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 4M para interromper a reação e a absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 450nm.

Para a atividade de EPO as amostras foram homogeneizadas em PBS e centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi homogeneizado com solução de NaCl 1,6% acrescida de glicose 5% e centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado remanescente foi novamente suspenso com *hexadecyltrimethylammonium bromide* (HETAB) 0,5% diluído em PBS. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e congeladas em nitrogênio líquido, e descongeladas em água à temperatura ambiente, alternadamente, por três vezes. Após essa etapa, foi feita nova centrifugação (10.000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos) e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático. Para tal, foram transferidas 75µL das amostras para a placa de 96 poços e adicionados 75µL do cromógeno o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) (SigmaAldrich®) diluídos em tampão Tris-HCl (Sigma-Aldrich®) a 0,075 mM, em pH 8,0, acrescidos de H₂O₂ a 6,6 mM. Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos ao abrigo da luz. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 50µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1M e a absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 492 nm.

Os resultados de MPO e EPO foram expressos em unidades arbitrárias. A concentração de proteína foi mensurada de acordo com Lowry et al. (1951)(164).

5.9. Estresse oxidativo

A análise foi feita conforme método descrito por Leonel et al(163). Para avaliação do estresse oxidativo, foram retirados aproximadamente 50 mg do íleo e homogeneizados com 1mL de PBS 1x gelado e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado para as análises de superóxido dismutase, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e concentração de hidroperóxidos.

5.9.1. Atividade de superóxido dismutase

A dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD) é baseada na sua habilidade em reagir com o ânion superóxido (O_2^-) e reduzi-lo a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água.

As amostras de íleo foram homogeneizadas em tampão fosfato e acrescentar pirogalol e o agente oxidante MTT (brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium). A reação pode ser determinada espectrofotometricamente por absorbância a 570 nm. Para o cálculo do resultado foi considerado que 1 unidade (U) de SOD é capaz de evitar a auto-oxidação de 50% de pirogalol do padrão.

5.9.2. Avaliação da peroxidação lipídica por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A análise da medida dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico contemplou a adição de 500 μ L de solução contendo ácido tricloroacético (TCA 15%), ácido tiobarbitúrico (TBA 0,0375%) e ácido clorídrico (HCl 0,25 N) aos sobrenadantes dos fragmentos de íleo (250 μ L). As amostras foram mantidas em banho-maria fervente por 15 minutos, colocadas em água corrente até esfriarem e em seguida adicionados 750 μ L de álcool butílico. Para finalizar as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente e adicionados à placa de 96 poços 200 μ L do sobrenadante, em duplicata. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 535nm(164).

5.9.3. Avaliação da concentração de hidroperóxidos

Para as dosagens de hidroperóxidos foram acrescentados 180 μ L do reagente FOX-2 aos sobrenadantes de íleo (20 μ L), diretamente na microplaca, em duplicata. Para o branco foi utilizado água deionizada no lugar do sobrenadante. Em seguida

as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 560nm.

Na segunda etapa da técnica, foi realizada a redução dos hidroperóxidos com 15µL de solução de trifenilfostina (TPP) em metanol (TPP a 10mM). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este tempo, foram acrescentados às amostras 180µL do reagente FOX-2 e mantidas novamente à temperatura ambiente por mais 30 minutos. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 560nm.

A concentração de hidroperóxidos foi estimada pelo coeficiente de extinção de hidroperóxidos, $4,3 \times 10^4 M^{-1}$, e pelo coeficiente de extinção do cromóforo azularroxado produzido pelo xilenol orange, ao se ligar aos íons férricos, $1,5 \times 10^4 M^{-1}$. A quantificação dos hidroperóxidos da amostra foi alcançada pela subtração das dosagens com TPP daquelas sem TPP (sem TPP - com TPP = quantidade de hidroperóxidos da amostra), e o resultado foi normalizado pela concentração de proteína de cada fragmento (LOWRY et al., 1951).

5.10. Análise AGCC

As fezes dos animais foram coletadas do ceco para dosagem de AGCC e, em seguida, armazenadas em freezer -80°C até o momento da análise.

Foram pesadas amostras de 100mg de fezes de cada animal, posteriormente foram maceradas em 1,2 mL de água tipo 1 acidificada (pH 2,5) e centrifugadas por 10 minutos a 14.000rpm. Em seguida o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro 0,22 µm com auxílio de uma seringa de 1mL

A dosagem dos AGCC, acetato, propionato e butirato e lactato, foi feita a partir desse extrato aquoso de fezes por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A coluna utilizada foi SUPELCOGEL#C-610H (59320-U), que utiliza como método cromatográfico a exclusão iônica. A quantificação e identificação foi realizada a partir de curva padrão de AGCC com 6 pontos de calibração de cada: 25000 µM, 12500 µM, 5000 µM, 1000 µM, 125 µM e 5 µM.

A corrida foi feita utilizando como fase móvel ácido sulfúrico H_2SO_4 0,01N. O aparelho coletou 80 μ L da amostra em um fluxo 0,6 mL/min. Durante a análise as amostras foram mantidas em 40°C e pressão: 23 kgf/cm².

5.11. Análises estatísticas

Os dados foram avaliados pelo teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*. A diferença estatística dos resultados paramétricos foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA/ *One way*), com pós-teste de *Newman Keuls*, para os dados, considerados paramétricos de acordo com o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Para os dados considerados como não paramétricos foi utilizado o teste *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*. Nos parâmetros Hidroperóxidos e TBARS foi utilizado também o Teste T não pareado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico *GraphPadPrism* versão 5.00 para *Windows* (*GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA*).

6. RESULTADOS

6.1. Variação ponderal e consumo alimentar

O peso dos animais foi acompanhado durante todo o experimento. Os animais de todos os grupos apresentaram ganho de peso similar até a indução da mucosite ($p>0,05$) (dados não mostrados). No 13º dia, após 72h da indução, foi observado redução significativa do peso e do consumo alimentar dos animais dos grupos MUC, MUC 10, MUC 100 e MUC 200 em comparação aos grupos controles (Figura 6A e 6B) ($p<0,05$). O tratamento com lactato independentemente da concentração, não foi capaz de influenciar a perda de peso ou o consumo alimentar ($p>0,05$).

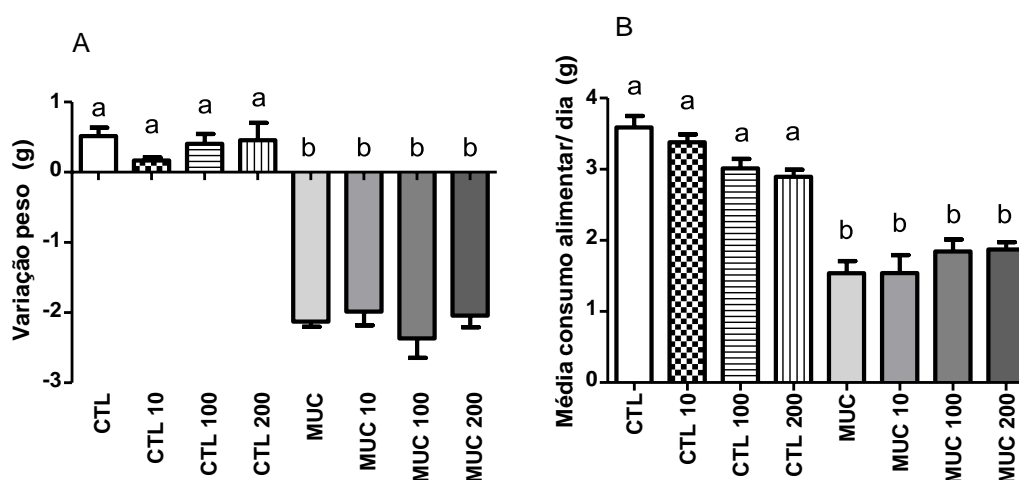


Figura 6 - Variação ponderal dos animais após a indução da mucosite (A) Média do consumo alimentar dos animais nos três dias após a indução da mucosite (B)

A variação do peso foi calculada subtraindo o peso final do peso antes da indução da mucosite. O consumo foi calculado subtraindo as sobras com a quantidade de ração colocada no dia anterior. Dados expressos em média \pm SEM ($n=6$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p<0,05$; ANOVA One-Way e pós-teste Neuman-Keuls para múltiplas comparações). CTL= Controle; CTL 10= Controle + Lactato 10mM; CTL 100= Controle + Lactato 100mM; CTL 200= Controle + Lactato 200mM; MUC= Mucosite; MUC 10 = Mucosite + Lactato 10mM; MUC 100= Mucosite + Lactato 100mM e MUC 200= Mucosite + Lactato 200mM

6.2. Tamanho do Intestino

O tamanho do intestino delgado apresentou redução significativa no grupo MUC em relação ao grupo CTL ($p<0,05$). O tratamento com lactato foi capaz de prevenir essa redução nos grupos MUC 100 e MUC 200, apresentando resultado semelhante ao grupo CTL ($p<0,05$). (Figura 13).

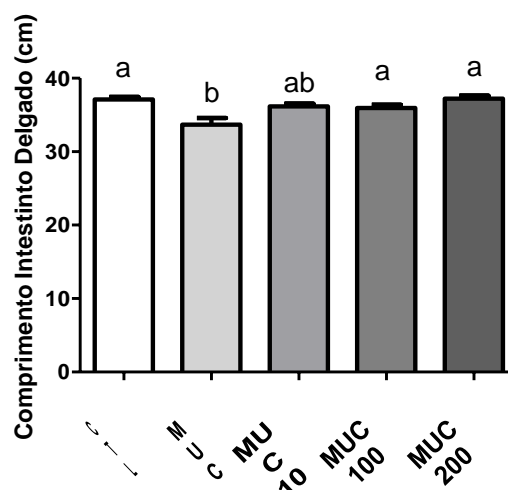


Figura 7. Comprimento do intestino delgado 72 horas após a indução da mucosite.

Dados expressos em média \pm SEM (n=6). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$; one-way ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC 10 = Mucosite + Lactato 1mM; MUC 100= Mucosite + Lactato 100mM e MUC 200= Mucosite + Lactato 200mM

6.3. Permeabilidade Intestinal

A PI foi avaliada, no 13^o. dia, por meio da contagem de radioatividade no sangue. A ação do quimioterápico levou ao aumento da permeabilidade intestinal no grupo mucosite quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). A suplementação com lactato, independente da concentração utilizada, não foi capaz de prevenir esse aumento ($p > 0,05$) (Figura 7).

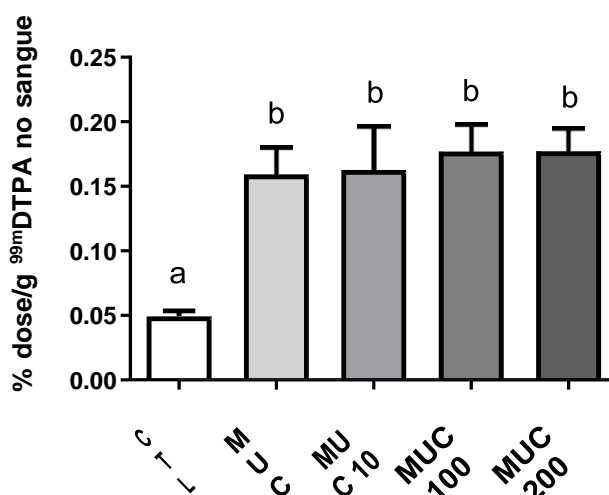


Figura 8. Permeabilidade intestinal 72 horas após a indução da mucosite.

Valores representam % de dose de ^{99m}Tc-DTPA por grama de sangue. Dados expressos em média \pm SEM (n=6). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$; ANOVA One-Way e pós-teste Neuman-Keuls para múltiplas comparações). CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC 10 = Mucosite + Lactato 1mM; MUC 100= Mucosite + Lactato 100mM e MUC 200= Mucosite + Lactato 200mM

6.4. Análises Histológicas

As figuras 9 e 10 mostram as imagens histológicas do íleo, 72 horas após a indução da mucosite. Os grupos controles suplementados com as diferentes concentrações de lactato foram incluídos para avaliação dos seus efeitos em camundongos sem a indução da mucosite. Observa-se que não houve alteração nos aspectos morfológicos dos animais dos grupos controles suplementados com lactato (CTL10, CTL 100 e CTL 200) comparado ao grupo CTL (Figuras 9) ($p > 0,05$). Já, os animais do grupo MUC apresentaram epitélio intestinal com encurtamento das vilosidades, infiltração de células inflamatórias na lâmina própria, células achatadas e vacuoladas e perda da arquitetura tecidual quando comparado com o grupo CTL (Figura 10B). Lesões teciduais mais significativas foram encontradas nos animais do grupo MUC 10 quando comparado aos demais grupos, com presença de necrose de criptas e intenso infiltrado de células inflamatórias (Figura 10C). A mucosa intestinal dos camundongos com mucosite suplementados com lactato nas concentrações de 100mM e 200mM apresentou melhora parcial da integridade do epitélio e

redução do infiltrado inflamatório em comparação aos animais do grupo MUC e MUC10 ($p < 0,05$) (Figura 10 D e E).

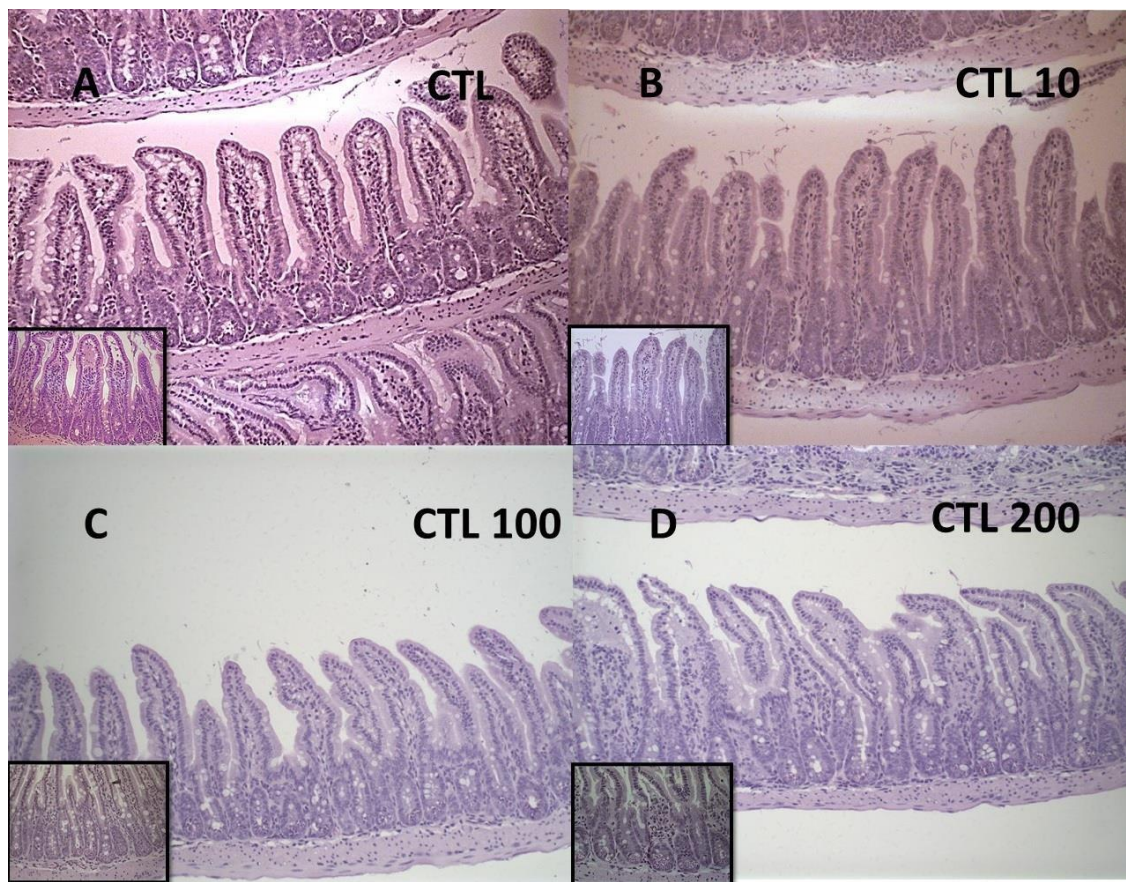


Figura 9. Análise histológica do íleo dos animais controle.

Cortes histológicos com coloração HE em aumento 20x e 40x Aspectos normais para os grupos CTL (A), CTL10 (B), CTL 100 (C) e CTL 200 (D). CTL= Controle; CTL 10= Controle + Lactato 10mM; CTL 100= Controle + Lactato 100mM; CTL 200= Controle + Lactato 200mM

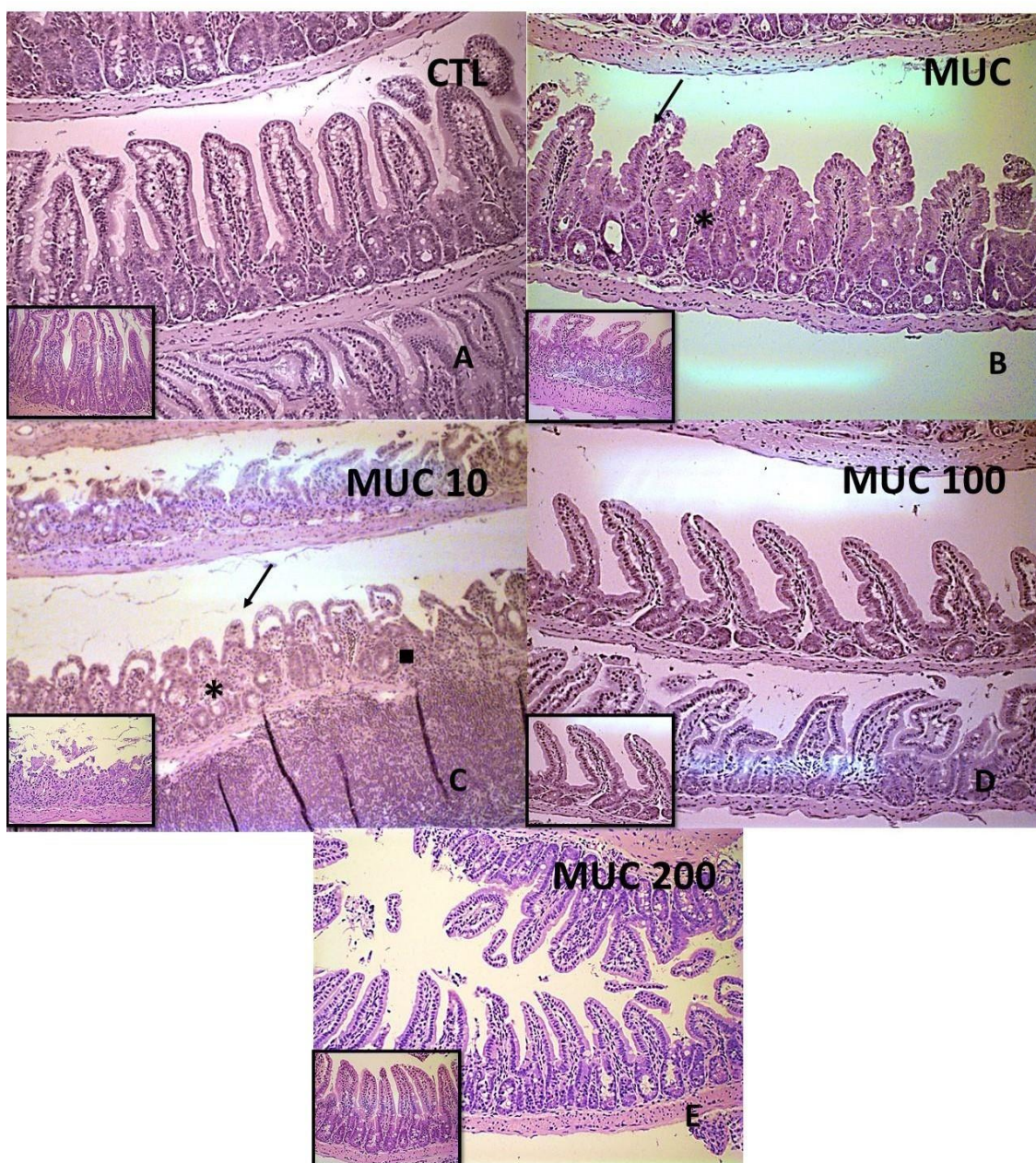


Figura 10. Análise histológica do íleo 72 horas após a indução da mucosite

Cortes histológicos com coloração HE em aumento 20x e 40x. Vilosidades encurtadas (setas), infiltração de células inflamatórias (asteriscos) estão presentes no grupo MUC (10B) e MUC 10 (10C). MUC 10 também apresenta necrose de criptas (quadrado). Preservação parcial pela melhora na integridade do epitélio e redução do infiltrado inflamatório é observada no grupo MUC 100 e MUC 200 (D e E). CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC 10 = Mucosite + Lactato 1mM; MUC 100= Mucosite + Lactato 100mM e MUC 200= Mucosite + Lactato 200mM

A figura 11 mostra a análise por meio do escore de acordo com o sistema de escores citado por SOARES *et al.*, 2008(157) (Tabela 2). Os grupos CTL,

CTL 10, CTL 100 e CTL 200 apresentaram escore histológico 0, representativo de achados morfológicos normais. O grupo MUC apresentou maior escore comparado aos grupos controles, ficando entre 1 e 2, o que indica vilos encurtados, perda da arquitetura das criptas, infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema ($p < 0,05$). O Grupo MUC 100, apresentou escore 1, porém sem diferença estatística em relação ao grupo MUC ($p > 0,05$). O maior score encontrado foi do grupo MUC 10, com presença de necrose nas criptas e danos na camada muscular ($p < 0,05$). A suplementação com lactato reduziu o escore dos animais do grupo MUC 200, o que sugere que o lactato, na concentração de 200 mM, foi capaz de prevenir parcialmente os danos causados pelo quimioterápico ($p < 0,05$) (Figura 11).

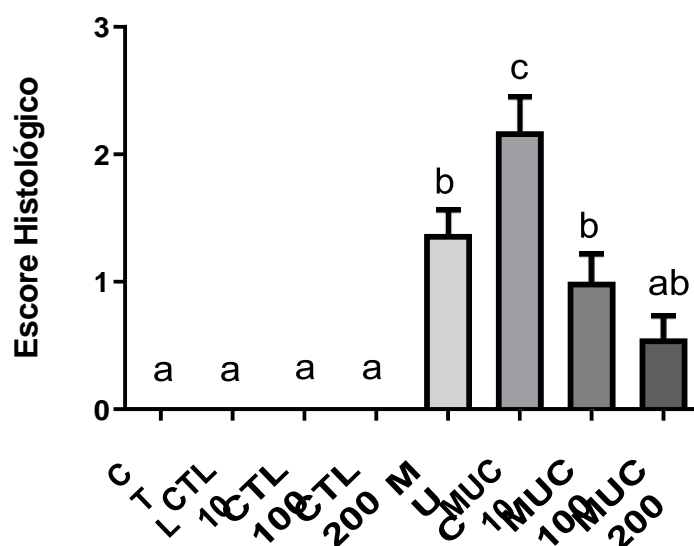


Figura 11. Escore histológico do íleo 72 horas após a indução da mucosite.

O escore foi calculado baseado nas pontuações atribuídas de acordo com os achados histológicos. Dados expressos em média \pm SEM ($n=6$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$; one-way ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= Controle; CTL 10= Controle + Lactato 10mM; CTL 100= Controle + Lactato 100mM; CTL 200= Controle + Lactato 200mM; MUC= Mucosite; MUC 10 = Mucosite + Lactato 10mM; MUC 100= Mucosite + Lactato 100mM e MUC 200= Mucosite + Lactato 200mM

Os dados da análise morfométrica nos permite confirmar esses achados, pois é possível observar encurtamento de vilosidades (Figura 12A) e redução na profundidade das criptas (Figura 12B) três dias após a administração do 5-FU nos grupos MUC, MUC 10 e MUC 100 em relação aos grupos controle e

controle + lactato ($p < 0,05$). Apenas a solução de lactato na concentração de 200mM foi capaz de promover recuperação desses parâmetros (MUC 200), apresentando resultados semelhantes ao grupo CTL. ($p < 0,05$). (FIGURA 12A e 12B).

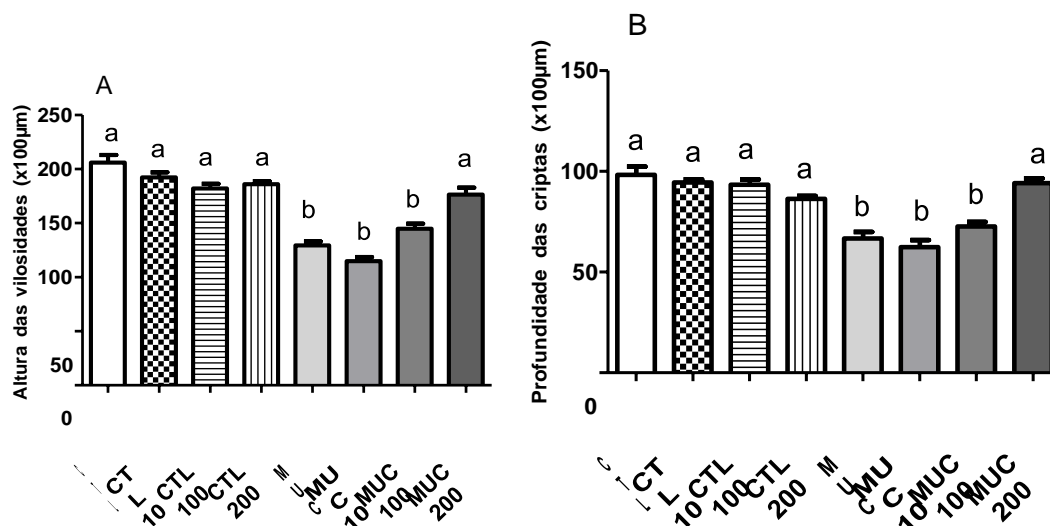


Figura 12. Análise morfométrica. do íleo 72 horas após a indução da mucosite

Altura das vilosidades (A), Profundidade das criptas (B) e Razão Vilosidades/ Criptas (C). Dados expressos em média referente a oito medidas por animal \pm SEM (n=6). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$;) Teste de variância Kruskal-Wallis, pós-teste Dunns. CTL= Controle; CTL 10= Controle + Lactato 10mM; CTL 100= Controle + Lactato 100mM; CTL 200= Controle + Lactato 200mM ;MUC= Mucosite; MUC 10 = Mucosite + Lactato 1mM; MUC 100= Mucosite + Lactato 100mM e MUC 200= Mucosite + Lactato 200mM

6.5. Expressão gênica por *Real Time* PCR das proteínas *tight junctions* – ZO-1 e Ocludina

Observou-se que o quimioterápico gerou aumento da expressão do mRNA de ZO-1 nos grupos MUC e MUC 10 em comparação ao grupo CTL ($p < 0,05$). As soluções de lactato de 100mM e de 200mM foram capazes de reverter parcialmente esse aumento ($p < 0,05$) (Figura 8A). Já, para a expressão de mRNA da Ocludina não foi observada diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 8B).

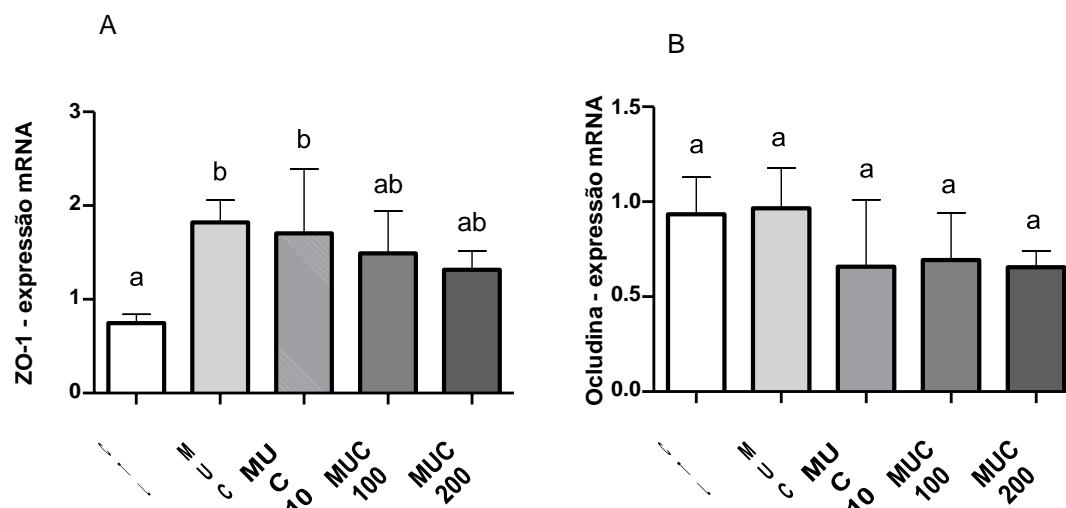


Figura 13. Expressão gênica por Real Time PCR das proteínas *tight junctions* – ZO-1 e Occludina - 72 horas após a indução da mucosite.

Valores representam a média de expressão do mRNA de ZO-1 (A) e Occludina (B) \pm SEM (n=6). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$; one-way ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC 10 = Mucosite + Lactato 1mM; MUC 100= Mucosite + Lactato 100mM e MUC 200= Mucosite + Lactato 200mM

6.6. Muco

A produção de muco foi avaliada 72h após a indução da mucosite. Observa-se que o quimioterápico reduziu a produção de muco no intestino uma vez que o grupo MUC apresentou menor quantidade de *pixels* da coloração PAS quando comparado ao grupo CTL ($p > 0,05$). Os animais do grupo controle suplementados com lactato não apresentaram alteração na concentração de muco no intestino ($p > 0,005$) (Figura 17A). O tratamento com lactato na concentração de 10mM (MUC 10) apresentou resultados semelhantes ao do grupo MUC ($p > 0,05$). Apenas suplementação com lactato 200mM (MUC 200) levou ao aumento da produção de muco, semelhante ao observado para o grupo CTL ($p > 0,05$) (Figura 17B).

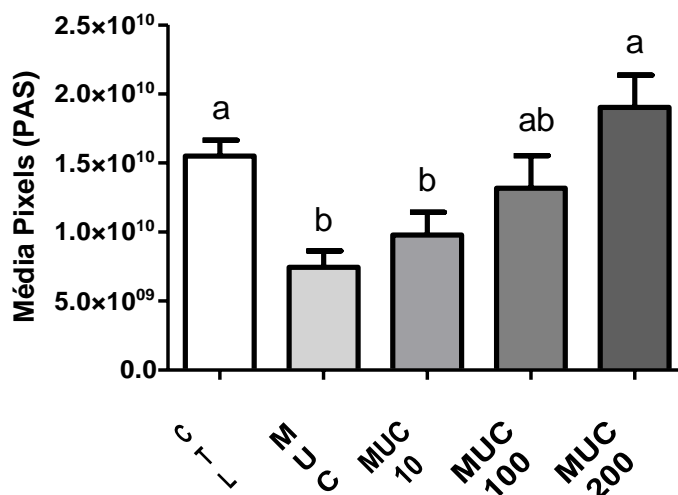


Figura 14. Análise da secreção de muco 72 horas após a indução da mucosite.

A quantidade de muco foi determinada pela quantidade de pixels referente à coloração da marcação PAS com auxílio do plugin colour deconvolution do software ImageJ®. expressos em média \pm SEM (n=6). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$; one-way ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= Controle; CTL 10= Controle + Lactato 10mM; CTL 100= Controle + Lactato 100mM; CTL 200= Controle + Lactato 200mM ;MUC= Mucosite; MUC 10 = Mucosite + Lactato 1mM; MUC 100= Mucosite + Lactato 100mM e MUC 200= Mucosite + Lactato 200mM

6.7. MPO e EPO

As enzimas MPO e EPO foram avaliadas no íleo para determinação indireta do infiltrado de neutrófilos e eosinófilos, respectivamente. Observou-se aumento significativo da enzima MPO e EPO nos grupos MUC e MUC 10 em relação ao grupo CTL ($p < 0,05$). Nos grupos MUC 100 e MUC 200 houve redução significativa da enzima MPO no íleo, quando comparados ao grupo MUC ($p < 0,05$) (Figura 14A). O mesmo padrão foi também observado para EPO (Figura 14B).

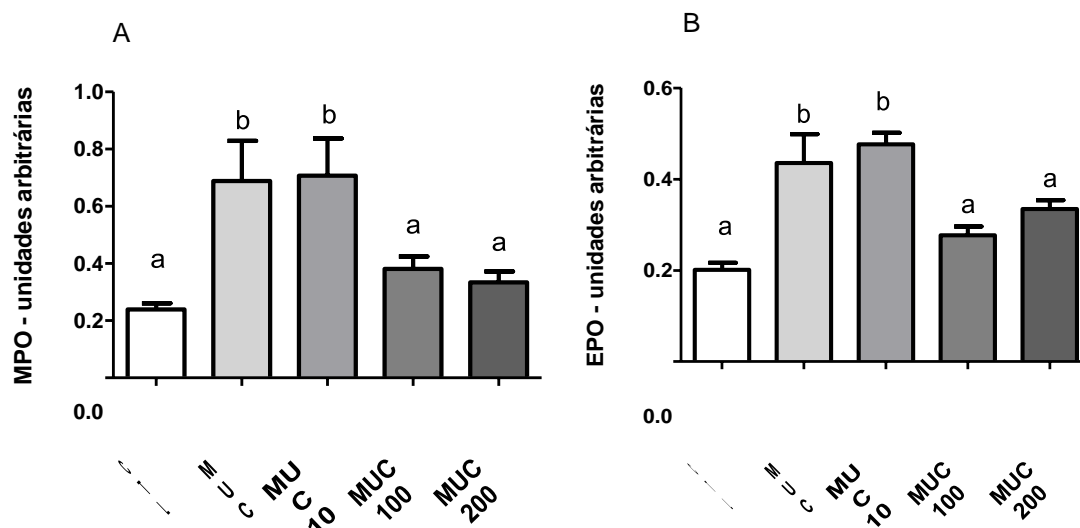


Figura 15 –Avaliação da concentração da enzima MPO e EPO no íleo dos animais 72h após a indução da mucosite.

Dados representam a concentração em unidades arbitrárias das enzimas MPO e EPO. Dados expressos em média \pm SEM (n=6). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$; one-way ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC 10 = Mucosite + Lactato 1mM; MUC 100= Mucosite + Lactato 100mM e MUC 200= Mucosite + Lactato 200mM

6.8. Estresse oxidativo

Foi observado aumento na formação de hidroperóxidos entre o grupo MUC e o grupo CTL ($p < 0,05$). Entretanto, a suplementação com lactato, independente da concentração, não foi capaz de influenciar esse aumento ($p > 0,05$) (Figura 15A). Já, na análise da peroxidação lipídica no íleo (técnica de TBARS), não se observou diferença estatística, pelo teste ANOVA, entre em grupos ($p > 0,05$). Porém ao fazer a comparação utilizando teste T, foi possível identificar diferença apenas entre os grupos CTL e MUC ($p < 0,05$) (Figura 15B). Em relação a atividade da enzima SOD no íleo, verificou-se aumento parcial da atividade da enzima nos animais do grupo MUC 100 e aumento significativo nos animais do grupo MUC 200 comparado aos demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 15C).

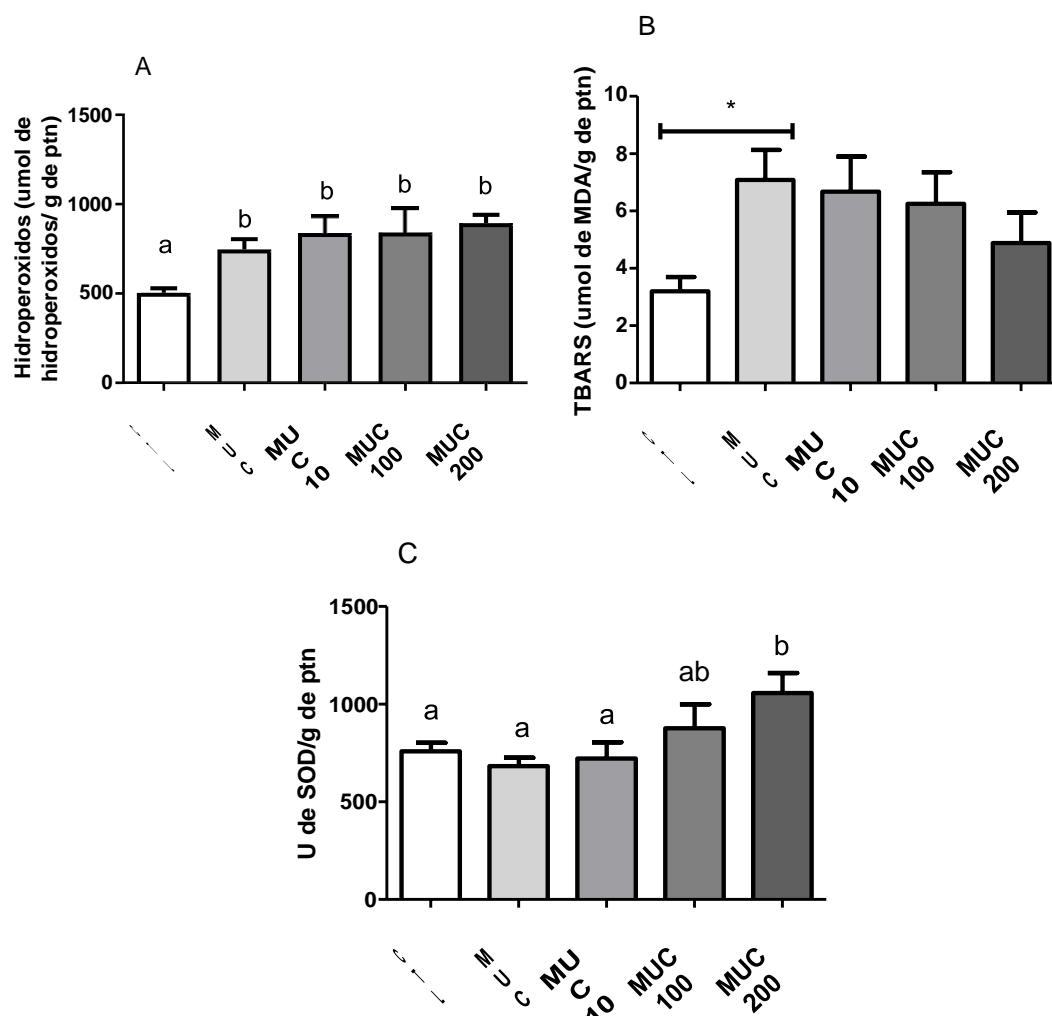


Figura 16 – Estresse oxidativo no íleo dos animais 72h após indução da mucosite.

A concentração de Hidroperóxidos, TBARS e SOD foram medidas espectrofotometricamente e o resultado foi normalizado pela concentração de proteína no íleo. O resultado foi expresso em unidades por g de proteína. Dados expressos em média \pm SEM (n=6). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$; one-way ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC 10 = Mucosite + Lactato 1mM; MUC 100= Mucosite + Lactato 100mM e MUC 200= Mucosite + Lactato 200mM

6.9. Dosagem de AGCC nas fezes

A dosagem de AGCC foi realizada nas fezes, coletadas no colón, 72h após a indução da mucosite. A ação do quimioterápico gerou redução de acetato, propionato e butirato nas fezes dos animais do grupo MUC quando comparado ao grupo CTL ($p < 0,05$). Contudo, o tratamento com lactato na concentração 100mM aumentou a concentração desses dois AGCC. Em

relação ao butirato, o quimioterápico também foi capaz de reduzir sua concentração nas fezes. Entretanto, o tratamento com lactato aumentou significativamente suas concentrações nos grupos MUC 10 e MUC 100 ($p>0,05$).

A indução da mucosite não levou a alteração das concentrações de lactato no íleo, uma vez que não houve diferença entre os grupos CTL e MUC ($p>0,05$). Apenas a suplementação de lactato na concentração de 100nM foi capaz de levar ao aumento da concentração nas fezes. (Figura 16D).

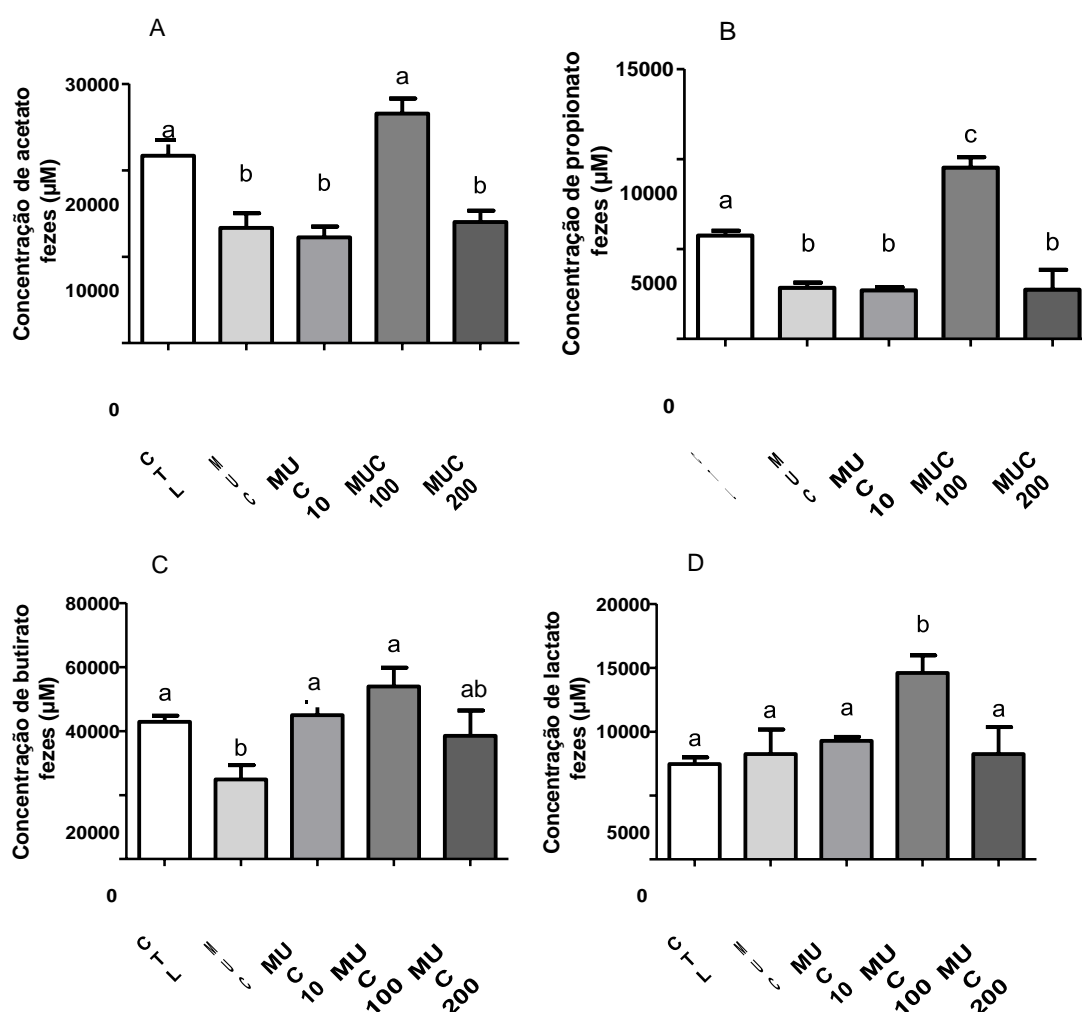


Figura 17. Dosagem de ácidos graxos de cadeia e lactato curta nas fezes dos animais 72h após indução da mucosite.

Concentração de acetato (A), propionato (B) e butirato (C), Lactato (D) nas fezes. Dados expressos em média \pm SEM ($n=6$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$; one-way ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= Controle; MUC= Mucosite; MUC 10 = Mucosite + Lactato 1mM; MUC 100= Mucosite + Lactato 100mM e MUC 200= Mucosite + Lactato 200mM

7. DISCUSSÃO

O tratamento quimioterápico consiste no uso de fármacos que culminam em apoptose das células cancerosas inibindo seu crescimento por meio de danos ao DNA ou aos processos envolvidos na divisão celular(3). Entretanto, sua ação inespecífica gera danos também à mucosa intestinal devido a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), a promoção de estresse oxidativo e o aumento da produção de citocinas inflamatórias (45). Essas cascatas de eventos resultam em efeitos colaterais como, perda de peso, náuseas, diarreia e mucosite oral e intestinal(48,119). Além disso, a quimioterapia também leva à alteração na quantidade e diversidade da microbiota entérica, denominada disbiose intestinal, o que pode agravar ainda mais o quadro da mucosite intestinal. Dessa forma, evidências têm sugerido que a administração de pré, pró e simbióticos poderia atuar na disbiose e, conseqüentemente, reduzir as complicações da mucosite intestinal(12,21,165,166).

Apesar do conceito de probiótico considerar apenas microorganismos viáveis, diversos estudos têm demonstrado efeitos benéficos de bactérias inativadas na saúde do hospedeiro(167,168). Entre as vantagens do uso desses em relação a bactérias vivas, estão a facilidade no processo de estocagem e transporte e a maior vida de prateleira(125). Além disso, apresentam vantagens em relação a segurança para o indivíduo, reduzindo a possibilidade de translocação microbiana e infecções associadas(120,125). Nos últimos anos, alguns estudos também têm demonstrado benefícios utilizando a administração dos produtos secretados pelas bactérias viáveis ou liberados depois de sua lise denominados pósbióticos. Alguns exemplos são AGCC, enzimas, peptídeos, ácidos teicóicos, proteínas de superfície celular, vitaminas, lactato e outros ácidos orgânicos (120,125).

Evidências têm demonstrado que os pósbióticos possuem efeitos antioxidantes, antiproliferativos, antipatogênicos e imunomoduladores, (169,170). Gao e colaboradores demonstraram que o pósbiótico do *Lactobacillus rhamnosus* GG possui efeito protetor na barreira intestinal

em camundongos com colite induzida por Sulfato de Dextrano de Sódio (DSS), prevenindo a perda de peso, o encurtamento intestinal, a necrose de criptas e a redução da proteína ZO-1, além de reduzir o infiltrado inflamatório(170). Já, o trabalho de IRAPORDA 2016, mostrou resultados positivos com administração intrarretal de lactato 200mM, em um modelo murino de colite induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS), na prevenção de danos histopatológicos, bem como translocação bacteriana e redução dos níveis de IL-6. (154). Entretanto, o mecanismo de ação dessas substâncias aplicado na mucosite, ainda precisa ser elucidado.

Apesar de existirem alguns estudos que demonstraram efeitos benéficos da administração de probióticos vivo e inativado em modelo de mucosite intestinal, não existe até o momento na literatura trabalho que tenha avaliado os efeitos da administração de seu principal subproduto, o lactato, em modelo semelhante(95,99). Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto da administração de lactato, nas concentrações de 10mM, 100mM e 200mM, na mucosite intestinal e nos sintomas associados.

Nossos resultados mostraram que o lactato na concentração de 200mM é capaz de reduzir a lesão intestinal causada pela administração do quimioterápico 5-FU, melhorando o escore histológico pela manutenção das vilosidades e criptas e redução do infiltrado inflamatório, além de aumentar a produção de muco e a concentração da enzima antioxidante SOD. Contudo, não foram observados efeitos benéficos na redução da perda de peso, consumo alimentar e permeabilidade intestinal. Animais tratados com lactato 100mM apresentaram melhora em alguns parâmetros, como redução do infiltrado inflamatório, além de aumento da concentração de AGCC. Interessantemente, não foi observado melhora nos parâmetros avaliados nos animais tratados com lactato (10mM). Esses, apresentaram ainda piora significativa do score histológico quando comparados ao grupo MUC.

Um dos principais sintomas da mucosite intestinal que pode comprometer o tratamento oncológico é a perda de apetite e, conseqüentemente a redução do peso, levando a piora do estado nutricional e da qualidade de vida dos pacientes (12,52). Dessa forma, mensuramos o consumo alimentar e o peso

dos animais 72h após a indução da mucosite e avaliamos se o tratamento com lactato foi capaz de influenciar esses parâmetros. Foi verificado que os animais que receberam o quimioterápico apresentaram perda de peso significativa e redução do consumo alimentar quando comparado aos animais dos grupos controles. Esses resultados corroboram com os encontrados nos estudos de GALDINO et al. (2018)(171), TRINDADE et al. (2018)(56), ANTUNES et al (2016)(172) e CHANG e tal (2018) que observaram perda de peso e redução do consumo utilizando o mesmo protocolo de indução da mucosite (26). Entretanto, o tratamento com lactato nas diferentes concentrações não foi capaz de reverter a redução de peso ou melhorar o consumo alimentar dos animais. Corroborando com nossos achados, Prisciandaro et al. demonstraram que o tratamento com o sobrenadante de *Limosilactobacillus fermentum* BR11 também não influenciou a perda de peso e o consumo alimentar dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU (173).

Essas alterações podem ser justificadas pelo processo inflamatório resultante da mucosite levando a formação de lesões teciduais que acometem o intestino, principalmente o íleo, reduzindo a absorção dos nutrientes (16). Esse processo inflamatório também gera alterações da contratilidade do músculo liso, levando a dismotilidade gastrointestinal, atraso no esvaziamento gástrico que podem contribuir para a geração de sintomas de dispepsia, levando a redução do consumo alimentar(157). Além disso, pode haver redução na absorção de nutrientes pela redução do comprimento do intestino observado na mucosite(174). Corroborando com esse mecanismo, nossos resultados mostraram redução do comprimento do intestino delgado nos animais com mucosite intestinal. Contudo, o tratamento com lactato nas concentrações de 100mM e 200mM foi capaz de reduzir o encurtamento intestinal. De Jesus et al. também observou que o tratamento com leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii Lactis* CIDCA 133 foi capaz de prevenir o encurtamento do intestino delgado nos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU(25).

O processo apoptótico e ulcerativo decorrente do uso de 5-FU também pode levar à perda da barreira intestinal e, conseqüentemente ao aumento da

PI. Dessa forma, analisamos a PI por meio do radiotraçador DTPA-99mTc, administrado por gavagem, com o objetivo de verificar sua passagem do lúmen intestinal para a corrente sanguínea(65). Assim como no trabalho de TRINDADE e colaboradores, verificamos que nos animais dos grupos MUC, o quimioterápico aumentou a PI, 72h após a indução. (56). Entretanto, a suplementação com lactato, independente da dose utilizada não foi capaz de prevenir esse aumento.

Para aprofundarmos no mecanismo de ação do lactato na barreira intestinal foram realizadas análises histológicas. O grupo MUC apresentou epitélio intestinal diferente do grupo CTL, com encurtamento das vilosidades e criptas, infiltração de células inflamatórias na lâmina própria, células achatadas e vacuoladas e perda da arquitetura tecidual. Além disso, apresentaram escore histológico entre 1 e 2, confirmando as alterações morfológicas observadas. Já, os animais do grupo MUC 10, apesar de apresentarem morfometria e PI semelhante ao grupo MUC, apresentam escore histológico próximo a 3, o que indica piora na arquitetura intestinal com presença de edema, vacuolização e infiltrado neutrófilos na camada muscular do intestino. Por outro lado, nos animais tratados com a solução de lactato 200mM foi observado melhora da morfometria e redução do escore histológico semelhante ao grupo CTL. Dados semelhantes foram observados no trabalho de IRAPORDA et al, que avaliaram os efeitos da administração intrarectal de 200mM de lactato em modelo murino de colite induzida por (TNBS) em camundongos BALBc machos(154). Os resultados mostraram prevenção de danos histopatológicos, reduzindo o escore histológico. Prisciandaro et al. também observaram redução do escore histológico e melhora no comprimento de vilosidades e criptas nos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados sobrenadante de *Escherichia coli* Nissle 19 17 (EcN) e *Limosilactobacillus fermentum* BR11(173).

O possível mecanismo de ação proposto é de que o lactato estaria atuando na regeneração tecidual por meio do recrutamento de células tronco pelo aumento da expressão do gene *Wtn3* via receptor de lactato acoplado a proteína G (*Gpr81*)(31). Okada et al. (17) mostraram que o lactato estimula a

proliferação de enterócitos em modelo murino de jejum, contribuindo dessa forma, para a manutenção da barreira intestinal. Entretanto, nossos achados diferem de estudo de Watanabe e colaboradores que trataram ratos com solução de lactato na mamadeira por três dias, em concentrações 3mM, 10mM e 15 mM e encontraram redução na lesão do intestino delgado induzida por indometacina a partir de 3mM.(33)

Para tentarmos elucidar os achados encontrados no grupo MUC 200 (aumento da PI com morfometria intestinal normal) analisamos a expressão das proteínas *tight junctions* (TJ) (zonulina-1e ocludina) no íleo dos animais. A PI é regulada tanto pelo transporte transcelular quanto transporte paracelular(175). O transporte transcelular é feito pela endocitose de moléculas pelas células epiteliais seguido de transcitose em direção à lâmina própria, podendo ou não ser mediada por receptores de membrana(176). Já o transporte paracelular é feito através de *tight junctions* (TJs) entre as células epiteliais intestinais adjacentes (IECs) (176). As TJ são compostas principalmente por proteínas, incluindo ocludina, claudinas, molécula de adesão juncional A e tricelulina e possuem duas funções: I) demarcar os domínios apical e basolateral das células, evitando que as proteínas da membrana se difundam livremente entre os dois compartimentos; II) criar uma barreira paracelular fisiológica e estrutural que regula a passagem seletiva e a troca de moléculas. A enfraquecimento da TJ é considerada uma das primeiras marcas de lesão epitelial(177).

Os animais do grupo MUC e MUC 10, que apresentaram maiores danos na histologia do epitélio, apresentaram aumento na expressão do mRNA de ZO-1, porém, esse resultado não foi observado na expressão de Ocludina. Sabe-se que a ZO-1 possui o papel de ancorar as demais proteínas que participam do complexo juncional, enquanto a ocludina é essencial para a manutenção da integridade da mucosa intestinal(178,179). Nossos resultados indicam que a gravidade da lesão nesses grupos estimulou o epitélio a tentar buscar a homeostase, pelo aumento da tradução de proteínas ZO-1 objetivando organizar a estrutura das TJ(180). Já, nos animais suplementados com lactato nas concentrações de 100 e 200 mM observou-se níveis

intermediários de expressão de mRNA de ZO-1 o que corrobora com os achados histopatológicos e a hipótese de que o lactato está agindo para atenuar a lesão tecidual nesses animais. Estudo de Ferreira e colaboradores avaliou a expressão de ZO-1 em animais com mucosite induzida por 5FU e os efeitos da administração oral de AGCC (35 mM de acetato, 15 mM de propionato e 9 mM de butirato) ou butirato 9mM por 10 dias. Os resultados mostraram aumento da expressão de ZO-1 nos animais que receberam 5FU, entretanto os camundongos 5FU + butirato apresentaram redução dessa expressão, com resultados mais próximos do controle(180).

O aumento da PI também pode ser justificado pelo aumento da produção de citocinas inflamatórias associada a administração do quimioterápico que influencia a barreira epitelial através de rearranjos do citoesqueleto e abertura das TJ, levando a perda da função de barreira (45,181). Wu demonstrou aumento das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 em ratos com mucosite induzida por 5-FU (30 mg / kg) e redução dos níveis de mRNA de ZO-1 e ocludina em comparação com os de ratos saudáveis(182). Dessa forma, consideramos que seria interessante dosar essas citocinas para melhor compreender nossos resultados de permeabilidade e TJ.

Outro componente importante da barreira intestinal é o muco. As mucinas são glicoproteínas ácidas de alto peso molecular secretadas por células caliciformes, que se hidratam no lúmen e formam uma barreira a fim de reduzir o contato de microrganismos com as células imunes e a superfície do epitélio, além de reter outras substâncias, como os peptídeos antimicrobianos e a imunoglobulina A secretora (sIgA). Contudo, observamos que o uso do 5-fluorouracil diminui a quantidade de muco produzida pelas células caliciformes no jejuno e conseqüentemente a produção de mucina. Já, a suplementação com lactato 200mM levou ao aumento significativo da produção de muco. Dados semelhantes foram encontrados por Oh et al. (2017) utilizando extrato de folha de amora fermentado com *L. acidophilus* A4(27).

Devido aos danos provocados pelo quimioterápico na barreira intestinal e objetivando a proteção contra patógenos, são recrutados mediadores imunológicos que auxiliam nas respostas às lesões intestinais(183). Eosinófilos

e neutrófilos ampliam as reações inflamatórias no local da inflamação por meio de liberação de mediadores químicos (citocinas), tais como, interleucina (IL-12, IL-4, IL-5 e IL-100 (184,185). Os eosinófilos por meio da liberação de mediadores lipídicos e grânulos proteicos tóxicos, como a proteína básica principal, proteína catiônica eosinofílica, peroxidase de eosinófilos (EPO) e neurotoxina derivada de eosinófilo, são células efetoras na disfunção e dano tissular(186). Os neutrófilos também possuem importante ação efetora através da liberação de radicais livres e da enzima MPO, causando a morte de diversos patógenos(185). Diante disto, as enzimas EPO e MPO têm sido amplamente utilizadas como marcadores bioquímicos para estudo indireto da atividade destes leucócitos em diversos tecidos(155,157).

Nossos resultados demonstraram que 72 horas após a administração do 5-FU houve aumento importante da atividade de eosinófilos e neutrófilos no íleo dos animais do grupo MUC em relação ao grupo CTL. No estado de inflamação, os eosinófilos são chamados de sentinelas imunes efetoras e atuam como células apresentadoras de antígenos, estando relacionados a manutenção da resposta inflamatória local, perda de peso, má absorção, mudanças na arquitetura da mucosa e diminuição das criptas do cólon. (186,187). Dessa forma, controlar o infiltrado dessas células é benéfico para reduzir o estado inflamatório da mucosite. A administração de lactato nas concentrações de 100 e 200mM preveniu o aumento da atividade de neutrófilos quanto eosinófilos, identificado pela dosagem das enzimas MPO e EPO. Dados semelhantes, foram encontrados no trabalho conduzido por Jesus et al que também observaram redução da concentração de MPO em animais tratados com sobrenadante de *Lactobacillus delbrueckii Lactis* CIDCA 133(25). Esses resultados são consistentes com outros trabalhos, que de maneira semelhante, observaram efeitos benéficos de sobrenadantes de probióticos na redução do infiltrado inflamatório como, o sobrenadante de *E. coli Nissle 1917* e *Limosilactobacillus fermentum BR11*(173). Contudo, a solução de 10mM não foi capaz de reduzir a concentração de EPO e MPO. Esse resultado está em acordo com o achado de maior escore histológico encontrado nas análises do grupo MUC 10. De acordo com Iraporda et al, o lactato produz efeitos imunomodulatórios, regulando negativamente as respostas pró-inflamatórias

intestinais nas células epiteliais e células mieloides mas, apenas em concentrações superiores, entre 20 e 50 mM(34).

O processo de infiltração dos leucócitos é iniciado pelo aumento da produção de EROs no local e, conseqüentemente pelo aumento do estresse oxidativo no tecido. Além disso, os neutrófilos recrutados liberam radicais ânions superóxido (O_2^-), um grupo de EROs que reage com os lipídeos celulares, levando à formação de hidroperóxidos de lipídeos, como malondialdeído (MDA). Esse processo promove grave alteração da membrana celular. Para evitar a peroxidação e os efeitos dos radicais livres, o organismo produz a enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do radical superóxido ânion (O_2^-) em peróxido de hidrogênio menos nocivo (H_2O_2) (188). Dessa forma, avaliamos esse estresse pela peroxidação lipídica, formação de hidroperóxidos e atividade das enzimas antioxidantes SOD. O TBARS, sigla do inglês *thiobarbituric acid reactive species* (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico), consiste em uma técnica que detecta produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeídos e demais aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagir com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de *Schiff*(189). Observou-se aumento de hidroperóxidos e da peroxidação lipídica (TBARS) nos animais do grupo MUC em relação ao grupo CTL. Contudo, apesar do tratamento com lactato, nas diferentes concentrações, não ter sido capaz de reduzir a peroxidação lipídica nos animais com mucosite, é possível identificar aumento na atividade da enzima antioxidante SOD no grupo MUC 200. Essa enzima tem sua expressão aumentada quando há aumento da quantidade de EROs no tecido como uma primeira linha de defesa humoral buscando reduzir os danos gerados pelo estresse oxidativo (188). Estudo avaliou a contribuição do estresse oxidativo na mucosite intestinal induzida por 5 fluorouracil (5-FU) e demonstrou que os animais com mucosite apresentaram aumento significativo na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e redução de SOD(190). Apesar de no presente momento não existir na literatura estudo avaliando os efeitos dos probióticos no estresse oxidativo da mucosite, Guerrero-Encinas e tal observaram que o probiótico do *Lactobacillus casei* CRL431 (IC-431) apresenta efeito protetor do estresse oxidativo induzido por aflatoxina B1. Foi

observado redução do índice de estresse oxidativo e da produção de H_2O_2 , além de aumento da atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase e catalase(191). Dessa forma, supõe-se que os probióticos poderiam ter efeito protetor do estresse oxidativo gerado pelo uso de quimioterápicos.

A homeostase intestinal também está relacionada à produção de AGCC, dentre eles, acetato, butirato e propionato e lactato (192). Os AGCC são produzidos por fermentação anaeróbia de resíduos alimentares não digeríveis e muco derivado de epitélio endógeno no intestino e são prontamente absorvidos e usados como fonte de energia pelos colonócitos. Por apresentarem papel importante como combustível para células epiteliais intestinais, modulam diferentes processos no TGI, como a absorção de eletrólitos e água(192). Dessa forma, avaliamos a concentração de AGCC pelo método de cromatografia gasosa nas fezes dos animais no 13º dia do experimento.

Conforme citado anteriormente nesse trabalho, em condições de homeostase o lactato e os AGCC produzidos são consumidos rapidamente pela microbiota e pelas células epiteliais, mantendo suas concentrações no intestino próximas a 7mM de lactato e acetato e, 13 mM de propionato e butirato no íleo terminal. Entretanto, em situações de desequilíbrio entre a produção bacteriana e a absorção no hospedeiro associada essas concentrações podem alterar(143). Diferente do esperado, observamos aumento das concentrações de lactato, acetato e propionato apenas nos animais do grupo MUC 100. Esse aumento pode ser explicado pela acidificação do meio e, conseqüente aumento da produção de lactato pela microbiota fecal, como demonstrado *in vitro* por Belenguer com amostras de fezes incubadas em pH 5.2(143).

Interessantemente, os animais do grupo MUC 200 apesar de suplementado com solução a 200mM, não apresentaram aumento na concentração de lactato nas fezes. Tal fato pode ser justificado por uma possível modulação na microbiota levando ao aumento da concentração de bactérias utilizadoras de lactato como a *Eubacterium halli* que utilizam o mesmo

no seu metabolismo e o convertem em acetato, propionato ou butirato, sendo esses metabólitos rapidamente utilizados como substrato tanto pelas células epiteliais quanto pela microbiota (143,193). O estudo de Engels et al(194) utilizando inóculos fecais de voluntários saudáveis observou aumento do crescimento de *E. halli* quando foram cultivadas na presença de lactato 40 mM e de lactato + glicerol(194).

Além disso, quanto maior a presença de lactato no intestino, maior o crescimento de bactérias redutoras de sulfato, aumentando a produção de sulfato de hidrogênio, afetando diretamente a sobrevivência de BAL no lúmen intestinal e, conseqüentemente reduzindo a produção de lactato pela microbiota(150). Estudo *in vitro* observou que as concentrações de lactato permaneceram baixas em comunidades de bactérias do cólon humanas, mantidas em pH 6,5, mesmo quando lactato foi infundido a 10 ou 20 mM. Já, em pH mais baixo (5,5), após infusão de lactato foi observado acúmulo do mesmo. Esses resultados podem ser explicados pela mudança na microbiota intestinal quando o lactato foi adicionado em pH mais baixo, levando ao aumento de bactérias redutoras de sulfato como Proteobacteria e de bactérias produtoras de butirato, como *Bifidobacterium adolescentis*, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*. (195). Para melhor compreender nossos resultados ideal seria fazer uma análise de microbiota para comprovar as possíveis alterações na composição geradas pela suplementação com lactato.

Os resultados encontrados, no presente trabalho, utilizando suplementação com lactato 200mM não foram tão significativos ao comparar estudos que utilizaram BAL viáveis no tratamento da mucosite intestinal(21,25,165,166). Sabe-se que o consumo de probióticos apresenta benefícios para a saúde humana por diversas vias, sendo uma delas a produção de metabólitos, como AGCC, substâncias antimicrobianas, como ácidos acéticos e lácticos, e bacteriocinas(119). Dessa forma, supõe-se que, o uso dos posbióticos traria menos benefícios no tratamento e prevenção da mucosite comparativamente com uso de probióticos. Paralelamente, diversos estudos têm demonstrado que os componentes da superfície celular dos Lactobacilos são considerados uma parte importante na sua interação com as

células hospedeiras por ativar receptores do tipo *toll* desencadeando importante alterações imunológicas no hospedeiro(196).

Concluimos que o tratamento com lactato foi capaz de prevenir parcialmente os danos causados pela mucosite de forma dose-dependente, com resultados mais significativos ao utilizar a solução 200mM. Também, observamos que o tratamento com lactato na concentração de 10 mM, apresentou piora significativa de alguns parâmetros como escore histológico quando comparado ao grupo MUC.

8. REFERÊNCIAS

1. (INCA) BM da SIN de CJAG da S. Estimativa 2020. Incidência de Câncer no Brasil [Internet]. 2020th ed. 2020. Available from: <https://www.inca.gov.br/>
2. Chemin, S; Mura J. Tratado de Alimentação, Nutrição e Dietoterapia. São Paulo: Roca; 2008. 850 p.
3. Guichard N, Guillarme D, Bonnabry P, Fleury-Souverain S. Antineoplastic drugs and their analysis: A state of the art review [Internet]. Vol. 142, Analyst. Royal Society of Chemistry; 2017 [cited 2021 Jun 3]. p. 2273–321. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/an/c7an00367f>
4. McCreath S, Delgoda R. Pharmacognosy. Academic Press; 2016. 295–313 p.
5. Cassidy S, Syed BA. Colorectal cancer drugs market [Internet]. Vol. 16, Nature Reviews Drug Discovery. Nature Publishing Group; 2017 [cited 2021 Jun 3]. p. 525–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28529321/>
6. Keefe DM, Schubert MM, Elting LS, Sonis ST, Epstein JB, Raber-Durlacher JE, et al. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis [Internet]. Vol. 109, Cancer. Cancer; 2007 [cited 2021 Jun 9]. p. 820–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17236223/>
7. Sonia Amin Thomas ZGSMKP. Adverse effects of 5-fluorouracil: Focus on rare side effects. Cancer Cell Microenviron [Internet]. 2016 [cited 2021 Jul 14];3:1266. Available from: <https://smartscitech.com/index.php/CCM/article/view/1091>
8. Sougiannis AT, VanderVeen BN, Davis JM, Fan D, Murphy EA. Understanding chemotherapy-induced intestinal mucositis and strategies to improve gut resilience. Am J Physiol Liver Physiol [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Jun 21];320(5):G712–9. Available from: <http://www.ajpgi.org>
9. Miranda MP de, Souza DS de. Glutamina na Prevenção e Tratamento da Mucosite em Pacientes Adultos Oncológicos: uma Revisão Sistemática da Literatura. Rev Bras Cancerol [Internet]. 2015 Sep 30 [cited 2021 Jun 3];61(3):277–85. Available from: <http://www.pubmed.gov>
10. Hamouda N, Sano T, Oikawa Y, Ozaki T, Shimakawa M, Matsumoto K, et al. Apoptosis, Dysbiosis and Expression of Inflammatory Cytokines are Sequential Events in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Mice. Basic Clin Pharmacol Toxicol [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2021 Jun 3];121(3):159–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28374966/>
11. Touchefeu Y, Montassier E, Nieman K, Gastinne T, Potel G, Bruley Des

- Varannes S, et al. Systematic review: The role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis - Current evidence and potential clinical applications [Internet]. Vol. 40, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. Blackwell Publishing Ltd; 2014 [cited 2021 Jun 3]. p. 409–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25040088/>
12. Bowen JM, Stringer AM, Gibson RJ, Yeoh ASJ, Hannam S, Keefe DMK. VSL#3 probiotic treatment reduces chemotherapy-induced diarrhea and weight loss. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2007 Sep [cited 2021 Jun 3];6(9):1449–54. Available from: <http://www.landesbioscience.com/journals/cbt/article/4622>
 13. Ala S, Saeedi M, Janbabai G, Ganji R, Azhdari E, Shiva A. Efficacy of Sucralfate Mouth Wash in Prevention of 5-fluorouracil Induced Oral Mucositis: A Prospective, Randomized, Double-Blind, Controlled Trial. *Nutr Cancer* [Internet]. 2016 Apr 2 [cited 2021 Jun 3];68(3):456–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27007594/>
 14. Garrote GL, Abraham AG, Rumbo M. Is lactate an undervalued functional component of fermented food products? *Front Microbiol* [Internet]. 2015 Jun 19 [cited 2021 Jun 3];6(JUN):629. Available from: www.frontiersin.org
 15. Jameela J, Abdullah D, Arshia A, Yasmeen Q, Tooba K, Sania B. A survey on gastrointestinal adverse drug reactions of Doxorubicin and Cyclophosphamide combination therapy - PubMed [Internet]. [cited 2021 Jun 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30325912/>
 16. Sonis ST. The pathobiology of mucositis [Internet]. Vol. 4, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2004 [cited 2021 Jun 3]. p. 277–84. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc1318>
 17. Sonis ST. The biologic role for nuclear factor-kappaB in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy [Internet]. Vol. 13, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. Intern. and American Associations for Dental Research; 2002 [cited 2021 Jun 3]. p. 380–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12393757/>
 18. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies [Internet]. Vol. 3, *Nature Reviews Cancer*. Nat Rev Cancer; 2003 [cited 2021 Jun 3]. p. 330–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12724731/>
 19. Li HL, Lu L, Wang XS, Qin LY, Wang P, Qiu SP, et al. Alteration of gut microbiota and inflammatory cytokine/chemokine profiles in 5-fluorouracil induced intestinal mucositis. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017 Oct 26 [cited 2021 Jun 3];7(OCT):455. Available from: www.frontiersin.org
 20. Yuan L, Zhang S, Li H, Yang F, Mushtaq N, Ullah S, et al. The influence of gut microbiota dysbiosis to the efficacy of 5-Fluorouracil treatment on colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2018 Dec 1;108:184–93.
 21. Yeung CY, Chan WT, Jiang C Bin, Cheng ML, Liu CY, Chang SW, et al.

- Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model. *PLoS One* [Internet]. 2015 Sep 25 [cited 2021 Jun 3];10(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26406888/>
22. Rad AH, Aghebati-Maleki L, Kafil HS, Abbasi A. Molecular mechanisms of postbiotics in colorectal cancer prevention and treatment [Internet]. Vol. 61, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Inc.; 2020 [cited 2021 Jun 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32410512/>
 23. Carvalho R, Vaz A, Pereira FL, Dorella F, Aguiar E, Chatel JM, et al. Gut microbiome modulation during treatment of mucositis with the dairy bacterium *Lactococcus lactis* and recombinant strain secreting human antimicrobial PAP. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021 Jun 9];8(1):1–10. Available from: www.nature.com/scientificreports
 24. Levit R, Savoy de Giori G, de Moreno de LeBlanc A, LeBlanc JG. Protective effect of the riboflavin-overproducing strain *Lactobacillus plantarum* CRL2130 on intestinal mucositis in mice. *Nutrition*. 2018 Oct 1;54:165–72.
 25. De Jesus LCL, Drumond MM, de Carvalho A, Santos SS, Martins FS, Ferreira Ê, et al. Protective effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* CIDCA 133 in a model of 5-Fluorouracil-Induced intestinal mucositis. *J Funct Foods*. 2019 Feb 1;53:197–207.
 26. Chang CW, Liu CY, Lee HC, Huang YH, Li LH, Chiau JSC, et al. *Lactobacillus casei* Variety *ramnosus* probiotic preventively attenuates 5-Fluorouracil/Oxaliplatin-induced intestinal injury in a syngeneic colorectal cancer model. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 May 15 [cited 2021 Jun 9];9(MAY). Available from: [/pmc/articles/PMC5962742/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31562742/)
 27. Oh NS, Lee JY, Lee JM, Lee KW, Kim Y. Mulberry leaf extract fermented with *Lactobacillus acidophilus* A4 ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2021 Jun 11];64(6):459–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28378512/>
 28. Pessione E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. [Internet]. Vol. 2, *Frontiers in cellular and infection microbiology*. Front Cell Infect Microbiol; 2012 [cited 2021 Jun 3]. p. 86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22919677/>
 29. Gargari G, Taverniti V, Koirala R, Gardana C, Guglielmetti S. Impact of a multistrain probiotic formulation with high bifidobacterial content on the fecal bacterial community and short-chain fatty acid levels of healthy adults. *Microorganisms* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2021 Jun 3];8(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32235660/>
 30. Iraporda C, Romanin DE, Rumbo M, Garrote GL, Abraham AG. The role of lactate on the immunomodulatory properties of the nonbacterial fraction of kefir. *Food Res Int*. 2014 Aug 1;62:247–53.

31. Lee YS, Kim TY, Kim Y, Lee SH, Kim S, Kang SW, et al. Microbiota-Derived Lactate Accelerates Intestinal Stem-Cell-Mediated Epithelial Development. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2018 Dec 12 [cited 2021 Jun 3];24(6):833-846.e6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30543778/>
32. Okada T, Fukuda S, Hase K, Nishiumi S, Izumi Y, Yoshida M, et al. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat Commun* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jun 3];4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23552069/>
33. Watanabe T, Nishio H, Tanigawa T, Yamagami H, Okazaki H, Watanabe K, et al. Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: Involvement of lactic acid. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2009 Sep [cited 2021 Jun 3];297(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19589943/>
34. Iraporda C, Errea A, Romanin DE, Cayet D, Pereyra E, Pignataro O, et al. Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2021 Jun 3];220(10):1161–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26101138/>
35. Dietl K, Renner K, Dettmer K, Timischl B, Eberhart K, Dorn C, et al. Lactic Acid and Acidification Inhibit TNF Secretion and Glycolysis of Human Monocytes. *J Immunol* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2021 Jun 3];184(3):1200–9. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/184/3/1200>
36. De Almeida VL, Leitão A, Barrett Reina LDC, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: An introduction. *Quim Nova*. 2005;28(1):118–29.
37. Bower JJ, Vance LD, Psioda M, Smith-Roe SL, Simpson DA, Ibrahim JG, et al. Patterns of cell cycle checkpoint deregulation associated with intrinsic molecular subtypes of human breast cancer cells. *npj Breast Cancer* 2017 31 [Internet]. 2017 Mar 31 [cited 2021 Jul 8];3(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41523-017-0009-7>
38. World Health Organization [WHO]. Cancer [Internet]. 2018 [cited 2021 Jun 11]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
39. Bonassa EM, Santana T. *Enfermagem em terapêutica oncológica*. São Paulo: Atheneu; 2005.
40. Otto S. *Oncologia*. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso Editores; 2002.
41. Guimarães DED, Sardinha FLDC, Mizurini DDM, Tavares Do Carmo MDG. Adipokines: A new view of adipose tissue. *Rev Nutr*. 2007;20(5):549–59.

42. FONSECA SM. Manual de quimioterapia antineoplásica. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso; 2000.
43. CRAIG CR, STITZEL RE. Farmacologia moderna com aplicações clínicas. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
44. KATZUNG BG. Farmacologia básica e clínica. 10th ed. McGrawHil ; editor. São Paulo: McGrawHil; 2007.
45. Soares PMG, Mota JM, Souza EP, Justino PFC, Franco AX, Cunha FQ, et al. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. *Cytokine*. 2013 Jan 1;61(1):46–9.
46. Gibson RJ, Keefe DMK. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: Mechanisms of damage and prevention strategies [Internet]. Vol. 14, Supportive Care in Cancer. *Support Care Cancer*; 2006 [cited 2021 Jun 3]. p. 890–900. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16604351/>
47. Lamberti M, Porto S, Marra M, Zappavigna S, Grimaldi A, Feola D, et al. 5-Fluorouracil induces apoptosis in rat cardiocytes through intracellular oxidative stress. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2012 [cited 2021 Jun 3];31(1):60. Available from: </pmc/articles/PMC3461434/>
48. Cinausero M, Aprile G, Ermacora P, Basile D, Vitale MG, Fanotto V, et al. New frontiers in the pathobiology and treatment of cancer regimen-related mucosal injury [Internet]. Vol. 8, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2017 [cited 2021 Jun 3]. Available from: </pmc/articles/PMC5462992/>
49. Stringer AM. Interaction between host cells and microbes in chemotherapy-induced mucositis [Internet]. Vol. 5, *Nutrients*. MDPI AG; 2013 [cited 2021 Jun 3]. p. 1488–99. Available from: </pmc/articles/PMC3708331/>
50. Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, Keefe D, McGuire D, Epstein J, et al. Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Treatment of Cancer Therapy-Induced Oral and Gastrointestinal Mucositis [Internet]. Vol. 100, *Cancer*. John Wiley and Sons Inc.; 2004 [cited 2021 Jun 3]. p. 2026–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15108223/>
51. Bowen JM, Gibson RJ, Keefe DMK. Animal Models of Mucositis: Implications for Therapy [Internet]. Vol. 9, *Journal of Supportive Oncology*. *J Support Oncol*; 2011 [cited 2021 Jun 3]. p. 161–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22024303/>
52. Ala S, Saeedi M, Janbabai G, Ganji R, Azhdari E, Shiva A. Efficacy of Sucralfate Mouth Wash in Prevention of 5-fluorouracil Induced Oral Mucositis: A Prospective, Randomized, Double-Blind, Controlled Trial. *Nutr Cancer* [Internet]. 2016 Apr 2 [cited 2021 Jun 3];68(3):456–63. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635581.2016.1153666>
53. Bowen J, Al-Dasooqi N, Bossi P, Wardill H, Van Seville Y, Al-Azri A, et al.

- The pathogenesis of mucositis: updated perspectives and emerging targets. *Support Care Cancer* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2021 Jun 3];27(10):4023–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31286231/>
54. van Vliet MJ, Harmsen HJM, de Bont ESJM, Tissing WJE. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis [Internet]. Vol. 6, *PLoS Pathogens*. Public Library of Science; 2010 [cited 2021 Jun 6]. p. 1–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20523891/>
 55. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology* [Internet]. 2004 [cited 2021 Jun 3];127(1):224–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15236188/>
 56. Trindade LM, Martins VD, Rodrigues NM, Souza ELS, Martins FS, Costa GMF, et al. Oral administration of Simbioflora® (synbiotic) attenuates intestinal damage in a mouse model of 5-fluorouracil-induced mucositis. *Benef Microbes* [Internet]. 2018 [cited 2021 Jun 3];9(3):477–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29633632/>
 57. Allaire JM, Crowley SM, Law HT, Chang SY, Ko HJ, Vallance BA. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity [Internet]. Vol. 39, *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd; 2018 [cited 2021 Jun 3]. p. 677–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29716793/>
 58. Gelberg HB. Comparative anatomy, physiology, and mechanisms of disease production of the esophagus, stomach, and small intestine. *Toxicol Pathol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2021 Jun 3];42(1):54–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24436039/>
 59. JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. *Histologia básica*. 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
 60. Reed KK, Wickham R. Review of the Gastrointestinal Tract: From Macro to Micro. *Semin Oncol Nurs* [Internet]. 2009 Feb [cited 2021 Jun 6];25(1):3–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19217502/>
 61. Olivares-Villagómez D, Van Kaer L. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier [Internet]. Vol. 39, *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd; 2018 [cited 2021 Jun 3]. p. 264–75. Available from: <http://www.cell.com/article/S1471490617302132/fulltext>
 62. ORIÁ RB, BRITO GADC. *Sistema Digestório: Integração Básico-Clinica*. São Paulo: Blucher; 2016.
 63. Spence JR, Lauf R, Shroyer NF. Vertebrate intestinal endoderm development [Internet]. Vol. 240, *Developmental Dynamics*. Dev Dyn; 2011 [cited 2021 Jun 3]. p. 501–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21246663/>
 64. Gleeson MH, Cullen J, Dowling RH. Intestinal structure and function after small bowel by-pass in the rat. *Clin Sci* [Internet]. 1972 [cited 2021 Jun

- 3];43(6):731–42. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4646271/>
65. Andrade MER, Araújo RS, de Barros PAV, Soares ADN, Abrantes FA, Generoso S de V, et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models [Internet]. Vol. 34, *Clinical Nutrition*. Churchill Livingstone; 2015 [cited 2021 Jun 3]. p. 1080–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25660317/>
 66. FARQUHAR MG, PALADE GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* [Internet]. 1963 [cited 2021 Jun 3];17(2):375–412. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13944428/>
 67. Giepmans BNG, van IJzendoorn SCD. Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. Vol. 1788, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier; 2009. p. 820–31.
 68. Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR. Tight junction pore and leak pathways: A dynamic duo. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2011 [cited 2021 Jun 3];73:283–309. Available from: [/pmc/articles/PMC4655434/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/214655434/)
 69. Maroux S, Coudrier E, Feracci H, Gorvel JP, Louvard D. Molecular organization of the intestinal brush border. *Biochimie* [Internet]. 1988 [cited 2021 Jun 3];70(9):1297–306. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3147722/>
 70. Mukherjee S, Vaishnava S, Hooper L V. Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense [Internet]. Vol. 65, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Cell Mol Life Sci; 2008 [cited 2021 Jun 3]. p. 3019–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18560756/>
 71. Shifrin DA, Tyska MJ. Ready...aim...fire into the lumen: A new role for enterocyte microvilli in gut host defense. *Gut Microbes* [Internet]. 2012 Sep [cited 2021 Jun 3];3(5):460. Available from: [/pmc/articles/PMC3466500/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23466500/)
 72. Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress [Internet]. Vol. 12, *Current Gastroenterology Reports*. Curr Gastroenterol Rep; 2010 [cited 2021 Jun 3]. p. 319–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20703838/>
 73. Gallo RL, Hooper L V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine [Internet]. Vol. 12, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2012 [cited 2021 Jun 3]. p. 503–16. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri3228>
 74. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nat* 2010 4697330 [Internet]. 2010 Nov 28 [cited 2021 Aug 31];469(7330):415–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature09637>
 75. Johansson MEV, Holmén Larsson JM, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer

- layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011 Mar 15 [cited 2021 Jun 3];108(SUPPL. 1):4659–65. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1006451107
76. Hansson GC, Johansson MEV. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes* [Internet]. 2010 [cited 2021 Jun 3];1(1):51–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21327117/>
 77. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease [Internet]. Vol. 474, *Nature*. Nature Publishing Group; 2011 [cited 2021 Jun 3]. p. 298–306. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature10208>
 78. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis [Internet]. Vol. 14, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2014 [cited 2021 Jun 3]. p. 141–53. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri3608>
 79. Mörbe UM, Jørgensen PB, Fenton TM, von Burg N, Riis LB, Spencer J, et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function [Internet]. Vol. 14, *Mucosal Immunology*. Springer Nature; 2021 [cited 2021 Jul 4]. p. 793–802. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00389-4>
 80. Okumura R, Takeda K. Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers [Internet]. Vol. 38, *Inflammation and Regeneration*. BioMed Central Ltd.; 2018 [cited 2021 Jun 3]. p. 1–8. Available from: <https://doi.org/10.1186/s41232-018-0063-z>
 81. Forchielli ML, Walker WA. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr* [Internet]. 2005 Apr [cited 2021 Jul 4];93(S1):S41–8. Available from: <https://doi.org/10.1079/BJN20041356>
 82. Gonçalves JL, Yachite JNU, Queiroz C de AA de, Câmara CC, Oriá RB. Bases do Sistema Imunológico Associado à Mucosa Intestinal. In: *Sistema Digestório: Integração Básico-Clinica*. Editora Edgard Blücher; 2016. p. 369–88.
 83. G S, EJ J, F C, C T, BT B. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. *Front Neurosci* [Internet]. 2014 [cited 2021 Sep 1];8(SEP):1–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25339862/>
 84. VA R, KA F. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell* [Internet]. 2016 May 5 [cited 2021 Sep 1];165(4):792–800. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27153493/>
 85. Cremon C, Barbaro MR, Ventura M, Barbara G. Pre- and probiotic overview [Internet]. Vol. 43, *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd; 2018 [cited 2021 Jun 6]. p. 87–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30219638/>

86. Sekirov I, Russell SL, Caetano M Antunes L, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease [Internet]. Vol. 90, *Physiological Reviews*. Physiol Rev; 2010 [cited 2021 Jun 3]. p. 859–904. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20664075/>
87. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism [Internet]. Vol. 489, *Nature*. Nature Publishing Group; 2012 [cited 2021 Jun 3]. p. 242–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature11552>
88. de Oliveira GLV, Leite AZ, Higuchi BS, Gonzaga MI, Mariano VS. Intestinal dysbiosis and probiotic applications in autoimmune diseases [Internet]. Vol. 152, *Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2017 [cited 2021 Jun 6]. p. 1–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28556916/>
89. Hooper L V., Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system [Internet]. Vol. 336, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2012 [cited 2021 Jun 6]. p. 1268–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22674334/>
90. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation [Internet]. Vol. 157, *Cell*. Elsevier B.V.; 2014 [cited 2021 Jun 6]. p. 121–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24056765/>
91. Fijlstra M, Ferdous M, Koning AM, Rings EHHM, Harmsen HJM, Tissing WJE. Substantial decreases in the number and diversity of microbiota during chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis in a rat model. *Support Care Cancer* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2021 Jun 3];23(6):1513–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25376667/>
92. Montassier E, Gastinne T, Vangay P, Al-Ghalith GA, Bruley Des Varannes S, Massart S, et al. Chemotherapy-driven dysbiosis in the intestinal microbiome. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2021 Jun 3];42(5):515–28. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/apt.13302>
93. Mizock BA. Probiotics [Internet]. Vol. 61, *Disease-a-Month*. Mosby Inc.; 2015 [cited 2021 Jun 3]. p. 259–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25921792/>
94. Stringer AM, Gibson RJ, Logan RM, Bowen JM, Yeoh ASJ, Hamilton J, et al. Gastrointestinal Microflora and Mucins May Play a Critical Role in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Gastrointestinal Mucositis: <https://doi.org/10.3181/0810-RM-301> [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2021 Jul 13];234(4):430–41. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/10.3181/0810-RM-301?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed
95. Chang C-W, Liu C-Y, Lee H-C, Huang Y-H, Li L-H, Chiau J-SC, et al. *Lactobacillus casei* Variety rhamnosus Probiotic Preventively Attenuates

- 5-Fluorouracil/Oxaliplatin-Induced Intestinal Injury in a Syngeneic Colorectal Cancer Model. *Front Microbiol.* 2018 May;9:983.
96. Louise Pouncey A, James Scott A, Leslie Alexander J, Marchesi J, Kinross J. Gut microbiota, chemotherapy and the host: The influence of the gut microbiota on cancer treatment. *Ecancermedicalscience* [Internet]. 2018 Sep 5 [cited 2021 Jun 3];12. Available from: [/pmc/articles/PMC6145523/](https://pmc/articles/PMC6145523/)
 97. Taur Y, Jenq RR, Perales MA, Littmann ER, Morjaria S, Ling L, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* [Internet]. 2014 Aug 14 [cited 2021 Jun 3];124(7):1174–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24939656/>
 98. Kato S, Hamouda N, Kano Y, Oikawa Y, Tanaka Y, Matsumoto K, et al. Probiotic *Bifidobacterium bifidum* G9-1 attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice via suppression of dysbiosis-related secondary inflammatory responses. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2021 Jun 17];44(10):1017–25. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1440-1681.12792>
 99. Picó-Monllor JA, Mingot-Ascencao JM. Search and selection of probiotics that improve mucositis symptoms in oncologic patients. A systematic review [Internet]. Vol. 11, *Nutrients*. MDPI AG; 2019 [cited 2021 Jun 3]. Available from: [/pmc/articles/PMC6835542/](https://pmc/articles/PMC6835542/)
 100. Smith CL, Geier MS, Yazbeck R, Torres DM, Butler RN, Howarth GS. *Lactobacillus fermentum* BR11 and fructo-oligosaccharide partially reduce jejunal inflammation in a model of intestinal mucositis in rats. *Nutr Cancer* [Internet]. 2008 Nov [cited 2021 Jun 17];60(6):757–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19005975/>
 101. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2014 Jun 10 [cited 2021 Jun 3];11(8):506–14. Available from: www.nature.com/nrgastro
 102. FAO/WHO. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics. 2001;
 103. Butel MJ. Probiotics, gut microbiota and health [Internet]. Vol. 44, *Medecine et Maladies Infectieuses*. Med Mal Infect; 2014 [cited 2021 Jun 3]. p. 1–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24290962/>
 104. Ohashi Y, Ushida K. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action [Internet]. Vol. 80, *Animal Science Journal*. Anim Sci J; 2009 [cited 2021 Jun 3]. p. 361–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20163595/>
 105. Cerdó T, García-Santos JA, Bermúdez MG, Campoy C. The role of probiotics and prebiotics in the prevention and treatment of obesity

- [Internet]. Vol. 11, *Nutrients*. MDPI AG; 2019 [cited 2021 Jun 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30875987/>
106. Mokoena MP. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review [Internet]. Vol. 22, *Molecules*. MDPI AG; 2017 [cited 2021 Jun 11]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28933759/>
 107. Gaspar C, Donders GG, Palmeira-de-Oliveira R, Queiroz JA, Tomaz C, Martinez-de-Oliveira J, et al. Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. *AMB Express* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021 Jun 11];8(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30264211/>
 108. Shi Y, Zhai Q, Li D, Mao B, Liu X, Zhao J, et al. Restoration of cefixime-induced gut microbiota changes by *Lactobacillus* cocktails and fructooligosaccharides in a mouse model. *Microbiol Res*. 2017 Jul 1;200:14–24.
 109. Blackwood BP, Yuan CY, Wood DR, Nicolas JD, Grothaus JS, Hunter CJ. Probiotic *Lactobacillus* Species Strengthen Intestinal Barrier Function and Tight Junction Integrity in Experimental Necrotizing Enterocolitis. *J Probiotics Heal* [Internet]. 2017 [cited 2021 Jun 11];05(01). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28638850/>
 110. Monteagudo-Mera A, Rastall RA, Gibson GR, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health [Internet]. Vol. 103, *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag; 2019 [cited 2021 Jun 11]. p. 6463–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31267231/>
 111. Martín R, Langella P. Emerging health concepts in the probiotics field: Streamlining the definitions [Internet]. Vol. 10, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2019 [cited 2021 Jul 2]. p. 1047. Available from: www.frontiersin.org
 112. Liu W, Pang H, Zhang H, Cai Y. Biodiversity of lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice* [Internet]. Springer Netherlands; 2014 [cited 2021 Jun 3]. p. 103–203. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-8841-0_2
 113. Mora-Villalobos JA, Montero-Zamora J, Barboza N, Rojas-Garbanzo C, Usaga J, Redondo-Solano M, et al. Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review [Internet]. Vol. 6, *Fermentation*. MDPI AG; 2020 [cited 2021 Jun 3]. p. 23. Available from: <https://www.ftb.com.hr/80-volume-44-issue-no-2/445-biotechnological-production-of-lactic-acid->
 114. Connolly E, Abrahamsson T, Björkstén B. Safety of D(-)-lactic acid producing bacteria in the human infant. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2005 Oct [cited 2021 Jun 3];41(4):489–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16205524/>

115. Kandler O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* [Internet]. 1983 May [cited 2021 Jun 3];49(3):209–24. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00399499>
116. Wells JM, Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria [Internet]. Vol. 6, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2008 [cited 2021 Jun 3]. p. 349–62. Available from: www.nature.com/reviews/micro
117. Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, et al. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2005 Jul [cited 2021 Jun 3];100(7):1539–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15984978/>
118. O'Mahony L, Mccarthy J, Kelly P, Hurley G, Luo F, Chen K, et al. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: Symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* [Internet]. 2005 [cited 2021 Jun 3];128(3):541–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15765388/>
119. Batista VL, da Silva TF, de Jesus LCL, Coelho-Rocha ND, Barroso FAL, Tavares LM, et al. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis [Internet]. Vol. 11, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020 [cited 2021 Jun 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33042054/>
120. Cuevas-González PF, Liceaga AM, Aguilar-Toalá JE. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. Vol. 136, *Food Research International*. Elsevier Ltd; 2020. p. 109502.
121. Salminen S, Collado MC, Endo A, Hill C, Lebeer S, Quigley EMM, et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics [Internet]. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Research; 2021 [cited 2021 Jun 9]. p. 1–19. Available from: <https://doi.org/10.1038/>
122. Konstantinov SR, Kuipers EJ, Peppelenbosch MP. Functional genomic analyses of the gut microbiota for crc screening. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jun 3];10(12):741–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24042452/>
123. Oberg TS, Steele JL, Ingham SC, Smeianov V V., Briczinski EP, Abdalla A, et al. Intrinsic and inducible resistance to hydrogen peroxide in *Bifidobacterium* species. *J Ind Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2011 [cited 2021 Jun 3];38(12):1947–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21626209/>
124. Tsilingiri K, Rescigno M. Postbiotics: What else? *Benef Microbes* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jun 3];4(1):101–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23271068/>
125. Aguilar-Toalá JE, Garcia-Varela R, Garcia HS, Mata-Haro V, González-

- Córdova AF, Vallejo-Cordoba B, et al. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. Vol. 75, Trends in Food Science and Technology. Elsevier Ltd; 2018. p. 105–14.
126. Petrova MI, Imholz NCE, Verhoeven TLA, Balzarini J, Van Damme EJM, Schols D, et al. Lectin-Like Molecules of *Lactobacillus rhamnosus* GG Inhibit Pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* Biofilm Formation. PLoS One [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2021 Jun 9];11(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27537843/>
 127. Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CGM. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2007 May 1 [cited 2021 Jun 9];104(18):7617–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17456596/>
 128. Tytgat HLP, Douillard FP, Reunanen J, Rasinkangas P, Hendrickx APA, Laine PK, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG Outcompetes *Enterococcus faecium* via Mucus-Binding Pili: Evidence for a Novel and Heterospecific Probiotic Mechanism. Appl Environ Microbiol. 2016;82(19):5756–62.
 129. Rashti Z, Koohsari H. Antibacterial effects of supernatant of lactic acid bacteria isolated from different Dough's in Gorgan city in north of Iran. Integr Food, Nutr Metab. 2015;2(3).
 130. Feng Y, Wang Y, Wang P, Huang Y, Wang F. Short-Chain Fatty Acids Manifest Stimulative and Protective Effects on Intestinal Barrier Function Through the Inhibition of NLRP3 Inflammasome and Autophagy. Cell Physiol Biochem [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2021 Jun 9];49(1):190–205. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30138914/>
 131. Ohata A, Usami M, Miyoshi M. Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cells via lipoxygenase activation. Nutrition [Internet]. 2005 Jul [cited 2021 Jun 9];21(7–8):838–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15975492/>
 132. Cervantes-Barragan L, Chai JN, Tianero MD, Di Luccia B, Ahern PP, Merriman J, et al. *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4+CD8 $\alpha\alpha$ + T cells. Science (80-) [Internet]. 2017 Aug 25 [cited 2021 Jun 9];357(6353):806–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28775213/>
 133. Yelin I, Flett KB, Merakou C, Mehrotra P, Stam J, Snesrud E, et al. Genomic and epidemiological evidence of bacterial transmission from probiotic capsule to blood in ICU patients. Nat Med [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2021 Jun 9];25(11):1728–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31700189/>
 134. Moradi M, Mardani K, Tajik H. Characterization and application of postbiotics of *Lactobacillus* spp. on *Listeria monocytogenes* in vitro and in food models. LWT. 2019 Aug 1;111:457–64.
 135. Wong JMW, De Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. In: Journal of Clinical

- Gastroenterology [Internet]. *J Clin Gastroenterol*; 2006 [cited 2021 Jun 3]. p. 235–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16633129/>
136. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ. The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate-Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation. *Mol Cell* [Internet]. 2012 Nov 30 [cited 2021 Jun 3];48(4):612–26. Available from: </pmc/articles/PMC3513569/>
 137. Esquivel-Elizondo S, Ilhan ZE, Garcia-Peña EI, Krajmalnik-Brown R. Insights into Butyrate Production in a Controlled Fermentation System via Gene Predictions. *mSystems*. 2017 Aug 29;2(4).
 138. Stams AJM, Dijkema C, Plugge CM, Lens P. Contribution of ¹³C-NMR spectroscopy to the elucidation of pathways of propionate formation and degradation in methanogenic environments. *Biodegradation* [Internet]. 1998 [cited 2021 Jun 25];9(6):463–73. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1008342130938>
 139. Castillo Martinez FA, Balciunas EM, Salgado JM, Domínguez González JM, Converti A, Oliveira RP de S. Lactic acid properties, applications and production: A review. Vol. 30, *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier; 2013. p. 70–83.
 140. Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2004 Oct [cited 2021 Jun 3];70(10):5810–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15466518/>
 141. Lunelli BH, Atala DIP, Oliveira N, Maciel MRW, Filho RM. Ethyl lactate production using reactive distillation: experimental and simulation. *J Biotechnol*. 2010 Nov;150:569–569.
 142. MOREIRA P, TEODORO B, MAGALHÃES NETO A. BASES NEURAIS E METABÓLICAS DA FADIGA DURANTE O EXERCÍCIO NEURAL AND METABOLIC BASES OF THE FATIGUE DURING THE EXERCISE. 2008;24(1):81–90.
 143. Belenguer A, Duncan SH, Holtrop G, Anderson SE, Lobley GE, Flint HJ. Impact of pH on lactate formation and utilization by human fecal microbial communities. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2007 Oct [cited 2021 Jun 3];73(20):6526–33. Available from: </pmc/articles/PMC2075063/>
 144. Vernia P, Caprilli R, Latella G, Barbetti F, Magliocca FM, Cittadini M. Fecal Lactate and Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* [Internet]. 1988 [cited 2021 Jul 2];95(6):1564–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3181680/>
 145. Morita N, Umemoto E, Fujita S, Hayashi A, Kikuta J, Kimura I, et al. GPR31-dependent dendrite protrusion of intestinal CX3CR1+ cells by bacterial metabolites. *Nature* [Internet]. 2019 Feb 7 [cited 2021 Jun 3];566(7742):110–4. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-019-0884-1>
 146. Hoque R, Farooq A, Ghani A, Gorelick F, Mehal WZ. Lactate reduces

- liver and pancreatic injury in toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via gpr81-mediated suppression of innate immunity. *Gastroenterology* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2021 Jun 5];146(7):1763–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.03.014>
147. Lerch MM, Conwell DL, Mayerle J. The anti-inflammasome effect of lactate and the lactate gpr81-receptor in pancreatic and liver inflammation [Internet]. Vol. 146, *Gastroenterology*. W.B. Saunders; 2014 [cited 2021 Jun 5]. p. 1602–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24780214/>
 148. Guo FF, Yu TC, Hong J, Fang JY. Emerging roles of hydrogen sulfide in inflammatory and neoplastic colonic diseases [Internet]. Vol. 7, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2016 [cited 2021 Jun 3]. p. 156. Available from: [/pmc/articles/PMC4853395/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29453395/)
 149. Kushkevych I, Kotrsová V, Dordević D, Buňková L, Vítězová M, Amedei A. Hydrogen sulfide effects on the survival of lactobacilli with emphasis on the development of inflammatory bowel diseases. *Biomolecules* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2021 Jun 3];9(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31756903/>
 150. Pham VT, Lacroix C, Braegger CP, Chassard C. Lactate-utilizing community is associated with gut microbiota dysbiosis in colicky infants. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–13.
 151. Hove H, Nordgaard-Andersen I, Mortensen PB. Faecal DL-lactate concentration in 100 gastrointestinal patients. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 1994 [cited 2021 Jun 28];29(3):255–9. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/00365529409090473>
 152. Ministério da Ciência TI e C (MCTIC). CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. 2016;
 153. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines [Internet]. Vol. 160, *British Journal of Pharmacology*. Br J Pharmacol; 2010 [cited 2021 Jun 6]. p. 1577–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20649561/>
 154. Iraporda C, Romanin DE, Bengoa AA, Errea AJ, Cayet D, Foligné B, et al. Local treatment with lactate prevents intestinal inflammation in the TNBS-induced colitis model. *Front Immunol* [Internet]. 2016 [cited 2021 Jun 15];7(DEC). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28082985/>
 155. Barros PAV de, Generoso S de V, Andrade MER, da Gama MAS, Lopes FCF, de Sales e Souza ÉL, et al. Effect of Conjugated Linoleic Acid-enriched Butter After 24 hours of Intestinal Mucositis Induction. *Nutr Cancer* [Internet]. 2017 Jan 2 [cited 2021 Jun 6];69(1):168–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27682136/>
 156. Woo PCY, Ng WF, Leung HCH, Tsoi HW, Yuen KY. Clarithromycin attenuates cyclophosphamide-induced mucositis in mice. *Pharmacol Res*

- [Internet]. 2000 [cited 2021 Jun 8];41(5):527–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10753551/>
157. Soares PMG, Mota JMSC, Gomes AS, Oliveira RB, Assreuy AMS, Brito GAC, et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2008 Dec [cited 2021 Jun 3];63(1):91–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18324404/>
 158. Pereira VBM, Melo AT, Assis-Júnior EM, Wong DVT, Brito GAC, Almeida PRC, et al. A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2021 Jun 8];77(2):323–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26666645/>
 159. Freire RH, Fernandes LR, Silva RB, Coelho BSL, De Araújo LPT, Ribeiro LS, et al. Wheat gluten intake increases weight gain and adiposity associated with reduced thermogenesis and energy expenditure in an animal model of obesity. *Int J Obes* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2021 Jul 2];40(3):479–86. Available from: www.nature.com/ijo
 160. MCMANUS, J. F.; MOWRY RW. Staining methods Histologic and histochemical. Nova York: Hoeber; 1960.
 161. Ferreira T, Rasband W. ImageJ User Guide User Guide ImageJ. Image J user Guid. 2012;1.46r.
 162. Santana LA, Frade MAC, Kajiwara JK, Alves JM. MONITORAMENTO DO TRATAMENTO DE ÚLCERAS DE PERNA ATRAVÉS DO SOFTWARE IMAGEJ®. *Anais*. 2006;
 163. Leonel AJ, Teixeira LG, Oliveira RP, Santiago AF, Batista N V., Ferreira TR, et al. Antioxidative and immunomodulatory effects of tributyrin supplementation on experimental colitis. *Br J Nutr* [Internet]. 2013 Apr [cited 2021 Jul 2];109(8):1396–407. Available from: <https://doi.org/10.1017/S000711451200342X>
 164. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* [Internet]. 1951 Nov [cited 2021 Jun 6];193(1):265–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/>
 165. Barroso FAL, de Jesus LCL, de Castro CP, Batista VL, Ferreira Ê, Fernandes RS, et al. Article intake of lactobacillus delbrueckii (Pexu:Hsp65) prevents the inflammation and the disorganization of the intestinal mucosa in a mouse model of mucositis. *Microorganisms* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Jun 17];9(1):1–27. Available from: [/pmc/articles/PMC7824804/](https://pmc/articles/PMC7824804/)
 166. Quaresma M, Damasceno S, Monteiro C, Lima F, Mendes T, Lima M, et al. Probiotic mixture containing Lactobacillus spp. and Bifidobacterium spp. attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Nutr Cancer*. 2020;72(8):1355–65.

167. Abbasi A, Ghasempour Z, Sabahi S, Kafil HS, Hasannezhad P, Rahbar Saadat Y, et al. The biological activities of postbiotics in gastrointestinal disorders [Internet]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Bellwether Publishing, Ltd.; 2021 [cited 2021 Jun 9]. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2021.1895061>
168. Wegh CAM, Geerlings SY, Knol J, Roeselers G, Belzer C. Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond [Internet]. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019 [cited 2021 Jun 9]. p. 4673. Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
169. Chuah LO, Foo HL, Loh TC, Mohammed Alitheen NB, Yeap SK, Abdul Mutalib NE, et al. Postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* strains exert selective cytotoxicity effects on cancer cells. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2019 Jun 3 [cited 2021 Jun 11];19(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31159791/>
170. Gao J, Li Y, Wan Y, Hu T, Liu L, Yang S, et al. A novel postbiotic from *Lactobacillus rhamnosus* GG with a beneficial effect on intestinal barrier function. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jun 11];10(MAR). Available from: [/pmc/articles/PMC6426789/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3426789/)
171. Mendes F, Galdino P, Emília M, Andrade R, Vieira De Barros A, De Vasconcelos Generoso S, et al. Pretreatment and treatment with fructo-oligosaccharides attenuate intestinal mucositis induced by 5-FU in mice. 2018 [cited 2021 Jun 11]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.09.012>
172. Antunes MM, Leocádio PCL, Teixeira LG, Leonel AJ, Cara DC, Menezes GB, et al. Pretreatment with L-Citrulline Positively Affects the Mucosal Architecture and Permeability of the Small Intestine in a Murine Mucositis Model. *J Parenter Enter Nutr* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2021 Jun 3];40(2):279–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25573703/>
173. Prisciandaro LD, Geier MS, Butler RN, Cummins AG, Howarth GS. Probiotic factors partially improve parameters of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2021 Jun 17];11(7):671–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21307648/>
174. Qiu Y, Zhang J, Ji R, Zhou Y, Shao L, Chen D, et al. Preventative effects of selenium-enriched *Bifidobacterium longum* on irinotecan-induced small intestinal mucositis in mice. *Benef Microbes*. 2019;10(5):569–77.
175. Komarova Y, Malik AB. Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways [Internet]. Vol. 72, *Annual Review of Physiology*. Annual Reviews ; 2009 [cited 2021 Jun 25]. p. 463–93. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-physiol-021909-135833>
176. Lee JS, Tato CM, Joyce-Shaikh B, Gulan F, Cayatte C, Chen Y, et al.

- Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity* [Internet]. 2015 Oct 20 [cited 2021 Jun 11];43(4):727–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26431948/>
177. Rowart P, Wu J, Caplan MJ, Jouret F. Implications of AMPK in the formation of epithelial tight junctions [Internet]. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018 [cited 2021 Jun 25]. p. 2040. Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
 178. González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways [Internet]. Vol. 1778, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Biochim Biophys Acta; 2008 [cited 2021 Jun 16]. p. 729–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17950242/>
 179. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2000 [cited 2021 Jun 16];11(12):4131–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11102513/>
 180. Ferreira TM, Leonel AJ, Melo MA, Santos RRG, Cara DC, Cardoso VN, et al. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. *Lipids* [Internet]. 2012 Jul [cited 2021 Jun 16];47(7):669–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22648862/>
 181. Clayburgh DR, Shen L, Turner JR. A porous defense: The leaky epithelial barrier in intestinal disease [Internet]. Vol. 84, *Laboratory Investigation*. Lab Invest; 2004 [cited 2021 Jun 25]. p. 282–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14767487/>
 182. Wu J, Gan Y, Li M, Chen L, Liang J, Zhuo J, et al. Patchouli alcohol attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis via TLR2/MyD88/NF- κ B pathway and regulation of microbiota. *Biomed Pharmacother*. 2020 Apr 1;124:109883.
 183. Corthésy B. Role of secretory IgA in infection and maintenance of homeostasis [Internet]. Vol. 12, *Autoimmunity Reviews*. Autoimmun Rev; 2013 [cited 2021 Jun 15]. p. 661–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23201924/>
 184. Woodruff SA, Masterson JC, Fillon S, Robinson ZD, Furuta GT. Role of eosinophils in inflammatory bowel and gastrointestinal diseases [Internet]. Vol. 52, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. Lippincott Williams and Wilkins; 2011 [cited 2021 Jun 15]. p. 650–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21593640/>
 185. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation [Internet]. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2013 [cited 2021 Jun 15]. p. 159–75. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri3399>

186. Rothenberg ME. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID) [Internet]. Vol. 113, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mosby Inc.; 2004 [cited 2021 Jun 15]. p. 11–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14713902/>
187. Lampinen M, Carlson M, Håkansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease [Internet]. Vol. 59, *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Allergy; 2004 [cited 2021 Jun 15]. p. 793–805. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15230810/>
188. S Kwiecień , T Brzozowski SJK. EFFECTS OF REACTIVE OXYGEN SPECIES ACTION ON GASTRIC MUCOSA IN VARIOUS MODELS OF MUCOSAL INJURY [Internet]. 2002 [cited 2021 Jun 17]. Available from: <http://www.jpp.krakow.pl>
189. Maria Ferreira Antunes Neto J, José Battibugli Rivera R, Georgis Calvi R, Fernandes Raffa M, César Donadon C, Gomes Pereira A, et al. Níveis Comparativos de Estresse Oxidativo em Camundongos em Duas Situações do Limite Orgânico: Overreaching Induzido por Treinamento de Natação e Câncer Comparative Oxidative Stress Levels in Mice Submitted to Two Situations of Organic Limit: Overreaching Induced by Swimming Training and Cancer ARTIGO ORIGINAL RESUMO Endereço para correspondência. Vol. 14, *Rev Bras Med Esporte*. 2008.
190. Rtibi K, Selmi S, Grami D, Amri M, Sebai H, Marzouki L. Contribution of oxidative stress in acute intestinal mucositis induced by 5 fluorouracil (5-FU) and its pro-drug capecitabine in rats. *Toxicol Mech Methods* [Internet]. 2018 May 4 [cited 2021 Jun 25];28(4):262–7. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15376516.2017.1402976>
191. Guerrero-Encinas I, González-González JN, Santiago-López L, Muhlia-Almazán A, Garcia HS, Mazorra-Manzano MA, et al. Protective Effect of *Lacticaseibacillus casei* CRL 431 Postbiotics on Mitochondrial Function and Oxidative Status in Rats with Aflatoxin B 1 –Induced Oxidative Stress. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2021 [Internet]. 2021 Jan 29 [cited 2021 Jul 19];1:1–11. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-021-09747-x>
192. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids [Internet]. Vol. 3, *Nutrients*. MDPI AG; 2011 [cited 2021 Jun 17]. p. 858–76. Available from: </pmc/articles/PMC3257741/>
193. Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. In: *Proceedings of the Nutrition Society* [Internet]. Cambridge University Press; 2014 [cited 2021 Jun 5]. p. 13–22. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/proceedings-of-the-nutrition-society/article/links-between-diet-gut-microbiota-composition-and-gut-metabolism/3EC628D5D5F59D6E9F800E18AC1485D6>
194. Engels C, Ruscheweyh HJ, Beerenwinkel N, Lacroix C, Schwab C. The

- common gut microbe *Eubacterium hallii* also contributes to intestinal propionate formation. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cited 2021 Jun 25];7(MAY). Available from: [/pmc/articles/PMC4871866/](#)
195. Wang SP, Rubio LA, Duncan SH, Donachie GE, Holtrop G, Lo G, et al. Pivotal Roles for pH, Lactate, and Lactate-Utilizing Bacteria in the Stability of a Human Colonic Microbial Ecosystem. *mSystems*. 2020 Oct 27;5(5).
 196. Teame T, Wang A, Xie M, Zhang Z, Yang Y, Ding Q, et al. Paraprobiotics and Postbiotics of Probiotic Lactobacilli, Their Positive Effects on the Host and Action Mechanisms: A Review [Internet]. Vol. 7, *Frontiers in Nutrition*. Frontiers Media S.A.; 2020 [cited 2021 Jun 28]. p. 570344. Available from: www.frontiersin.org

9. ANEXO

Universidade Federal de Minas Gerais
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CERTIFICADO/CERTIFICATE

que o Protocolo nº. 186/2012, relativo ao projeto intitulado “*Estudo das alterações intestinais associadas e a terapêutica da ação de probióticos em experimentação animal*”, que tem como responsável Flaviano dos Santos com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) na reunião de 04/07/2012. Este certificado expira-se em 03/07/2017.

prolongação até 03/07/2019 -(reunião de 22/05/2017). Aprovada nova prorrogação até 02/07/2021 (reunião de

justify that the Protocol nº. 186/2012, related to the Project entitled “*Study of intestinal disorders associated with and the therapeutic action of probiotics in animal experiments*”, under the supervision of Flaviano dos Santos, under the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation on 07/04/2012. This certificate expires in 07/03/2017.

renewed on 03/07/2019 – (Approve by CEUA in 05/22/2017). New valid date: July/02/2021 (Approve by CEUA 12/

05/12/2018.



Prof. Marcelo Resende de Souza
Coordenador da CEUA/UFGM

10. APÊNDICE

EFFECTS OF LACTATE SUPPLEMENTATION IN AN EXPERIMENTAL MURINE MODEL OF MUCOSITE INDUCED BY 5-FLUOROURACIL

Isabel David De Matos¹, Luísa Martins Trindade², Geovanni Cassali Dantas³, Flaviano Dos Santos Martins⁴, Valbert Nascimento Cardoso⁵, Simone de Vasconcelos Generoso⁶

1. Graduate Program in Nutrition and Health. Department of Nutrition. Federal University of Minas Gerais
2. Graduate Program in Food Science. Faculty of Pharmacy. Federal University of Minas Gerais.
3. Department of General Pathology. Institute of Biological Sciences. Federal University of Minas Gerais.
4. Graduate Program in Microbiology. Institute of Biological Sciences. Federal University of Minas Gerais
5. Department of Clinical and Toxicological Analysis. Faculty of Pharmacy. Federal University of Minas Gerais.
6. Graduate Program in Nutrition and Health. Department of Nutrition. Federal University of Minas Gerais

*Corresponding author: Department of Nutrition, Nursing School, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Alfredo Balena 190, Belo Horizonte, Minas Gerais 30130100, Brazil. Tel: +55 3134098029; e-mail: simonenuufmg@gmail.com.

The authors declare no conflict of interest

ABSTRACT

Use of lactic acid bacteria (LAB) is emerging as alternative in protecting and preventing mucositis induced by 5-fluoracil (5-FU). However, the supplementation of LAB increases the intestinal lactate concentration, and its effects are unknown. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effects of lactate, 10mM, 100mM and 200mM, supplementation on 5-FU-induced mucositis. Male BALB-c mice were divided into groups (n=6): Control + saline (CTL); Control + 10mM Lactate (CTL 10); Control + 100mM Lactate (CTL 100); Control + 200mM Lactate (CTL 200); Mucositis saline (MUC); Mucositis + Lactate 10mM (MUC 10), Mucositis + Lactate 100mM (MUC 100); Mucositis + Lactate 200mM (MUC 200). On the 10th day, mice from MUC, MUC 10, MUC 100 and MUC 200 groups received intraperitoneal (IP) injection (300 mg/kg) of 5-FU, while the control and control + lactate groups received the same amount of saline. Animals were sacrificed after 72h. There was a significant reduction in weight, food consumption and increasing in intestinal of animals in the MUC, MUC 10, MUC 100 and MUC 200 groups compared to the control groups ($p<0.05$). MUC and MUC 10 had more intestinal damage and increase in expression of occlusion zonule-1 mRNA in enterocytes as well in the concentrations of Eosinophil Peroxidase (EPO) and myeloperoxidase (MPO) compared to the CTL group($p<0.05$). However, there was an improvement in the integrity of the epithelium concentration of the antioxidant superoxide dismutase (SOD) and mucus production by goblet cells in the animals in the MUC 200 group($p<0.05$). 100mM lactate increases the concentration of lactate, acetate, propionate and butyrate ($p<0.05$). Conclusion: treatment with lactate, except at a concentration of 10 mM, was able to partially prevent the data caused by mucositis in a dose-dependent manner, with more significant results when using the 200 mM solution.

KEY WORDS: Mucositis. 5-fluorouracil. Lactate. Postbiotics

INTRODUCTION

5- fluorouracil (5-FU) is a chemotherapeutic agent used in advanced types of cancer such as: colorectal, head and neck, breast, stomach and some skin (1,2). The mechanism of action of this drug leads to inhibition of the synthesis of deoxyribonucleic acid (DNA) interfering with the processing and functionality of ribonucleic acid (RNA) in rapidly proliferating cells, both cancerous and healthy, such as bone marrow and mucosa intestinal. This non-specific mechanism of action of 5-FU results in side effects such as nausea, cardiotoxicity, leukopenia, alopecia, myelosuppression, diarrhea and oral and intestinal mucositis(3,4).

Mucositis is an inflammation of the gastrointestinal tract mucosa that leads to the development of ulcerations, morphological damage, changes in intestinal motility and reduced food intake. It affects 20% to 40% of patients undergoing conventional chemotherapy and up to 90% of patients receiving high doses of chemotherapy(5). Mucositis can lead to pain when swallowing, loss of appetite, vomiting, abdominal distension and diarrhea (6–8). These symptoms can compromise the nutritional status of the patient, reduce the ability to tolerate the treatment and prolong the length of stay and hospital costs(9–12).

The pathophysiology of mucositis is multifactorial and involves increased production of reactive oxygen species (ROS), inflammatory cytokines and activation of transcription factors(4,13,14). Furthermore, more recent studies have associated the severity of mucositis with a reduction in the amount and diversity of the enteric microbiota caused by chemotherapy(15,16). Thus, alternatives that lead to the modulation of the microbiota, such as the administration of probiotics, prebiotic, symbiotics could be beneficial to control dysbiosis and reduce complications of intestinal mucositis(17,18).

Some probiotic strains studied for the prevention and treatment of mucositis are gram-positive bacteria belonging to the group of lactic acid bacteria (LAB), such as *Lactococcus lactis*, *Limosilactobacillus plantarum*, *Limosilactobacillus delbrueckii*, *Limosilactobacillus rhamnosus*(19–22). LABs can provide health benefits to the host by producing molecules called posbiotics, such as short-chain fatty acids (SCFA). In addition, LAB supplementation can also lead to increased lactate concentrations in the intestinal lumen, because energy metabolism is mainly based on lactic fermentation(23). In a recent work, Gargari G et al. observed that healthy adults supplemented with a probiotic capsule (*B. animalis* subsp. *lactis* BI-04 5.25×10^{10} , *L. acidophilus* La-14 1.4×10^{10} CFU, *L. plantarum* SDZ-11 2.8×10^9 CFU and *L. paracasei* SDZ - 22 (7×10^8 CFU per capsule), for two weeks, had a significant increase in lactate concentrations in feces, ranging from 2.0 to 2.5mMol/100g(24).

Lactate is a bioactive molecule that acts as a signaling agent for immune system functions, regulating the activity of macrophages and dendritic cells, in addition to the production of pro-inflammatory cytokines. However, the lactate concentrations used vary among studies and there is still no consensus on what the best dosage would be, as well as its mechanism of action(11,25–27). Furthermore, although some studies demonstrate that lactate plays an important role in the regulation of inflammatory activity and may be beneficial in the treatment of inflammatory diseases, its effect is unknown in other situations, especially in mucositis(27–30).

Previous, unpublished work by our research group evaluated the differences in supplementation of live and inactivated *Limosilactobacillus rhamnosus* in the 5-FU-induced intestinal mucositis model. The results showed that supplementation of live *L. rhamnosus* increased lactate concentrations in the feces of mice and presented less satisfactory results in reducing intestinal permeability (PI) and improving histological and morphometric parameters, compared to the group treated with *L. rhamnosus* inactivated. Therefore, it is necessary to evaluate the effects of this metabolite on mucositis.

MATERIAL AND METHODS

Animals and experimental design

Forty-eight mice were randomly divided into eight groups (n=6): Control (CTL) – saline; no induction of mucositis; Control + 10mM Lactate (CTL 10) - lactate without mucositis induction; Control + 100mM Lactate (CTL 100) - lactate without mucositis induction; Control + 200mM Lactate (CTL 200) - lactate without mucositis induction; Mucositis (MUC) saline; induction of mucositis, Mucositis + Lactate 10mM (MUC 10) - lactate induction of mucositis, Mucositis + Lactate 100mM (MUC 100) - lactate induction of mucositis, Mucositis Lactate 200mM (MUC 200) - lactate induction of mucositis. The mice in the CTL and MUC groups received 0.2 mL of saline per gavage. The animals in groups MUC 10, MUC 100 and MUC 200 received, by gavage, 0.2 mL of lactate solution at concentrations of 10, 100 and 200mM respectively. Supplementation took place for 13 days (D1-D13) and gavage was always administered at the same time. The induction of mucositis was performed on the 10th day, after lactate supplementation, by intraperitoneal (IP) injection of 5-FU (300 mg/kg) according to the method already established in previous studies of our group(31). The animals in the MUC, MUC 10, MUC 100 and MUC 200 groups received the chemotherapy, while the animals in the CTL groups received an IP injection with the same volume of saline (NaCl 99%). The study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at UFMG (CEUA/UFMG), under protocol No. 66/2018 and complies with the guide recommended by the National Council for Animal Experimentation (Federal Government of Brazil) for the care and use of laboratory animals(32).

Lactate

Sigma-Aldrich ® brand lactate solution, 85% content, code W261106 MKCD2387, quality standard Food Chemicals Codex (FCC) was used. The concentrated lactate was kept at room temperature and the solutions were prepared daily by diluting them in distilled water to reach concentrations of 10mM, 100mM and 200mM. Considering that lactate has a molar mass: 90.08 g/mol and density 1190g/L and the solution used is composed of 85% of lactate, a sufficient quantity in µl was calculated to obtain the solutions with the desired concentration.

Intestinal permeability

Intestinal permeability was evaluated on the 13th day according to the method proposed by BARROS and TRINDADE et al(31,33). A solution composed of diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) labeled with radioactive element 99m-Tc (99mTc) containing 18.5MBq (megabecquerel) of activity was used. After 4 hours of administration, the animals were anesthetized and blood was collected by axillary puncture

of the superior vena cava. The radioactivity of blood and standards was measured in a Perkin Elmer Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter gamma radiation counter (Perkin Elmer Inc., Waltham, USA). The data were compared with the standard dose and expressed as a % dose, using the following equation [counts per minute (blood cpm/cpm of the administered dose)] \times 100.

Histological and mucus analysis

After euthanasia, the intestine was measured and 10cm of the segment of the distal small intestine corresponding to the ileum was removed, opened longitudinally, rolled up, fixed in 4% buffered formaldehyde for 24 hours. 4 μ m sections of the ileum of each animal were deparaffinized and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) or Periodic Acid Schiff (PAS). The slices were photographed in an Olympus BX51 microscope coupled to a digital camera using the SPOT Advanced program and were reviewed by a pathologist, Prof. Dr. Geovanni Cassali Dantas (Department of Pathology, Institute of Biological Sciences/UFMG), and mucosal and muscle injuries were evaluated according to the method proposed by SOARES. The height of the villi and depth of the crypts were measured in micrometers using the ImageJ program.

The mucus analysis was performed by evaluating the pixel intensity referring to the coloring of the PAS marking and with the aid of the ImageJ® software color deconvolution plugin, positive PAS color enhancement was obtained. The results were expressed as average pixel intensity.

Gene expression analysis by real-time PCR of proteins from tight junctions - ZO-1 and Occludin

The analysis was performed according to the method described by ANDRADE et al(34). mRNA was isolated, Then, 1 μ g of RNA was reverse-transcribed for cDNA synthesis. The synthesized cDNA was amplified by the technique of Real Time PCR, using specific primers. Values were expressed as the amount of amplified gene compared to the control group ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Mucus

Ileum sections were stained using the combined technique of Alcian Blue and Combined Periodic Acid Schiff (PAS/AB) with adaptations of the technique described by MCMANUS; MOWRY, 1960(35). Neutral mucopolysaccharide-producing cells are stained pink in color. Then, 4 random fields of each animal were photographed under a microscope at 40x magnification and these images were used to measure the number of pixels related to the color of the PAS marking using the color deconvolution plugin of the ImageJ® software. The results were expressed as mean of pixel values (36,37).

Intestinal cellular infiltrate

The evaluation of the intestinal cellular infiltrate was performed according to the method described by ANDRADE et al(34) based on the measurement of the activity of the enzymes myeloperoxidase (MPO) and eosinophil peroxidase (EPO). The amount of MPO was measured using spectrophotometry at 450nm wavelength and 492 nm wavelength for EPO. MPO and EPO results were expressed in arbitrary units. Protein concentration was measured according to Lowry et al. (1951)(38).

Oxidative stress

The analysis was performed according to the method described by ANDRADE et al(34). To assess oxidative stress, approximately 50 mg were removed from the ileum and homogenized with 1mL of 1x cold PBS and centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes at room temperature. The supernatant was separated for the analysis of superoxide dismutase, thiobarbituric acid reactive substances and hydroperoxide concentration.

Short-Chain Fatty Acids (SCFA) Analysis

Samples of 100mg of feces from each animal were weighed, then macerated in 1.2 mL of acidified type 1 water (pH 2.5) and centrifuged for 10 minutes at 14,000rpm. Then the supernatant was collected and filtered through a 0.22 μm filter with the aid of a 1mL syringe. The dosage of SCFA, acetate, propionate and butyrate and lactate were made from this aqueous extract of feces by HPLC-UV/Vis 210nm. The column used was SUPELCOGEL#C-610H (59320-U), which uses ion exclusion as a chromatographic method. Quantification and identification were performed using a SCFA standard curve with 6 calibration points each: 25000 μM , 12500 μM , 5000 μM , 1000 μM , 125 μM and 5 μM .

Statistical analysis

Data were evaluated using the Kolmogorov-Smirnov normality test. The statistical difference of the parametric results was performed using the analysis of variance (ANOVA/One way), with Newman Keuls post-test, for the data, considered parametric according to the Kolmogorov-Smirnov test. For data considered as non-parametric, the Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test were used. In the parameters Hydroperoxides and TBARS, the unpaired T Test was also used. Differences were considered statistically significant for $p < 0.05$. All analyzes were performed using GraphPadPrism statistical software version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA)

RESULTS

Weight variation and food consumption

We tracked the animals' weight during the experiment. On the 13th day, 72 hours after induction, a significant reduction in weight and food consumption was observed in the animals in the MUC, MUC 10, MUC 100 and MUC 200 group compared to the control groups (Figure 1A and 1B) ($p < 0.05$). Lactate treatment, regardless of the concentration, was not able to influence weight loss or food consumption caused by mucositis induction ($p > 0.05$).

Small Intestine Length

The size of the small intestine showed a significant reduction in the MUC group compared to the CTL group ($p < 0.05$). Treatment with lactate at 100mM and 200mM were able to prevent this reduction. ($p < 0.05$). (Figure 2).

Intestinal Permeability

On the 13th day, PI was assessed by counting the radioactivity in the blood. The action of the chemotherapeutic agent led to an increase in intestinal permeability in the mucositis group when compared

to the control group ($p < 0.05$). Lactate supplementation, regardless of the concentration used, was not able to prevent this increase ($p > 0.05$) (Figure 3).

Histological and mucus analysis

To assess if only lactate supplementation leading to changes in the intestinal epithelium, we included control groups supplemented with different lactate concentrations. It is observed that there was no change in the morphological aspects of the animals in the control groups supplemented with lactate (CTL10, CTL100 and CTL 200) compared to the CTL group (Figure 4) ($p > 0.05$). On the other hand, the animals in the MUC group presented intestinal epithelium with shortening of the villi, infiltration of inflammatory cells in the lamina propria, flattened and vacuolated cells and loss of tissue architecture when compared to the CTL group (Figure 5B). More significant tissue lesions were found in the animals of the MUC 10 group when compared to the other groups, with the presence of crypt necrosis and intense infiltration of inflammatory cells (Figure 5C). The intestinal mucosa of mice with mucositis supplemented with lactate at concentrations of 100mM and 200mM showed partial improvement in epithelial integrity and reduced inflammatory infiltrate compared to animals in the MUC and MUC10 groups (Figure 5 D and 5E).

Figure 6 shows the analysis using the score according to the scoring system mentioned by SOARES et al., 2008(152). The CTL, CTL 10, CTL 100 and CTL 200 groups had a histological score of 0, representative of normal morphological findings. The MUC group has a higher score compared to the healthy groups, between 1 and 2, which indicates shortened villi, loss of crypt architecture, inflammatory cell infiltrate, vacuolization and edema ($p < 0.05$). The MUC 100 group has a score of 1, but there is no statistical difference in relation to the MUC group ($p > 0.05$). The highest score found was in the MUC 10 group, with the presence of necrosis in the crypts and damage to the muscle layer ($p < 0.05$). Lactate supplementation reduced the score of animals in the MUC 200 group, suggesting that lactate was able to partially prevent the damage caused by the chemotherapy ($p < 0.05$) (Figure 6).

The morphometric analysis data allows us to confirm these findings, as it is possible to observe shortening of villi (Figure 7A) and reduction in the depth of the crypts (Figure 7B) three days after the administration of 5-FU in the MUC, MUC 10 and MUC 100 groups in relation to the control and control + lactate groups ($p < 0.05$). Only the 200mM lactate solution was able to promote recovery of these parameters (MUC 200), showing similar results to the CTL group. ($p < 0.05$). (Figure 7A and 7B).

Gene expression by Real Time PCR of tight junctions proteins - ZO-1 and Occludin

It was observed that the chemotherapeutic increased the expression of ZO-1 mRNA in the MUC and MUC 10 groups compared to the CTL group ($p < 0.05$). However, the supplementation of lactate the 100mM 200mM were able to partially reverse this increase ($p < 0.05$) (Figure 8A). For the expression of Occludin mRNA, no statistical difference was observed between the groups ($p > 0.05$) (Figure 8B).

Mucus

Regarding mucus production, we found that among healthy animals, lactate was not able to interfere with the mucus concentration in the intestine, as the CTL, CTL 10, CTL 100 and CTL 200 groups showed similar results ($p > 0.005$) (Figure 9A). However, when comparing the CTL and MUC groups, it is observed that

the chemotherapy drug reduces the production of mucus in the intestine ($p < 0.05$). Treatment with lactate at a concentration of 10mM (MUC 10) was not able to reverse this increase ($p > 0.05$). At the concentration of 100mM (MUC 100), the treatment partially increases mucus production and when treating the animals with mucositis with 200mM lactate (MUC 200) the production becomes similar to the CTL group ($p > 0.05$) (Figure 9B).

MPO e EPO

The MPO and EPO enzymes were evaluated in the ileum for indirect determination of the neutrophil and eosinophil infiltrate, respectively. There was a significant increase in MPO and EPO enzymes in the MUC and MUC 10 groups compared to the CTL group ($p < 0.05$). In the MUC 100 and MUC 200 groups, there was a significant reduction in the MPO enzyme in the ileum, when compared to the MUC group (Figure 10A). The same pattern was also observed for EPO (Figure 10B).

Oxidative stress

Statistical difference was observed in hydroperoxide formation between the MUC group compared to the CTL group ($p < 0.05$). However, no difference was observed between the treated mucositis groups, MUC 10, MUC 100 and MUC 200, compared to the group MUC ($p > 0.05$) (Figure 11A). In the analysis of lipid peroxidation in the ileum (TBARS technique), no statistical difference was observed by the ANOVA test between groups ($p > 0.05$), but when making the comparison using the T test of the CTL and MUC groups, it was possible to identify a difference between them ($p < 0.05$) (Figure 11B). Regarding the SOD enzyme activity in the ileum, there was a partial increase in the enzyme activity in the animals of the MUC 100 group and a significant increase in the animals of the MUC 200 group compared to the other groups ($p < 0.05$) (Figure 11C).

SCFA dosage

The SCFA dosage was performed in the mice feces, 72 hours after mucositis induction. The action of the chemotherapy leads to reduction of acetate, propionate and butyrate in the feces of animals in the MUC group when compared to the CTL group ($p < 0.05$) (Figure 12A, 12B e 12C). However, treatment with lactate at a concentration of 100mM increased the concentration of these two SCFA. In relation to butyrate, the chemotherapeutic was also able to reduce its concentration in feces, however treatment with lactate significantly increased its concentrations in groups c MUC 10 and MUC 100 and partially in group MUC 200 ($p > 0.05$). The induction of mucositis did not change the lactate concentrations in the ileum, since there was no difference between the CTL and MUC groups ($p > 0.05$). Only lactate supplementation at a concentration of 100nM was able to increase the concentration in feces. (Figure 12D).

DISCUSSION

Chemotherapy treatment consists of the use of drugs that culminate in apoptosis of cancer cells, inhibiting their growth through damage to DNA or to the processes involved in cell division(1). However, its

nonspecific action also causes damage to the intestinal mucosa due to the production of reactive oxygen species (ROS), promotion of oxidative stress, increased production of inflammatory cytokines(39). These cascades of events result in effects such as weight loss, nausea, diarrhea, and oral and intestinal mucositis(3,40). In addition, chemotherapy also changes the amount and diversity of the enteric microbiota, called intestinal dysbiosis, which can further aggravate intestinal mucositis. Thus, evidence suggested that the administration of pre, pro and symbiotics could act on dysbiosis and, consequently, reduce the complications of intestinal mucositis(9,17,41,42).

Despite the concept of probiotics considering only viable microorganisms, several studies have shown beneficial effects of inactivated bacteria on the health of the host(43,44). Among the advantages of using these in relation to live bacteria are the ease in the storage and transport process and the longer shelf life(45). In addition, they have advantages in terms of safety for the individual, reducing the possibility of microbial translocation and associated infections(45,46). In recent years, some studies have also shown benefits using the administration of products secreted by viable bacteria or released after their lysis called postbiotics. Examples are SCFA, enzymes, peptides, teichoic acids, cell surface proteins, vitamins, lactate and other organic acids(45,46).

Evidence has shown that postbiotics have antioxidant, antiproliferative, antipathogenic, and immunomodulatory effects(47,48). Gao and collaborators demonstrated that the probiotic of *Limosilactobacillus rhamnosus* GG has a protective effect on the intestinal barrier in mice with Sodium Dextran Sulfate (DSS)-induced colitis, preventing weight loss, intestinal shortening, crypt necrosis and reduction of ZO-1 protein, in addition to reducing the inflammatory infiltrate(48). Already, the work of IRAPORDA 2016, showed positive results with intrarectal administration of 200mM lactate, in a murine model of colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), in the prevention of histopathological damage, as well as bacterial translocation and reduction of IL-6 levels(49). However, the mechanism of action of these substances applied in mucositis still needs to be elucidated.

Although there are some studies that have shown beneficial effects of administering live and inactivated probiotics in a model of intestinal mucositis, there is no work in the literature that has evaluated the effects of administering its main by-product, lactate, in a similar model to date(22,50). In this sense, the present study aimed to evaluate the impact of lactate administration, at concentrations of 10mM, 100mM and 200mM, on intestinal mucositis and associated symptoms.

One of the main symptoms of intestinal mucositis that can compromise cancer treatment is loss of appetite and, consequently, weight reduction, leading to a worsening of the nutritional status and quality of life of patients(9,10). Thus, we measured the animals' food intake and weight 72h after mucositis induction and evaluated whether the lactate treatment was able to influence these parameters. It was found that the animals that received the chemotherapy showed significant weight loss and reduced food consumption when compared to animals in the control groups. These results corroborate those found in the studies by GALDINO et al. (2018)(51), TRINDADE et al. (2018)(31), ANTUNES et al (2016)(52) and CHANG et al (2018)(53) who observed weight loss and reduced consumption using the same mucositis induction protocol. However, the treatment with lactate at different concentrations was not able to reverse the weight reduction or improve the food intake of the animals. Corroborating our findings, Prisciandaro et al.

demonstrated that treatment with *Limosilactobacillus fermentum* BR11 supernatant also did not influence weight loss and food consumption of animals with 5-FU-induced intestinal mucositis(54).

These changes can be explained by the inflammatory process of mucositis and by the presence of tissue lesions that affect the intestine, especially the ileum, reducing the absorption of nutrients(4). This inflammatory process also causes changes in smooth muscle contractility, leading to gastrointestinal dysmotility, delayed gastric emptying that can contribute to the generation of dyspepsia symptoms, leading to reduced food consumption(55). In addition, there may be a reduction in the absorption of nutrients by the reduction in the length of the intestine observed in mucositis(56). Corroborating this mechanism, our results showed a reduction in the length of the small intestine in animals with intestinal mucositis. However, treatment with lactate at concentrations of 100mM and 200mM was able to reduce intestinal shortening. From Jesus et al. also observed that the treatment of milk fermented by *Lactobacillus delbrueckii* Lactis CIDCA 133 was able to prevent reduction of small bowel shortening in animals with 5-FU-induced intestinal mucositis(21).

The apoptotic and ulcerative process resulting from the use of 5-FU can also lead to the loss of the intestinal barrier and, consequently, to an increase in IP. Thus, we analyzed IP using the DTPA-99mTc radiotracer, administered by gavage, in order to verify its passage from the intestinal lumen to the bloodstream(57). As in the work of TRINDADE et al., we found that in animals from the MUC groups, the chemotherapy increased the PI 72h after induction(31). However, supplementation with lactate, regardless of the dose used, was not able to prevent this increase.

To elucidate the mechanism of action of lactate in the intestinal barrier, histological analyzes were performed. The MUC group presented intestinal epithelium different from the CTL group, with shortening of the villi and crypts, infiltration of inflammatory cells in the lamina propria, flattened and vacuolated cells and loss of tissue architecture. In addition, they presented a histological score between 1 and 2, confirming the morphological alterations observed. On the other hand, the animals in the MUC 10 group, despite having morphometry and PI similar to the MUC group, present a histological score close to 3, which indicates a worsening in the intestinal architecture with the presence of edema, vacuolization and neutrophil infiltration in the muscular layer of the intestine. On the other hand, in the animals treated with the 200 mM lactate solution, an improvement in morphometry and a reduction in the histological score similar to the CTL group was observed. Similar data were observed in the work by IRAPORDA et al, who evaluated the effects of intrarectal administration of 200mM of lactate in a murine model of colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) in male BALBc mice(49). The results showed prevention of histopathological damage, reducing the histological score. Prisciandaro et al. also observed a reduction in the histological score and an improvement in the length of villi and crypts in animals with 5-FU-induced intestinal mucositis and treated with *Escherichia coli* Nissle 19 17 (EcN) and *Limosilactobacillus fermentum* BR11 supernatant(54).

In order to try to elucidate the findings found in the MUC 200 group (increased IP with normal intestinal morphometry) we analyzed the expression of tight junctions (TJ) proteins (zonulin-1 and occludin) in the ileum of animals. The animals in the MUC and MUC 10 groups, which showed greater damage in the histology of the epithelium, showed an increase in the expression of ZO-1 mRNA, however, this result was

not observed in the expression of Occludin. It is known that ZO-1 has the role of anchoring the other proteins that participate in the junctional complex, while occludin is essential for the maintenance of the integrity of the intestinal mucosa(58,59). Our results indicate that the severity of the lesion in these groups stimulated the epithelium to try to seek homeostasis, by increasing the translation of ZO-1 proteins, aiming to organize the structure of the TJ(60). On the other hand, in animals supplemented with lactate at concentrations of 100 and 200 mM, intermediate levels of ZO-1 mRNA expression were observed, which corroborates the histopathological findings and the hypothesis that lactate is acting to attenuate tissue damage in these animals. A study by Ferreira et al. evaluated the expression of ZO-1 in animals with 5FU-induced mucositis and the effects of oral administration of SCFA (35 mM acetate, 15 mM propionate and 9 mM butyrate) or 9 mM butyrate for 10 days. The results showed an increase in ZO-1 expression in the animals that received 5FU, however the 5FU + butyrate mice showed a reduction in this expression, with results closer to the control(60).

Another important component of the intestinal barrier is mucus. Mucins are high molecular weight acid glycoproteins secreted by goblet cells, which hydrate in the lumen and form a barrier in order to reduce the contact of microorganisms with immune cells and the surface of the epithelium, in addition to retaining other substances, such as peptides antimicrobials and secretory immunoglobulin A (sIgA). However, we observed that the use of 5-fluorouracil decreases the amount of mucus produced by goblet cells in the jejunum and consequently the production of mucin. On the other hand, supplementation with 200mM lactate led to a significant increase in mucus production. Similar data were found by Oh et al. (2017) using blackberry leaf extract fermented with *L. acidophilus* A4(61).

Due to the damage caused by the chemotherapy in the intestinal barrier and aiming at protection against pathogens, immunological mediators are recruited that help in the responses to intestinal lesions(62). Our results showed that 72 hours after the administration of 5-FU there was a significant increase in the infiltration of eosinophils and neutrophils in the ileum of animals in the MUC group compared to the CTL group. However, the administration of lactate at concentrations of 100 and 200mM prevented both the recruitment of neutrophils and eosinophils, identified by the dosage of MPO and EPO enzymes. Similar data were found in the work conducted by Jesus et al, who also observed a reduction in the concentration of MPO in animals treated with *Lactobacillus delbrueckii* Lactis CIDCA 133 supernatant. These results are consistent with other studies, which similarly observed beneficial effects of supernatants of probiotics in the reduction of the inflammatory infiltrate, such as the supernatant of *E. coli* Nissle 1917 and *Limosilactobacillus fermentum* BR11(54). However, the 10mM solution was not able to reduce the concentration of EPO and MPO. This result is in accordance with the finding of higher histological score found in the analyzes of the MUC 10 group. According to Iraporda et al, lactate produces immunodulatory effects, negatively regulating intestinal proinflammatory responses in epithelial cells and myeloid cells, but only at higher concentrations, between 20 and 50 mM(29).

The leukocyte infiltration process is initiated by the increased production of ROS at the site and, consequently, by the increased oxidative stress in the tissue(63). Thus, we evaluated this stress by lipid peroxidation, formation of hydroperoxides and activity of antioxidant enzymes SOD. An increase in hydroperoxides and lipid peroxidation (TBARS) was observed in animals from the MUC group compared

to the CTL group. However, although treatment with lactate at different concentrations was not able to reduce lipid peroxidation in animals with mucositis, it is possible to identify an increase in the activity of the antioxidant enzyme SOD in the MUC 200 group. This enzyme has its expression increased when there is an increase of the amount of ROS in tissue as a first line of humoral defense seeking to reduce the damage generated by oxidative stress(63). A study evaluated the contribution of oxidative stress in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil (5-FU) and demonstrated that animals with mucositis showed a significant increase in the production of hydrogen peroxide (H₂O₂) and a reduction in SOD(64).

Intestinal homeostasis is also related to SCFA production, including acetate, butyrate and propionate and lactate(65). As previously mentioned in this work, under homeostasis conditions, lactate and SCFA produced are rapidly consumed by the microbiota and epithelial cells, maintaining their concentrations in the intestine close to 7mM of lactate and acetate, and 13 mM of propionate and butyrate in the terminal ileum. However, in situations of imbalance between bacterial production and absorption in the associated host, these concentrations may change(66). Unlike expected, we observed an increase in the concentrations of lactate, acetate and propionate only in animals from the MUC 100 group. This increase can be explained by the acidification of the medium and the consequent increase in lactate production by the faecal microbiota, as demonstrated in vitro by Belenguer with stool samples incubated at pH 5.2(66).

Interestingly, the animals in the MUC 200 group, despite being supplemented with a 200 mM solution, did not show an increase in the lactate concentration in the feces. This fact can be explained by a possible modulation in the microbiota leading to an increase in the concentration of lactate-using bacteria such as *Eubacterium halli*, which use the same in their metabolism and convert it into acetate, propionate or butyrate, with these metabolites being quickly used as a substrate both by epithelial cells and by microbiota (66,67). The study by Engels et al (68) using fecal inocula from healthy volunteers observed an increase in the growth of *E. halli* when they were cultivated in the presence of 40 mM lactate and lactate + glycerol(68).

In addition, the greater the presence of lactate in the intestine, the greater the growth of sulfate-reducing bacteria, increasing the production of hydrogen sulfate, directly affecting the survival of BAL in the intestinal lumen and, consequently, reducing the production of lactate by the microbiota(69). An in vitro study observed that lactate concentrations remained low in human colon bacterial communities, maintained at pH 6.5, even when lactate was infused at 10 or 20 mM. On the other hand, at lower pH (5.5), after lactate infusion, it was observed an accumulation of it. These results can be explained by the change in the intestinal microbiota when lactate was added at a lower pH, leading to an increase in sulfate-reducing bacteria such as Proteobacteria and butyrate-producing bacteria, such as *Bifidobacterium adolescentis*, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*.(70). To better understand our results, ideal would be to perform a microbiota analysis to prove the possible changes in composition generated by supplementation with lactate.

We conclude that treatment with lactate was able to partially prevent the damage caused by mucositis in a dose-dependent manner, with more significant results when using the 200mM solution. Also, we observed that the treatment with lactate at a concentration of 10 mM, showed a significant worsening of some parameters such as histological score when compared to the MUC group.

REFERENCES

1. Guichard N, Guillaume D, Bonnabry P, Fleury-Souverain S. Antineoplastic drugs and their analysis: A state of the art review [Internet]. Vol. 142, *Analyst*. Royal Society of Chemistry; 2017 [cited 2021 Jun 3]. p. 2273–321. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/an/c7an00367f>
2. Cassidy S, Syed BA. Colorectal cancer drugs market [Internet]. Vol. 16, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group; 2017 [cited 2021 Jun 3]. p. 525–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28529321/>
3. Cinausero M, Aprile G, Ermacora P, Basile D, Vitale MG, Fanotto V, et al. New frontiers in the pathobiology and treatment of cancer regimen-related mucosal injury [Internet]. Vol. 8, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2017 [cited 2021 Jun 3]. Available from: </pmc/articles/PMC5462992/>
4. Sonis ST. The pathobiology of mucositis [Internet]. Vol. 4, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2004 [cited 2021 Jun 3]. p. 277–84. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc1318>
5. Sougiannis AT, VanderVeen BN, Davis JM, Fan D, Murphy EA. Understanding chemotherapy-induced intestinal mucositis and strategies to improve gut resilience. *Am J Physiol Liver Physiol* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Jun 21];320(5):G712–9. Available from: <http://www.ajpgi.org>
6. Miranda MP de, Souza DS de. Glutamina na Prevenção e Tratamento da Mucosite em Pacientes Adultos Oncológicos: uma Revisão Sistemática da Literatura. *Rev Bras Cancerol* [Internet]. 2015 Sep 30 [cited 2021 Jun 3];61(3):277–85. Available from: <http://www.pubmed.gov>
7. Hamouda N, Sano T, Oikawa Y, Ozaki T, Shimakawa M, Matsumoto K, et al. Apoptosis, Dysbiosis and Expression of Inflammatory Cytokines are Sequential Events in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2021 Jun 3];121(3):159–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28374966/>
8. Touchefeu Y, Montassier E, Nieman K, Gastinne T, Potel G, Bruley Des Varannes S, et al. Systematic review: The role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis - Current evidence and potential clinical applications [Internet]. Vol. 40, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. Blackwell Publishing Ltd; 2014 [cited 2021 Jun 3]. p. 409–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25040088/>
9. Bowen JM, Stringer AM, Gibson RJ, Yeoh ASJ, Hannam S, Keefe DMK. VSL#3 probiotic treatment reduces chemotherapy-induced diarrhea and weight loss. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2007 Sep [cited 2021 Jun 3];6(9):1449–54. Available from: <http://www.landesbioscience.com/journals/cbt/article/4622>

10. Ala S, Saeedi M, Janbabai G, Ganji R, Azhdari E, Shiva A. Efficacy of Sucralfate Mouth Wash in Prevention of 5-fluorouracil Induced Oral Mucositis: A Prospective, Randomized, Double-Blind, Controlled Trial. *Nutr Cancer* [Internet]. 2016 Apr 2 [cited 2021 Jun 3];68(3):456–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27007594/>
11. Garrote GL, Abraham AG, Rumbo M. Is lactate an undervalued functional component of fermented food products? *Front Microbiol* [Internet]. 2015 Jun 19 [cited 2021 Jun 3];6(JUN):629. Available from: www.frontiersin.org
12. Jameela J, Abdullah D, Arshia A, Yasmeen Q, Tooba K, Sania B. A survey on gastrointestinal adverse drug reactions of Doxorubicin and Cyclophosphamide combination therapy - PubMed [Internet]. [cited 2021 Jun 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30325912/>
13. Sonis ST. The biologic role for nuclear factor-kappaB in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy [Internet]. Vol. 13, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. Intern. and American Associations for Dental Research; 2002 [cited 2021 Jun 3]. p. 380–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12393757/>
14. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies [Internet]. Vol. 3, *Nature Reviews Cancer*. Nat Rev Cancer; 2003 [cited 2021 Jun 3]. p. 330–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12724731/>
15. Li HL, Lu L, Wang XS, Qin LY, Wang P, Qiu SP, et al. Alteration of gut microbiota and inflammatory cytokine/chemokine profiles in 5-fluorouracil induced intestinal mucositis. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017 Oct 26 [cited 2021 Jun 3];7(OCT):455. Available from: www.frontiersin.org
16. Yuan L, Zhang S, Li H, Yang F, Mushtaq N, Ullah S, et al. The influence of gut microbiota dysbiosis to the efficacy of 5-Fluorouracil treatment on colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2018 Dec 1;108:184–93.
17. Yeung CY, Chan WT, Jiang C Bin, Cheng ML, Liu CY, Chang SW, et al. Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model. *PLoS One* [Internet]. 2015 Sep 25 [cited 2021 Jun 3];10(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26406888/>
18. Rad AH, Aghebati-Maleki L, Kafil HS, Abbasi A. Molecular mechanisms of postbiotics in colorectal cancer prevention and treatment [Internet]. Vol. 61, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Inc.; 2020 [cited 2021 Jun 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32410512/>
19. Carvalho R, Vaz A, Pereira FL, Dorella F, Aguiar E, Chatel JM, et al. Gut microbiome modulation during treatment of mucositis with the dairy bacterium *Lactococcus lactis* and recombinant strain secreting human antimicrobial PAP. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021 Jun 9];8(1):1–10. Available from: www.nature.com/scientificreports

20. Levit R, Savoy de Giori G, de Moreno de LeBlanc A, LeBlanc JG. Protective effect of the riboflavin-overproducing strain *Lactobacillus plantarum* CRL2130 on intestinal mucositis in mice. *Nutrition*. 2018 Oct 1;54:165–72.
21. De Jesus LCL, Drumond MM, de Carvalho A, Santos SS, Martins FS, Ferreira Ê, et al. Protective effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* CIDCA 133 in a model of 5-Fluorouracil-Induced intestinal mucositis. *J Funct Foods*. 2019 Feb 1;53:197–207.
22. Chang C-W, Liu C-Y, Lee H-C, Huang Y-H, Li L-H, Chiau J-SC, et al. *Lactobacillus casei* Variety *rhamnosus* Probiotic Preventively Attenuates 5-Fluorouracil/Oxaliplatin-Induced Intestinal Injury in a Syngeneic Colorectal Cancer Model. *Front Microbiol*. 2018 May;9:983.
23. Pessione E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. [Internet]. Vol. 2, *Frontiers in cellular and infection microbiology*. *Front Cell Infect Microbiol*; 2012 [cited 2021 Jun 3]. p. 86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22919677/>
24. Gargari G, Taverniti V, Koirala R, Gardana C, Guglielmetti S. Impact of a multistrain probiotic formulation with high bifidobacterial content on the fecal bacterial community and short-chain fatty acid levels of healthy adults. *Microorganisms* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2021 Jun 3];8(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32235660/>
25. Iraporda C, Romanin DE, Rumbo M, Garrote GL, Abraham AG. The role of lactate on the immunomodulatory properties of the nonbacterial fraction of kefir. *Food Res Int*. 2014 Aug 1;62:247–53.
26. Lee YS, Kim TY, Kim Y, Lee SH, Kim S, Kang SW, et al. Microbiota-Derived Lactate Accelerates Intestinal Stem-Cell-Mediated Epithelial Development. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2018 Dec 12 [cited 2021 Jun 3];24(6):833–846.e6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30543778/>
27. Okada T, Fukuda S, Hase K, Nishiumi S, Izumi Y, Yoshida M, et al. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat Commun* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jun 3];4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23552069/>
28. Watanabe T, Nishio H, Tanigawa T, Yamagami H, Okazaki H, Watanabe K, et al. Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: Involvement of lactic acid. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2009 Sep [cited 2021 Jun 3];297(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19589943/>
29. Iraporda C, Errea A, Romanin DE, Cayet D, Pereyra E, Pignataro O, et al. Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2021 Jun 3];220(10):1161–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26101138/>
30. Dietl K, Renner K, Dettmer K, Timischl B, Eberhart K, Dorn C, et al. Lactic Acid and Acidification Inhibit TNF Secretion and Glycolysis of Human Monocytes. *J Immunol* [Internet].

- 2010 Feb 1 [cited 2021 Jun 3];184(3):1200–9. Available from:
<http://www.jimmunol.org/content/184/3/1200>
31. Trindade LM, Martins VD, Rodrigues NM, Souza ELS, Martins FS, Costa GMF, et al. Oral administration of Simbioflora® (synbiotic) attenuates intestinal damage in a mouse model of 5-fluorouracil-induced mucositis. *Benef Microbes* [Internet]. 2018 [cited 2021 Jun 3];9(3):477–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29633632/>
 32. Resolucao-Normativa-CONCEA-n-32-de-06.09.2016-D.O.U.-de-08.09.2016-Secao-I-Pag.-05. 2016;(2013):2013–5.
 33. Barros PAV de, Generoso S de V, Andrade MER, da Gama MAS, Lopes FCF, de Sales e Souza ÉL, et al. Effect of Conjugated Linoleic Acid-enriched Butter After 24 hours of Intestinal Mucositis Induction. *Nutr Cancer*. 2017;69(1):168–75.
 34. Andrade MER, Barros PAV de, Menta PL dos R, Costa GMF, Miranda SEM, Leocádio PCL, et al. Arginine supplementation reduces colonic injury, inflammation and oxidative stress of DSS-induced colitis in mice. *J Funct Foods*. 2019 Jan 1;52:360–9.
 35. MCMANUS, J. F.; MOWRY RW. Staining methods Histologic and histochemical. Nova York: Hoeber; 1960.
 36. Ferreira T, Rasband W. ImageJ User Guide User Guide ImageJ. *Image J user Guid*. 2012;1:46r.
 37. Santana LA, Frade MAC, Kajiwara JK, Alves JM. MONITORAMENTO DO TRATAMENTO DE ÚLCERAS DE PERNA ATRAVÉS DO SOFTWARE IMAGEJ ®. *Anais*. 2006;
 38. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* [Internet]. 1951 Nov [cited 2021 Jun 6];193(1):265–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/>
 39. Soares PMG, Mota JMCS, Souza EP, Justino PFC, Franco AX, Cunha FQ, et al. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. *Cytokine*. 2013 Jan 1;61(1):46–9.
 40. Batista VL, da Silva TF, de Jesus LCL, Coelho-Rocha ND, Barroso FAL, Tavares LM, et al. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis [Internet]. Vol. 11, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020 [cited 2021 Jun 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33042054/>
 41. Barroso FAL, de Jesus LCL, de Castro CP, Batista VL, Ferreira Ê, Fernandes RS, et al. Article intake of lactobacillus delbrueckii (Pexu:Hsp65) prevents the inflammation and the disorganization of the intestinal mucosa in a mouse model of mucositis. *Microorganisms* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Jun 17];9(1):1–27. Available from: [/pmc/articles/PMC7824804/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33042054/)
 42. Quaresma M, Damasceno S, Monteiro C, Lima F, Mendes T, Lima M, et al. Probiotic mixture containing *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Nutr Cancer*. 2020;72(8):1355–65.

43. Abbasi A, Ghasempour Z, Sabahi S, Kafil HS, Hasannezhad P, Rahbar Saadat Y, et al. The biological activities of postbiotics in gastrointestinal disorders [Internet]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Bellwether Publishing, Ltd.; 2021 [cited 2021 Jun 9]. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2021.1895061>
44. Wegh CAM, Geerlings SY, Knol J, Roeselers G, Belzer C. Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond [Internet]. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019 [cited 2021 Jun 9]. p. 4673. Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
45. Aguilar-Toalá JE, Garcia-Varela R, Garcia HS, Mata-Haro V, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B, et al. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. Vol. 75, *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 105–14.
46. Cuevas-González PF, Liceaga AM, Aguilar-Toalá JE. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. Vol. 136, *Food Research International*. Elsevier Ltd; 2020. p. 109502.
47. Chuah LO, Foo HL, Loh TC, Mohammed Alitheen NB, Yeap SK, Abdul Mutalib NE, et al. Postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* strains exert selective cytotoxicity effects on cancer cells. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2019 Jun 3 [cited 2021 Jun 11];19(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31159791/>
48. Gao J, Li Y, Wan Y, Hu T, Liu L, Yang S, et al. A novel postbiotic from *Lactobacillus rhamnosus* GG with a beneficial effect on intestinal barrier function. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jun 11];10(MAR). Available from: [/pmc/articles/PMC6426789/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31159791/)
49. Iraporda C, Romanin DE, Bengoa AA, Errea AJ, Cayet D, Foligné B, et al. Local treatment with lactate prevents intestinal inflammation in the TNBS-induced colitis model. *Front Immunol* [Internet]. 2016 [cited 2021 Jun 15];7(DEC). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28082985/>
50. Picó-Monllor JA, Mingot-Ascencao JM. Search and selection of probiotics that improve mucositis symptoms in oncologic patients. A systematic review [Internet]. Vol. 11, *Nutrients*. MDPI AG; 2019 [cited 2021 Jun 3]. Available from: [/pmc/articles/PMC6835542/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28082985/)
51. Galdino FMP, Andrade MER, Barros PAV de, Generoso S de V, Alvarez-Leite JI, Almeida-Leite CM de, et al. Pretreatment and treatment with fructo-oligosaccharides attenuate intestinal mucositis induced by 5-FU in mice. *J Funct Foods*. 2018 Oct 1;49:485–92.
52. Antunes MM, Leocádio PCL, Teixeira LG, Leonel AJ, Cara DC, Menezes GB, et al. Pretreatment with L-Citrulline Positively Affects the Mucosal Architecture and Permeability of the Small Intestine in a Murine Mucositis Model. *J Parenter Enter Nutr* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2021 Jun 3];40(2):279–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25573703/>
53. Chang CW, Liu CY, Lee HC, Huang YH, Li LH, Chiau JSC, et al. *Lactobacillus casei* Variety *rhamnosus* probiotic preventively attenuates 5-Fluorouracil/Oxaliplatin-induced intestinal injury

- in a syngeneic colorectal cancer model. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 May 15 [cited 2021 Jun 9];9(MAY). Available from: [/pmc/articles/PMC5962742/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31562742/)
54. Prisciandaro LD, Geier MS, Butler RN, Cummins AG, Howarth GS. Probiotic factors partially improve parameters of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2021 Jun 17];11(7):671–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21307648/>
 55. Soares PMG, Mota JM, Gomes AS, Oliveira RB, Assreuy AMS, Brito GAC, et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2008 Dec [cited 2021 Jun 3];63(1):91–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18324404/>
 56. Qiu Y, Zhang J, Ji R, Zhou Y, Shao L, Chen D, et al. Preventative effects of selenium-enriched *Bifidobacterium longum* on irinotecan-induced small intestinal mucositis in mice. *Benef Microbes*. 2019;10(5):569–77.
 57. Andrade MER, Araújo RS, de Barros PAV, Soares ADN, Abrantes FA, Generoso S de V, et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models [Internet]. Vol. 34, *Clinical Nutrition*. Churchill Livingstone; 2015 [cited 2021 Jun 3]. p. 1080–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25660317/>
 58. González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways [Internet]. Vol. 1778, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. *Biochim Biophys Acta*; 2008 [cited 2021 Jun 16]. p. 729–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17950242/>
 59. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2000 [cited 2021 Jun 16];11(12):4131–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11102513/>
 60. Ferreira TM, Leonel AJ, Melo MA, Santos RRG, Cara DC, Cardoso VN, et al. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. *Lipids* [Internet]. 2012 Jul [cited 2021 Jun 16];47(7):669–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22648862/>
 61. Oh NS, Lee JY, Lee JM, Lee KW, Kim Y. Mulberry leaf extract fermented with *Lactobacillus acidophilus* A4 ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2021 Jun 11];64(6):459–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28378512/>
 62. Corthésy B. Role of secretory IgA in infection and maintenance of homeostasis [Internet]. Vol. 12, *Autoimmunity Reviews*. *Autoimmun Rev*; 2013 [cited 2021 Jun 15]. p. 661–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23201924/>
 63. S Kwiecień , T Brzozowski SJK. EFFECTS OF REACTIVE OXYGEN SPECIES ACTION ON

- GASTRIC MUCOSA IN VARIOUS MODELS OF MUCOSAL INJURY [Internet]. 2002 [cited 2021 Jun 17]. Available from: <http://www.jpp.krakow.pl>
64. Rtibi K, Selmi S, Grami D, Amri M, Sebai H, Marzouki L. Contribution of oxidative stress in acute intestinal mucositis induced by 5 fluorouracil (5-FU) and its pro-drug capecitabine in rats. *Toxicol Mech Methods* [Internet]. 2018 May 4 [cited 2021 Jun 25];28(4):262–7. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15376516.2017.1402976>
 65. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids [Internet]. Vol. 3, *Nutrients*. MDPI AG; 2011 [cited 2021 Jun 17]. p. 858–76. Available from: </pmc/articles/PMC3257741/>
 66. Belenguer A, Duncan SH, Holtrop G, Anderson SE, Lobley GE, Flint HJ. Impact of pH on lactate formation and utilization by human fecal microbial communities. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2007 Oct [cited 2021 Jun 3];73(20):6526–33. Available from: </pmc/articles/PMC2075063/>
 67. Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. In: *Proceedings of the Nutrition Society* [Internet]. Cambridge University Press; 2014 [cited 2021 Jun 5]. p. 13–22. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/proceedings-of-the-nutrition-society/article/links-between-diet-gut-microbiota-composition-and-gut-metabolism/3EC628D5D5F59D6E9F800E18AC1485D6>
 68. Engels C, Ruscheweyh HJ, Beerenwinkel N, Lacroix C, Schwab C. The common gut microbe *Eubacterium hallii* also contributes to intestinal propionate formation. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cited 2021 Jun 25];7(MAY). Available from: </pmc/articles/PMC4871866/>
 69. Pham VT, Lacroix C, Braegger CP, Chassard C. Lactate-utilizing community is associated with gut microbiota dysbiosis in colicky infants. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–13.
 70. Wang SP, Rubio LA, Duncan SH, Donachie GE, Holtrop G, Lo G, et al. Pivotal Roles for pH, Lactate, and Lactate-Utilizing Bacteria in the Stability of a Human Colonic Microbial Ecosystem. *mSystems*. 2020 Oct 27;5(5).

Figure 1. Weight variation of animals before and after induction of mucositis (A) Daily food consumption of animals in the three days after induction of mucositis (B). Data expressed as mean \pm SEM (n=6). Different letters indicate statistical differences (p<0.05; One-Way ANOVA and Neuman-Keuls post-test for multiple comparisons). CTL= Control; CTL 10= Control + 10mM Lactate; CTL 100= Control + Lactate 100mM; CTL 200= Control + 200mM Lactate; MUC= Mucositis; MUC 10 = Mucositis + 10mM Lactate; MUC 100 = Mucosite + Lactate 100mM and MUC 200 = Mucosite + Lactate 200mM

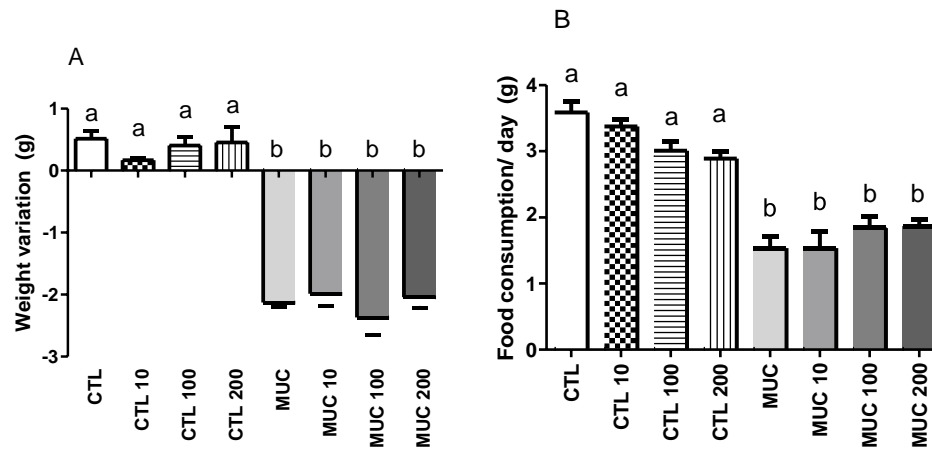


Figure 2. Small Intestine length 72 hours after mucositis induction. Data expressed as mean \pm SEM (n=6). Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$; one-way ANOVA and Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= Control; MUC= Mucositis; MUC 10 = Mucositis + 1mM Lactate; MUC 100 = Mucosite + Lactate 100mM and MUC 200 = Mucosite + Lactate 200mM.

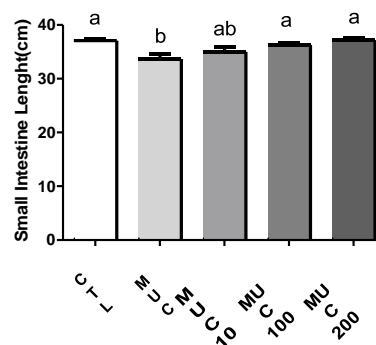


Figure 3. Intestinal permeability 72 hours after mucositis induction. Values represent % ^{99m}Tc -DTPA dose per gram of blood. Data expressed as mean \pm SEM (n=6). Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$; One-Way ANOVA and Neuman-Keuls post-test for multiple comparisons). CTL= Control; MUC= Mucositis; MUC 10 = Mucositis + 1mM Lactate; MUC 100 = Mucositis + Lactate 100mM and MUC 200 = Mucositis + Lactate 200mM

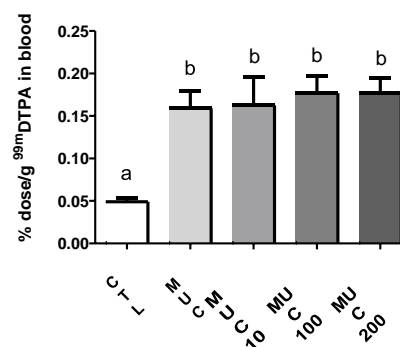


Figure 4. Histological analysis of the ileum 72 hours after mucositis induction. Histological sections with HE staining at 20x and 40x magnification Normal aspects for the CTL (A), CTL10 (B), CTL 100 (C) and CTL 200 (D) groups. CTL= Control; CTL 10= Control + 10mM Lactate; CTL 100= Control + Lactate 100mM; CTL 200= Control + Lactate 200mM

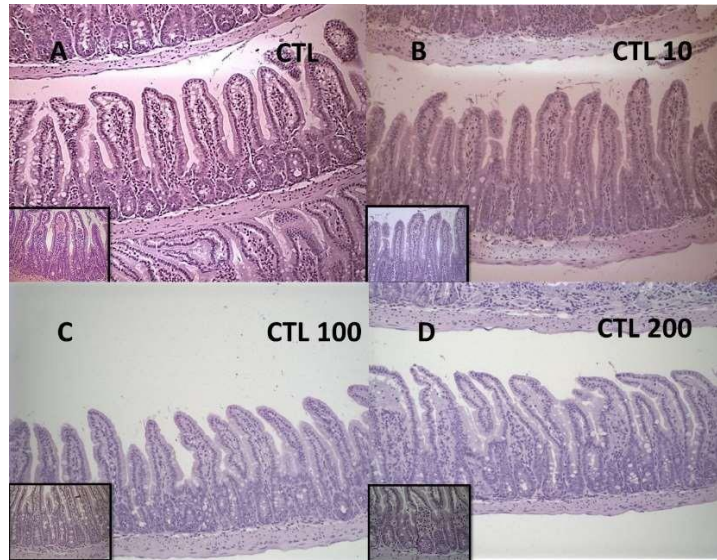


Figure 5. Histological analysis of the ileum 72 hours after mucositis induction. Histological sections with HE staining at 20x and 40x magnification. Shortened villi (arrows), infiltration of inflammatory cells (asterisks) is present in the MUC (10B) and MUC 10 (10C) groups. MUC 10 also has crypt necrosis (square). Partial preservation due to improved epithelial integrity and reduced inflammatory infiltrate is observed in the MUC 100 and MUC 200 groups (D and E). CTL= Control; MUC= Mucositis; MUC 10 = Mucositis + 1mM Lactate; MUC 100 = Mucositis + Lactate 100mM and MUC 200 = Mucositis + Lactate 200mM.

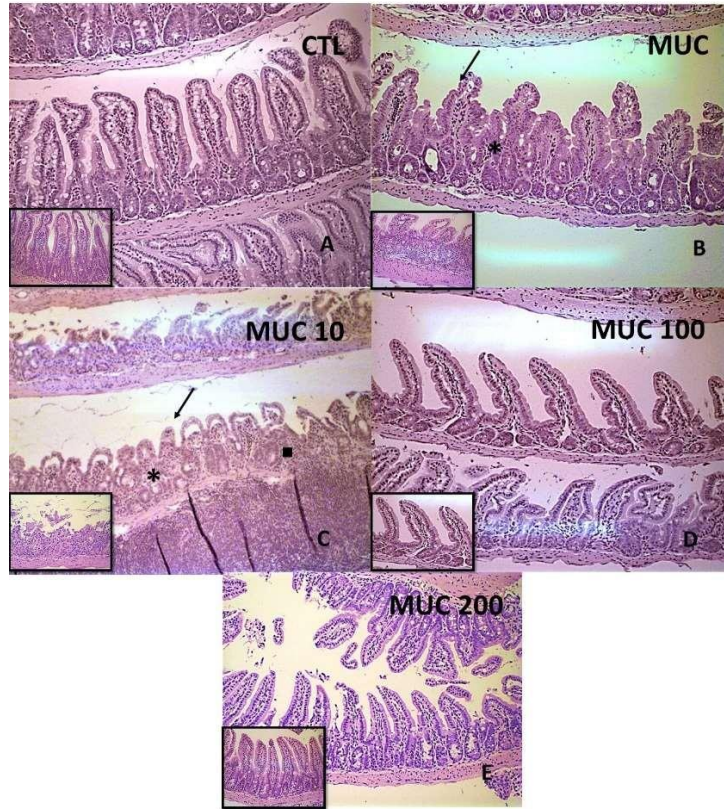


Figure 6. Histological score of the ileum 72 hours after mucositis induction. Data expressed as mean \pm SEM (n=6). Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$; one-way ANOVA and Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= Control; CTL 10= Control + 10mM Lactate; CTL 100= Control + Lactate 100mM; CTL 200= Control + 200mM Lactate; MUC= Mucositis; MUC 10 = Mucositis + 10mM Lactate; MUC 100 = Mucositis + Lactate 100mM and MUC 200 = Mucositis + Lactate 200mM

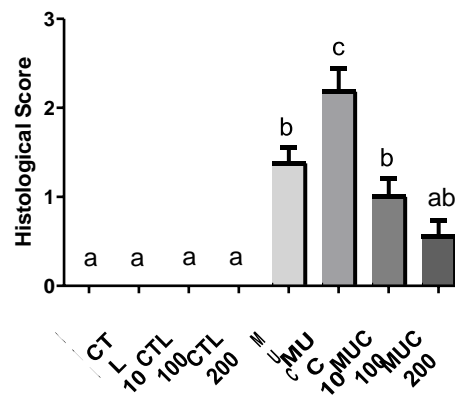


Figure 7. Morphometric analysis. of the ileum 72 hours after mucositis induction. Villus Height (A), Crypt Depth (B) and Villus/Crypts Ratio (C). Data expressed in mean referring to eight measurements per animal \pm SEM (n=6). Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$;) Kruskal-Wallis test of variance, Dunns post-test. CTL= Control; CTL 10= Control + 10mM Lactate; CTL 100= Control + Lactate 100mM;

CTL 200= Control + Lactate 200mM ;MUC= Mucositis; MUC 10 = Mucositis + 1mM Lactate; MUC 100 = Mucositis + Lactate 100mM and MUC 200 = Mucositis + Lactate 200mM.

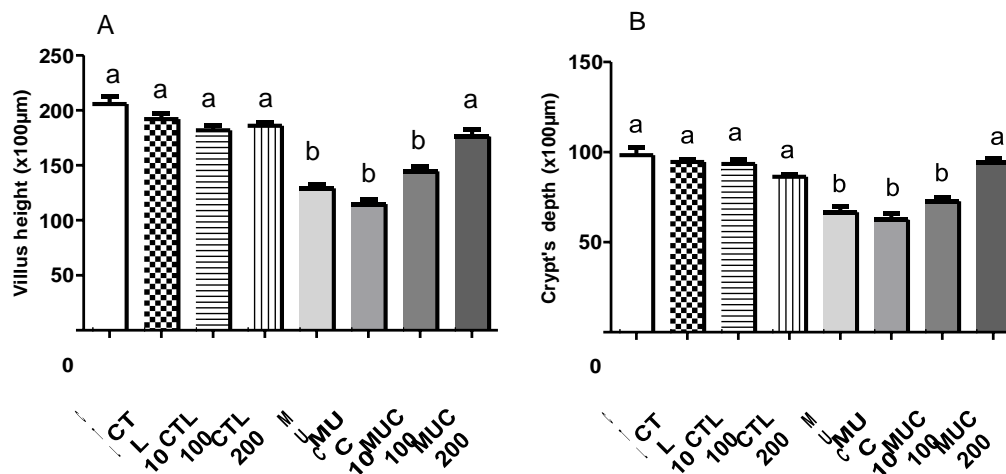


Figure 8. Gene expression by Real Time PCR of tight junctions proteins – ZO-1 (A) Occludine (B)- 72 hours after mucositis induction. Values represent the mean mRNA expression of ZO-1 \pm SEM (n=6). Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$; one-way ANOVA and Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= Control; MUC= Mucositis; MUC 10 = Mucositis + 1mM Lactate; MUC 100 = Mucositis + Lactate 100mM and MUC 200 = Mucositis + Lactate 200mM

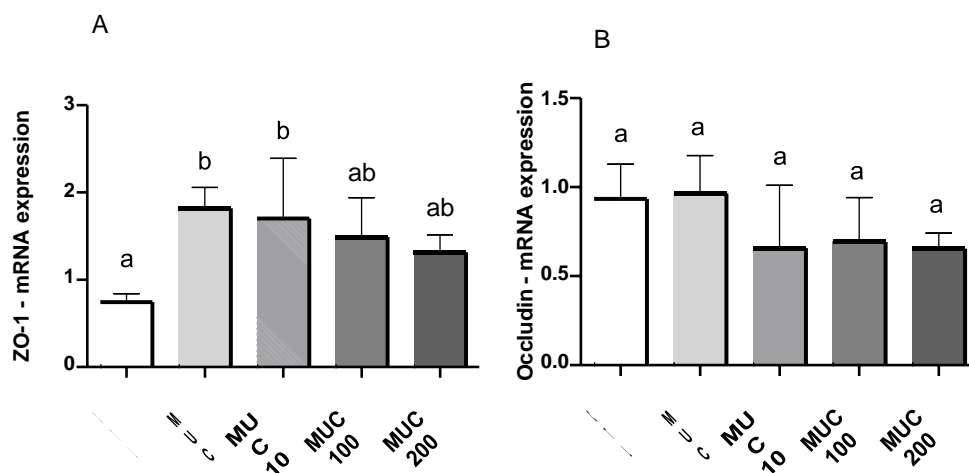


Figure 9. Analysis of mucus secretion. Data expressed as mean \pm SEM (n=6). Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$; one-way ANOVA and Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= Control; CTL 10= Control + 10mM Lactate; CTL 100= Control + Lactate 100mM; CTL 200= Control + Lactate 200mM ;MUC= Mucositis; MUC 10 = Mucositis + 1mM Lactate; MUC 100 = Mucositis + Lactate 100mM and MUC 200 = Mucositis + Lactate 200mM

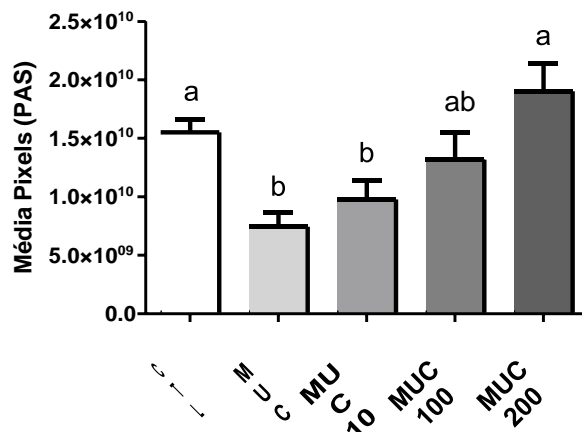


Figure 10. Evaluation of MPO and EPO enzyme concentration in the ileum of animals 72h after mucositis induction. Data expressed as mean \pm SEM (n=6). Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$; one-way ANOVA and Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= Control; MUC= Mucositis; MUC 10 = Mucositis + 1mM Lactate; MUC 100 = Mucositis + Lactate 100mM and MUC 200 = Mucositis + Lactate 200mM.

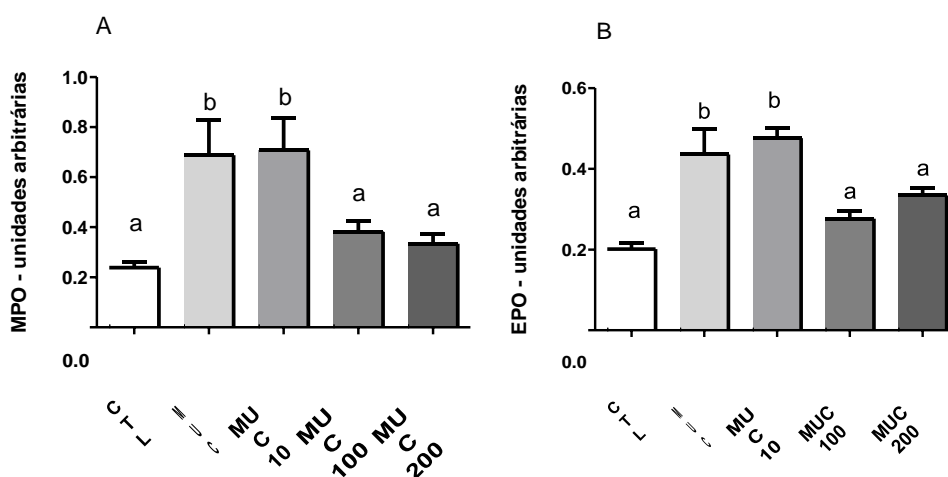
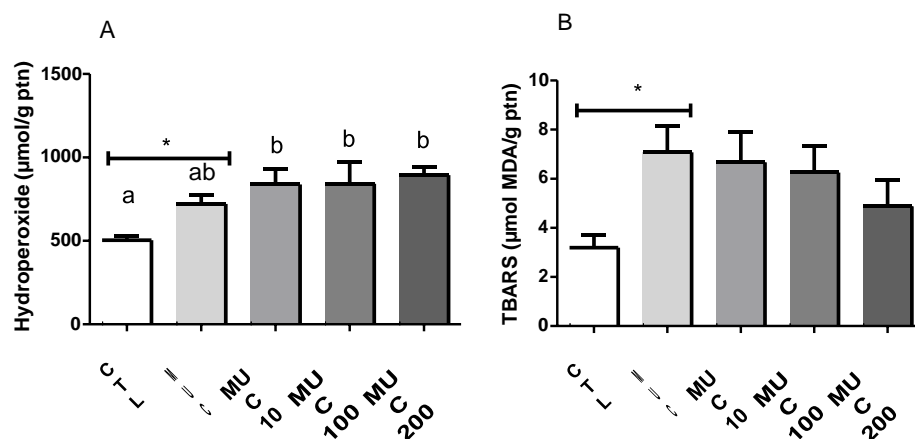


Figure 11. Oxidative stress in the ileum of animals 72 hours after mucositis induction. Data expressed as mean \pm SEM (n=6). Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$; one-way ANOVA and Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= Control; MUC= Mucositis; MUC 10 = Mucositis + 1mM Lactate; MUC 100 = Mucosite + Lactate 100mM and MUC 200 = Mucosite + Lactate 200mM



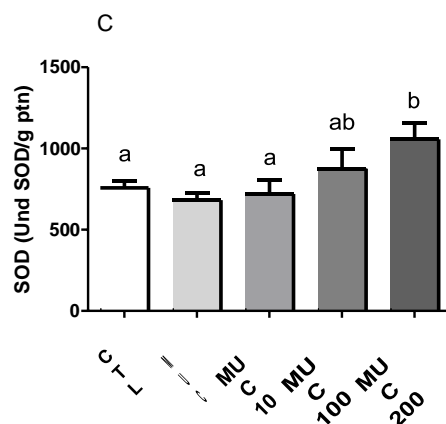
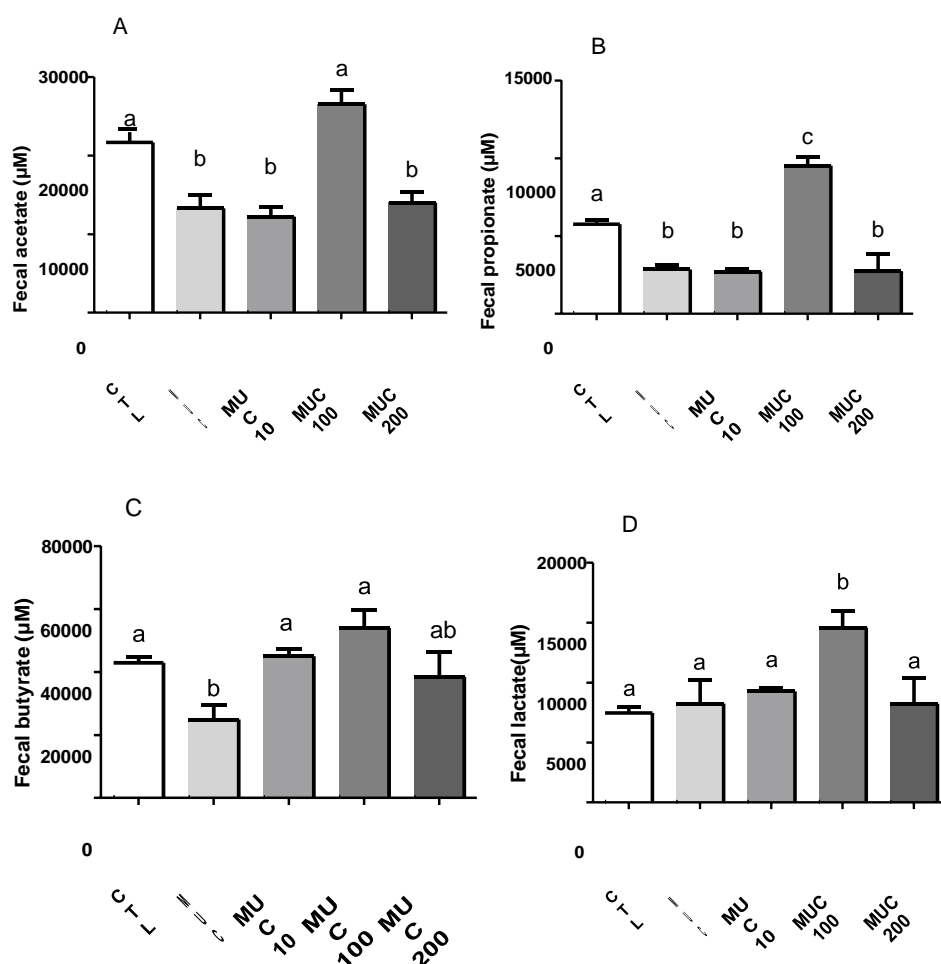


Figure 12. Dosage of short-chain fatty acids and short lactate in the feces of animals 72h after mucositis induction. Acetate (A), propionate (B) and butyrate (C) and lactate (D). Data expressed as mean \pm SEM (n=6) Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$; one-way ANOVA and Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL = Control; MUC = Mucositis; MUC 10 = Mucositis + Lactate 1mM; MUC 100 = Mucositis + Lactate 100mM and MUC 200 = Mucositis + Lactate 200mM





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E SAÚDE

ATA DE NÚMERO 71 (SETENTA E UM) DA SESSÃO DE ARGUIÇÃO E DEFESA DA DISSERTAÇÃO APRESENTADA PELA CANDIDATA ISABEL DAVID DE MATOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM NUTRIÇÃO E SAÚDE.

Aos 04 (quatro) dias do mês de agosto de dois mil e vinte e um, às 14:00 horas, realizou-se por videoconferência, a sessão pública para apresentação e defesa da dissertação "EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE LACTATO EM MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL", da aluna **Isabel David de Matos**, candidata ao título de "Mestre em Nutrição e Saúde", linha de pesquisa "Nutrição Clínica e Experimental". A Comissão Examinadora foi constituída pelos professores doutores Simone de Vasconcelos Generoso, Valbert Nascimento Cardoso, Tatiani Uceli Maioli e Marco Aurélio Ramirez Vinolo, sob a presidência da primeira. Abrindo a sessão, a Senhora Presidente da Comissão, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata, para julgamento e expedição do seguinte resultado final:

- APROVADO;
 APROVADO COM AS MODIFICAÇÕES CONTIDAS NA FOLHA EM ANEXO;
 REPROVADO.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Senhora Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, eu, Mateus Gomes Pedrosa, Secretário do Colegiado de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada será assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 04 de agosto de 2021.

Prof^a. Dr^a. Simone de Vasconcelos Generoso
Orientadora (UFMG)

Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso
Coorientador (UFMG)

Prof^a. Dr^a. Tatiani Uceli Maioli
Membro Titular (UFMG)

Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo

Membro Titular (UNICAMP)

Mateus Gomes Pedrosa

Secretário do Colegiado de Pós-Graduação



Documento assinado eletronicamente por **Simone de Vasconcelos Generoso, Subcoordenador(a)**, em 05/08/2021, às 14:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Valbert Nascimento Cardoso, Professor do Magistério Superior**, em 05/08/2021, às 16:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Tatiani Uceli Maioli, Professora do Magistério Superior**, em 09/08/2021, às 15:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Marco Aurélio Ramirez Vinolo, Usuário Externo**, em 13/08/2021, às 13:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Mateus Gomes Pedrosa, Assistente em Administração**, em 13/08/2021, às 14:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0875931** e o código CRC **280D7032**.