

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – SAÚDE DA
CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

JOHNATAN CAETANO BRAZ

EFEITO DO TRATAMENTO COM *Lactobacillus gasseri* NA MUCOSITE
INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM MODELO EXPERIMENTAL
MURINO

Belo Horizonte

2019

JOHNATAN CAETANO BRAZ

**EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM *Lactobacillus gasseri* NA
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM MODELO
EXPERIMENTAL MURINO**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos
Martins

Belo Horizonte

2019

Braz, Johnatan Caetano.

B827e Efeito do tratamento com *Lactobacillus gasseri* na Mucosite Intestinal induzida por Irinotecano em Modelo Experimental Murino [manuscrito]. / Johnatan Caetano Braz. - - Belo Horizonte: 2021. 56f.: il.

Orientador (a): Flaviano dos Santos Martins.

Área de concentração: Ciências da Saúde da Criança e do Adolescente.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Probióticos. 2. *Lactobacillus gasseri*. 3. Mucosite. 4. Irinotecano. 5. Inflamação. 6. Dissertação Acadêmica. I. Martins, Flaviano dos Santos. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QW 142.5.A8

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

IA DO ALUNO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

**EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM O LACTOBACILLUS GASSERI
NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM MODELO
EXPERIMENTAL**

JOHNATAN CAETANO BRAZ

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Ciências da Saúde.

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

Prof. Flaviano dos Santos Martins - Orientador

UFMG

Prof.ª Simone de Vasconcelos Generoso

UFMG

Prof.ª Éricka Lorenna de Sales Souza e Melo

FCV

Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho não só a todos os animais envolvidos no processo de pesquisa, como também aos meus amigos e familiares que me auxiliaram e incentivaram. A todos vocês o meu muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer aos meus pais, Joaquim e Hilda, e também minhas irmãs, Daniela e Alline, pelo carinho e atenção a mim cedidos a todo instante. Agradeço também aos meus queridos sobrinhos Gabriel, Maria Eduarda e Manuela, que a cada dia me encantam mais e me ensinam a arte de ser tio coruja e babão.

Obrigado meu Anjo da Guarda e meus Guias Espirituais pela presença constante.

Obrigado aos meus amigos e familiares, em especial à Jacqueline Pereira, por estarem sempre presentes, assim como meu namorado, Denis, pela paciência durante estes dois anos.

O meu muito obrigado ao meu orientador, Prof. Dr. Flaviano Martins, pela paciência e orientação, como também à Profa. Dra. Elisabeth Neumann pela oportunidade da prática na docência. Foi muito bom!

Um obrigado muito, mas muito especial a toda equipe do LABio e LEFM, tanto aos que estão presentes como aqueles que já seguiram seus caminhos, pelos excelentes momentos.

Não poderia deixar de agradecer imensamente à Mônica Quintanilha pela ajuda na leitura deste trabalho, e também à Karen Costa, Gabriele Moreira, Vívian Miranda, Indianara Machado e Rodrigo Mourão pelos treinamentos, conversas, discussões de artigos, signos, horóscopos e dietas nos intervalos dos experimentos.

Obrigado à UFMG e à Faculdade de Medicina pela oportunidade, e também à CAPES pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos vocês o meu muito obrigado!

*“Só veem as belezas do mundo aqueles
que têm beleza dentro de si.”*

Rubem Alves

RESUMO

O Cloridrato de irinotecano (CPT-11) é uma droga antimetabólica muito utilizada na terapia de diversos tipos de cânceres, inibindo a síntese de DNA e suprimindo a proliferação de células tumorais. No entanto, células saudáveis com alta taxa de divisão celular, como as células da mucosa do trato gastrointestinal (TGI), também são afetadas. Essa inflamação da mucosa do TGI é denominada mucosite. A mucosite é caracterizada por uma inflamação na mucosa do TGI considerada um efeito colateral do tratamento oncológico. Os probióticos são utilizados para reestabelecer a microbiota intestinal, diminuir o processo inflamatório e os efeitos colaterais oriundos de distúrbios gastrointestinais. O objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito do uso de *Lactobacillus gasseri* (LG) na mucosite intestinal induzida por CPT-11 em modelo animal murino. Os animais foram divididos em: controle (CTL), controle LG (LG), controle mucosite (Muc) e mucosite tratado com LG (LG+Muc). Por 15 dias 40 camundongos Balb/c, fêmeas, receberam tratamento, por gavagem, tanto de LG quanto de PBS em seus respectivos grupos. A indução de mucosite ocorreu por 3 dias consecutivos a partir do 10º dia de experimento em que os animais receberam CPT-11 ou PBS, por via intraperitoneal, em seus respectivos grupos. O peso dos animais foi avaliado a partir do 10º dia e, no 15º dia, os animais foram eutanasiados para análise de sIgA, permeabilidade intestinal, histologia, EPO e MPO. Após indução da mucosite foi observado no grupo Muc: perda de peso e diminuição do consumo alimentar, aumento da permeabilidade intestinal, e danos histológicos característicos da mucosite, aumento das enzimas MPO e EPO, como indicativos do influxo de neutrófilos e eosinófilos, respectivamente, e diminuição dos níveis de sIgA. O tratamento com LG no grupo (LG+Muc) não foi capaz de amenizar os danos causados pelo tratamento quimioterápico. Na análise de microbiota intestinal o número de enterobactérias foi maior no grupo LG+Muc quando comparado aos demais. O uso preventivo do LG na mucosite intestinal induzida por irinotecano não foi capaz de reverter os efeitos colaterais oriundos do tratamento quimioterápico.

Palavras-chaves: probiótico, *Lactobacillus gasseri*, mucosite, irinotecano, inflamação intestinal.

ABSTRACT

Irinotecan Hydrochloride (CPT-11) is an antimetabolic drug widely used in the therapy of several types of cancer, inhibiting DNA synthesis and suppressing the proliferation of tumor cells. However, healthy cells with a high rate of cell division, such as cells from the gastrointestinal tract (GIT) mucosa, are also affected. This inflammation of the mucosa of the GIT is called mucositis. Mucositis is an inflammation of the gastrointestinal tract mucosa that is considered a side effect of cancer treatment. Probiotics are used to reestablish the intestinal microbiota, decrease the inflammatory process and side effects from gastrointestinal disorders. The aim of our work was to evaluate the effect of using *Lactobacillus gasseri* (LG) on intestinal mucositis induced by irinotecan in a murine animal model. The animals were divided into control (CTL), LG control (LG), mucositis control (Muc) and mucositis treated with LG (LG+Muc). For 15 days, 40 female Balb/c mice received treatment by gavage, both LG and PBS in their respective groups. The induction of mucositis occurred for 3 consecutive days from the 10th day of the experiment in which the animals received irinotecan or PBS, intraperitoneally, in their respective groups. The weight of the animals was evaluated from the 10th day and on the 15th day the animals were euthanized for analysis of sIgA, intestinal permeability, histology, EPO and MPO. After mucositis induction, the following was observed in the Muc group: weight loss and decreased food consumption, increased intestinal permeability, as well as histological damage characteristic of mucositis, increased MPO and EPO enzymes, as indicative of the influx of neutrophils and eosinophils, respectively, and decrease in sIgA levels. Treatment with LG (LG+Muc group) was not able to mitigate the damage caused by chemotherapy. In the analysis of intestinal microbiota, the number of enterobacteria was higher in the LG+Muc group when compared to the others. Preventive use of LG in irinotecan-induced intestinal mucositis has not been able to reverse side effects from chemotherapy.

Keywords: probiotic, *Lactobacillus gasseri*, mucositis, irinotecan, intestinal inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

Figura 1. Estrutura química e física da barreira intestinal.....	17
Figura 2. Transporte celular com barreira intestinal em condições normais e durante a injúria.....	20
Figura 3. Estímulo de produção de IgA por contato com SBF no epitélio intestinal via IL-21.....	23
Figura 4. Avaliação do consumo de ração.....	38
Figura 5. Variação do peso.....	39
Figura 6. Permeabilidade intestinal 120h após indução de mucosite.....	40
Figura 7. Dosagem de sIgA intestinal.....	42
Figura 8. Escore histológicos.....	43
Figura 9. Análise histológica do jejuno e íleo.....	44
Figura 10. Infiltrado de eosinófilo (EPO).....	46
Figura 11. Infiltrado de neutrófilos (MPO).....	47
Figura 12. Avaliação de Enterobactérias (A) e Bactérias Ácido Láticas (B).....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{99m} TC	Tecnécio-99m
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
5-FU	5-Fluorouracil
AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
ANOVA	Análise de variância
BAL	Bactérias do Ácido Lático
CD	Células dendríticas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CPT-11	Cloridrato de irinotecano
CTL	Controle
DII	Doença inflamatória intestinal
DM	Diabetes Mellitus
DTPA	Ácido dietilenoaminopentacético
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPO	Peroxidase eosinofílica
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FOS	Fruto-oligossacarídeo
GALT	Tecido linfoide associado ao intestino
GLP	Peptídeo associado ao glucagon
GOS	Galacto-oligossacarídeo
GSH	Glutathione
H.E	Hematoxilina e eosina
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
i.p	Intraperitoneal
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina do tipo A
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon gama
LG	<i>Lactobacillus gasseri</i>
LG+Muc	Grupo suplementado com LG e mucosite induzida

LP	Lâmina própria
LPS	Lipopolissacarídeo
MALT	Tecido linfoide associado ao mesentério
MPO	Mieloperoxidase
MRS	De Man, Rogosa & Sharpe
Muc	Mucosite
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Células natural killer
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade óptica
OPD	orto-fenilenodiamina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial de hidrogênio
PI	Permeabilidade intestinal
PP	Placas de Peyer
QT	Quimioterapia
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TB	Translocação bacteriana
TGI	Trato gastrointestinal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Componentes da barreira intestinal.....	17
2.2 Microbiota intestinal e sistema imune.....	20
2.3 Tratamento oncológico.....	23
2.4 Cloridrato de Irinotecano (CPT-11).....	24
2.5 Mucosite.....	25
2.6 Probióticos.....	27
2.6.1 <i>Lactobacillus gasseri</i>	28
3 JUSTIFICATIVA	30
4 OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivos específico.....	31
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
5.1 Micro-organismo.....	32
5.2 Animais.....	32
5.3 Delineamento experimental.....	32
5.4 Indução de mucosite.....	33
5.5 Avaliação clínica dos animais e consumo de ração.....	33
5.6 Determinação da permeabilidade intestinal.....	33
5.7 Avaliação de Enterobactérias e BAL pelo método dependente de cultivo..	34
5.8 Análises histopatológicas.....	34
5.8.1 Coloração HE.....	35
5.8.2 Análise de lâminas e fotodocumentação.....	35
5.9 Avaliação dos parâmetros imunológicos.....	35
5.9.1 Medida de atividade de MPO.....	35
5.9.2 Medida de atividade de EPO.....	36
5.9.3 Dosagem de sIgA.....	37
5.10 Análise estatística.....	37
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
6.1 Consumo de ração e perda de peso.....	38
6.2 Avaliação da permeabilidade intestinal.....	40
6.3 Avaliação dos níveis de sIgA.....	41

6.4 Escore histológico e análise histológica.....	42
6.5 Avaliação do infiltrado inflamatório.....	45
7 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXO 1.....	55

1. INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI) é constituído pela cavidade oral, faringe e tubo digestivo que inclui esôfago, estômago, intestino delgado, cólon e reto. Sua constituição celular se dá por células epiteliais e de mucosa (GARTNER; HIATT, 2007). Junto dos órgãos anexos (fígado, pâncreas e vesícula biliar) desempenha funções como: digestão, absorção de nutrientes, produção de hormônios reguladores e atividade imune contra agentes nocivos (SOUTHCOTT et al., 2008). O TGI possui alta capacidade de renovação celular (*turnover*) que pode ser comprometida durante o tratamento com radio- e quimioterápicos. Devido a essa alta taxa de replicação celular da mucosa intestinal, esse órgão é um dos mais acometidos durante o tratamento quimioterápico, gerando, dentre outros problemas, a mucosite (PEDROSO et al., 2015).

A mucosite está associada ao uso de drogas citotóxicas no tratamento de doenças, como o câncer, e se caracteriza por lesões inflamatórias que podem ou não levar à formação de úlceras. Acomete todo o TGI, ou seja, da cavidade oral até o ânus. Na cavidade oral há comprometimento que dificulta a deglutição, com consequente desnutrição e desidratação. Outros sintomas relacionados à mucosite intestinal estão associados com náuseas, vômitos, diarreia, pirose, dor abdominal e inflamação local. Em pacientes mais debilitados faz-se necessário a intervenção hospitalar para recuperação do estado nutricional com dieta enteral ou parenteral (GIBSON et al., 2013; SONIS, 2004). Essas medidas aumentam os gastos com o tratamento da mucosite e muitas vezes levam à suspensão do tratamento oncológico (MAIOLI et al., 2014; MARIA-AGGELIKI et al., 2009; SONIS, 2004).

Dentre os principais fármacos utilizados no tratamento quimioterápico está o cloridrato de irinotecano (CPT-11). Seu mecanismo de ação envolve a inibição da enzima topoisomerase I, responsável pela transcrição e replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA). Sua ação no intestino é bem conhecida: aumento da apoptose nas criptas do jejuno e cólon, bem como perda das vilosidades intestinais. A diarreia, dentre os efeitos colaterais causados pela mucosite, aparece como o sintoma mais frequente (CHENG et al., 2018).

Atualmente não existem métodos curativos para o tratamento da mucosite, havendo somente medidas paliativas que ajudam a diminuir os sintomas com consequente melhoria da qualidade de vida dos pacientes (RATHE; SHEN; SANGILD, 2018).

Recentemente os probióticos têm sido apontados como estratégia terapêutica para tratamento da mucosite. Os probióticos podem proporcionar inúmeros benefícios ao hospedeiro por meio da modulação de microbiota intestinal, imunomodulação, prevenção de infecções, redução de alergias e atuarem contra micro-organismos patogênicos (TURRONI et al., 2011; GOLDIN 1998). As linhagens mais utilizadas como probióticos são bactérias do ácido láctico (BAL), bifidobactérias e algumas leveduras, como a *Saccharomyces boulardii* (VIEIRA et al., 2013).

Recentemente o *Lactobacillus gasseri*, pertencente ao grupo das BAL, tem sido utilizado na indústria de alimentos para, além da fermentação, promover efeito probiótico aos consumidores. Os estudos mostram que há envolvimento deste micro-organismo na prevenção da diarreia, alergias, doenças infecciosas, e também efeito anti-obesidade (CARVALHO et al., 2017; DAMECENO et al., 2017; MIYAZAWA et al., 2011)

Diante do exposto, acredita-se na importância do uso dessa bactéria como método profilático ou até mesmo como atenuador da gravidade inflamatória no tratamento da mucosite intestinal causada pelo tratamento quimioterápico.

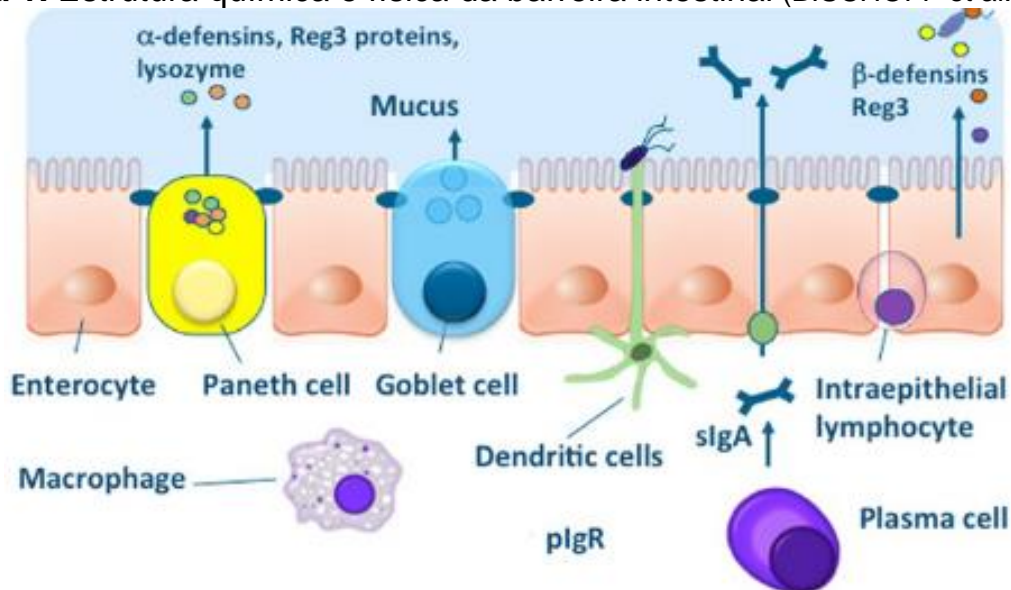
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Componentes da barreira

O TGI e seus órgãos anexos (pâncreas, fígado e vesicular biliar) estão diretamente relacionados ao processo de digestão, absorção, metabolismo como também a excreção dos resíduos da digestão. A integridade da mucosa intestinal é uma condição favorável para o bom estado de saúde do ser humano. (MARIA-AGGELIKI et al., 2009; SOUTHCOTT et al., 2008).

O intestino é composto por quatro tipos de camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. Já a barreira intestinal é formada, além das camadas de célula do intestino, por micro-organismos pertencentes à microbiota intestinal, muco e células imunes que estão aderidos à mucosa intestinal. Sendo assim, a barreira intestinal é uma estrutura complexa cuja função é separar o meio intraluminal dos micro-organismos e suas toxinas. As células epiteliais presentes no intestino, mais precisamente nas criptas de *Lieberkühn*, possuem rápida renovação celular (*turnover*), e se diferenciam em células multipotentes dando origem aos enterócitos, células enteroendócrinas, células caliciformes ou globosas e células de Paneth, como na figura 1. A produção de muco pelas células caliciformes e os componentes imunes pelas células de Paneth protegem o hospedeiro de micro-organismos e substâncias nocivas (BISCHOFF et al., 2014).

Figura 1. Estrutura química e física da barreira intestinal (BISCHOFF et al., 2014).



Outro tipo celular presente na mucosa intestinal são as células *microfold* (células M). As células M são capazes de reconhecer micro-organismos patogênicos

ou antígenos e apresentá-los ao tecido linfático associado ao intestino (GALT), via folículos linfóides (SAULS; BN; 2019).

Os enterócitos presentes no epitélio intestinal são unidos por proteínas denominadas de junção de oclusão e são constituídas pela ocludina, claudinas 1, 2 e 4 e estão localizadas nas partes subapicais e lateralmente às membranas celulares, o que faz com que uma célula fique aderida à outra (HOWARTH; WANG, 2013).

As células de Paneth são responsáveis por secretarem células imunes, como citocinas e imunoglobulinas (lisozima e fosfolipase), além de mediadores inflamatórios e peptídeos com ação antimicrobiana. Estão presentes nas criptas das células epiteliais do cólon conforme a figura 1 (ANDRADE et al., 2015; BISCHOFF et al., 2014).

O conceito de barreira intestinal e permeabilidade intestinal (PI) são usados muitas vezes como sinônimos, porém, devemos destacar que a PI é uma característica dada à barreira intestinal. Alterações no bioma como, por exemplo, o aumento no número de bactérias patogênicas em relação às benéficas – disbiose -, alteração na camada de muco e presença de danos no epitélio intestinal, são fatores que alteram o processo de PI e favorecem o desenvolvimento de doenças como doença inflamatória intestinal (DII), diarreia, *Diabetes Mellitus* (DM), obesidade, alguns tipos de câncer, neuropatologias e doenças autoimunes (GÓMEZ-GUZMÁN et al., 2015; BISCHOFF et al., 2014; HOWARTH; WANG, 2013).

A integridade da barreira intestinal é reconhecida pela capacidade do epitélio intestinal em separar as substâncias da parte intraluminal. Assim, as substâncias essenciais ao funcionamento do corpo humano serão absorvidas, via PI, e transportadas ao fígado para serem metabolizadas (ANDRADE et al., 2015).

A manutenção da integridade epitelial e homeostase entre os micro-organismos benéficos se faz através de um estilo de vida saudável que abrange uma alimentação balanceada, fatores genéticos e prática de atividade física. Além dos alimentos, busca-se a inclusão de micro-organismos com características probióticas para verificar a eficácia que estes podem ou não oferecerem ao hospedeiro.

Alguns fatores como idade, localização geográfica, estilo de vida e gênero (masculino e feminino) possuem relação direta com a diversidade da microbiota intestinal, além da colonização inicial que acontece nos primeiros dois anos de vida. O hábito alimentar é o componente mais importante nesta diversidade, pois é

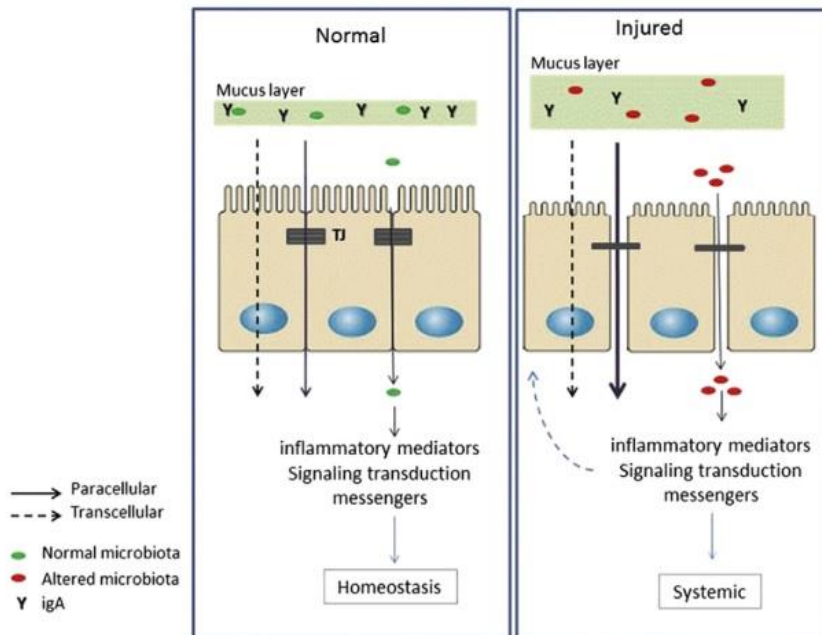
responsável pela manutenção ou modulação da microbiota simbiótica. Ainda não é bem clara a maneira pela qual os componentes da dieta alteram a composição do microbioma; entretanto, mais estudos estão sendo feitos para explicar tal processo (SUZUKI et al., 2017; BISCHOFF et al., 2014).

A simbiose é uma associação entre hospedeiro e os micro-organismos pertencentes à microbiota intestinal em que ambos são beneficiados. O hospedeiro fornece o alimento e, em troca, recebe não só a proteção contra patógenos e suas substâncias, como também compostos como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) pelo processo de fermentação. Os AGCC mais conhecidos são acetato, butirato e propionato. Possuem funções diversas, mas, em síntese, fornecem energia aos enterócitos, modulam a resposta imune, protegem contra infecções, auxiliam no metabolismo de nutrientes, entre outros (SUZUKI et al., 2017).

O transporte de nutrientes essenciais ao desenvolvimento humano por meio da barreira intestinal sofrerá alteração no sentido do fluxo quando houver mudança da pressão e gradiente osmótico, bem como eletroquímico. Aqueles nutrientes que ultrapassarem a barreira serão encaminhados para a parte intraluminal (lúmen e subepitélio) e os que são considerados hidrostáticos serão excretados no bolo fecal via movimentos peristálticos e da pressão hidrostática positiva. A direção em que são feitos estes transportes no epitélio intestinal é altamente flexível e depende tanto da osmolaridade interna no lúmen quanto da composição do bolo fecal (BISCHOFF et al., 2014).

O transporte desses nutrientes pode ser realizado de duas maneiras distintas. O transcelular, realizado com moléculas hidrofóbicas, e o paracelular, que ocorre entre as junções localizadas entre as células e que são estimuladas em contato com patógenos como mostrado na figura 2. Considera-se normal a passagem de pequenas quantidades de micro-organismos e suas endotoxinas (lipopolissacarídeos – LPS), entre as células pelo transporte paracelular, principalmente no fígado, rins e baço. Este processo é denominado translocação bacteriana (TB). Quando há ruptura da barreira intestinal tem-se aumento da PI com TB e ativação do sistema imune (SI), com produção de mediadores inflamatórios que sinalizam e ativam células imunes com desenvolvimento de processo inflamatório e sepse. (ANDRADE et al., 2015)

Figura 2. Transporte celular com barreira intestinal em condições normais e durante a injúria (ANDRADE et al., 2015).



Quando o processo de TB ocorre com micro-organismos não patogênicos estes se aderem à camada de muco e estimulam a tolerância por meio da síntese de interleucina (IL)-10 que irá diminuir a ativação de citocinas inflamatórias, como o interferon gama (INF- γ) e IL-12 (CARVALHO et al., 2017).

As causas de ruptura da barreira epitelial são multifatoriais, por exemplo: consumo de bebida alcoólica, uso de drogas, infecções por vírus, radioterapia e uso de medicamentos, como os quimioterápicos. Os antineoplásicos levarão ao desenvolvimento de danos à mucosa intestinal, pela inibição da replicação celular, com mudança na microbiota intestinal. Nesta etapa é possível desenvolver a mucosite (ANDRADE et al., 2015; BISCHOFF et al., 2014)

2.2 Microbiota intestinal e sistema imune

A microbiota intestinal é adquirida logo após o nascimento por meio do parto natural, aleitamento materno (KANG; YUN; PARK, 2010; MARÍN et al., 2009), bem como pelo parto cesáreo. No parto cesáreo o contato do bebê com o ambiente hospitalar, como também com a pele da mãe, contribui com o desenvolvimento da microbiota. Esta microbiota é formada por um conjunto de micro-organismos que vivem em homeostase no TGI e que estão em simbiose com o hospedeiro (KLAENHAMMER, 2012). Todos nós possuímos uma microbiota intestinal residente,

isto é, praticamente não altera sua composição qualitativa ao longo do tempo, assim como também existe um conjunto de micro-organismos que são transientes. Estes micro-organismos transientes estão relacionados com infecção, contaminação, etc. (VOLSTATOVA et al., 2016).

O leite materno e o processo de parto, natural ou cesáreo, são os iniciadores da microbiota intestinal em recém-nascidos. Desta forma, torna-se de grande importância o aleitamento materno exclusivo nos primeiros seis meses de vida com o intuito de prevenir doenças. Estima-se que seja possível encontrar micro-organismos na concentração de 1×10^5 UFC/mL. Entretanto, os estudos mencionam que a diversidade microbiológica presente no leite materno é baixa, porém considerável, e isso interfere diretamente na composição da microbiota do infante. O aumento na quantidade e qualidade desta colonização no TGI ocorrerá após o início da dieta complementar. As espécies variam entre: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* (MARTÍN et al., 2005).

O transporte destes micro-organismos ocorre por meio das células dendríticas (CD). Estas células atravessam o lúmen intestinal, fazem a captação dos micro-organismos e os transportam, via GALT, para os tecidos de mucosa periféricos como: genital, respiratório, salivar, lacrimal e glândula mamária, sendo a glândula mamária que terá a maior proporção dos micro-organismos transportados (MARTÍN et al., 2005).

No cólon de um indivíduo adulto estão presentes mais de 400 espécies diferentes de micro-organismos incluindo *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, entre outros, que são essenciais no metabolismo de vitaminas (K e do complexo B), proteínas e demais componentes metabólicos (MARIA-AGGELIKI et al., 2009). Estes micro-organismos pertencentes à microbiota intestinal além de promoverem proteção à barreira epitelial, desenvolvem componentes pertencentes ao sistema imunológico, produzem e secretam mucina por meio da interação feita com as células caliciformes (YAN et al., 2007), interferem na diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante o processo inflamatório (ABDULLAH; IDRIS; SAPARON, 2017), Induzem também apoptose por meio da produção do fator de necrose tumoral (TNF) (DI LUCCIA et al., 2013).

A produção de componentes imunológicos que são estimulados por probióticos atuam na diminuição da ativação do sistema imune com redução do processo

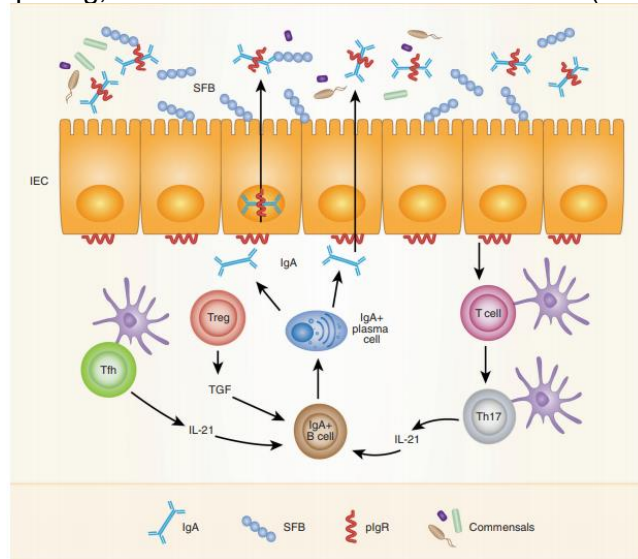
inflamatório através da estimulação das proteínas transmembranas conhecidas como receptores *toll-like* (TLR). Ao serem estimuladas estes TLR reconhecem diferentes estruturas dos micro-organismos e ativam células imunes inatas do hospedeiro com a produção de peptídeos antimicrobianos, defensinas, que atuam na morte celular por meio da lise (AMIT-ROMACH et al., 2009). Os TLR estimulados pela microbiota atuam na ativação de CD e macrófagos com consequente produção de IFN do tipo 1 pelos leucócitos, que irão arquitetar e liberar diversos mediadores – citocinas - contra o agente invasor (WEISS et al., 2011). Desta forma, as CD possuem a capacidade de distinguir os micro-organismos quanto à presença ou não de sua patogenicidade por meio do reconhecimento de proteínas presentes em suas células e, assim, estabelecem uma resposta imunológica com intensidade específica (HOWARTH; WANG, 2013).

WEISS et al. (2011) destacam que micro-organismos pertencentes à espécie de *Lactobacillus acidophilus* induziram um aumento na produção de IFN, via CD, com ativação de resposta *the helper* 1 (Th1) e expressão de genes que estimularam a produção de IFN- γ , bem como demais citocinas envolvidas na resposta imune inata contra antígenos.

O tecido linfoide associado ao mesentério (MALT) está localizado ao longo do TGI e possui influência direta na composição da microbiota intestinal. Sendo assim, a homeostase entre os micro-organismos no TGI é que determinará a ativação ou não dos linfócitos B com diferenciação da cadeia pesada da IgA (LYCKE; BEMARK, 2017).

Dentre as várias linhagens de micro-organismos não habitantes do TGI as bactérias filamentosas (*Mucispirillum*) são mais efetivas em auxiliar o epitélio intestinal a sintetizar IgA. Esta imunoglobulina terá sua síntese aumentada por meio do estímulo às placas de Peyer (PP). Os mecanismos não estão bem elucidados, porém, sabe-se que células Th17 participam da ativação de vias de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-17, 21 e 22) e que a produção de IgA decorre tanto de células B como células T *helper* que se diferenciam em IL-21, conforme a figura 3 (CONG; LI, 2018).

Figura 3. Estímulo de produção de IgA por contato com SBF no epitélio intestinal via IL-21. (IgA = imunoglobulina do tipo A; SBF = bactérias filamentosas; pIgR = ligação polimérica ao receptor Ig; commensals = bactérias comensais (CONG; LI, 2018).



2.3 Tratamento oncológico

Além do processo cirúrgico, tanto a quimio quanto a radioterapia são procedimentos utilizados no tratamento oncológico. A radioterapia é um dos tipos de tratamentos oferecidos a pacientes oncológicos e, seja isolada ou em associação a quimioterapia, desempenha uma relação positiva no tratamento do câncer, em especial na região pélvica (retal, urológico e ginecológico). A diarreia é um dos efeitos colaterais, e tanto a intensidade quanto a dosagem e fração de radiação recebida são fatores determinantes na durabilidade devido às alterações celulares. Estima-se que aproximadamente 70% dos pacientes em tratamento de câncer pélvico terão algum processo inflamatório na porção entre íleo e cólon e, 50% destes irão desenvolver algum tipo de inflamação crônica nesta mesma região (MARIA-AGGELIKI et al., 2009).

O processo quimio/radioterápico gera uma inflamação no tecido alvo com a formação de danos vasculares e infiltrado de leucócitos, atrofia da superfície epitelial e formação de abscessos. O dano na mucosa intestinal não é uni causal, mas, sim, a relação de um conjunto de fatores como: apoptose (morte celular para estabelecer a homeostase entre síntese e degradação), alteração da microbiota intestinal e do tecido conjuntivo devido à dificuldade de regeneração epitelial. A alteração na microbiota intestinal prejudica a motilidade em decorrência da proliferação exacerbada

de enterobactérias. Desta maneira, ocorre um aumento da PI em função da injúria causada no epitélio com conseqüente TB (MARIA-AGGELIKI et al., 2009).

2.4 Cloridrato de Irinotecano (CPT-11)

Cloridrato de irinotecano, mais conhecido como Irinotecano, ou CPT-11, é um derivado do composto camptotecina, solúvel em água e muito utilizado em tratamento oncológico. A camptotecina foi inicialmente isolada em 1966 por Wall e Wani, a partir da casca da árvore *Camptotheca acuminata*, que era denominada de árvore feliz chinesa, durante uma investigação de várias espécies de plantas para isolamento de novos esteroides. Na época a medicina tradicional chinesa a utilizava como um remédio natural contra o câncer, fato que foi constatado futuramente por testes em modelos murinos de leucemia (MARTINO et al., 2017; WALL et al., 1966).

O mecanismo de ação antitumoral do irinotecano ocorre devido à sua capacidade de inibir a replicação do DNA pela inativação da enzima topoisomerase I, por meio de sua fórmula metabolicamente ativa e tóxica, 7-etil-10-hidroxycamptotecina (SN-38). Esta enzima é responsável pela quebra reversível de partes da fita de DNA para que ocorra o relaxamento da molécula com conseqüente transcrição e duplicação (FAKIHA et al., 2018; SEZER; USTA; CICIN, 2009). Além de inibir a replicação de DNA, este fármaco é conhecido por causar efeito citotóxico via sua forma metabolicamente ativa em que um dos sintomas mais frequentes é a diarreia. O processo se inicia no fígado, por meio da circulação enterohepática, pela hidrólise da forma ativa, SN-38, pela enzima carboxilesterase. Esta enzima tem a função de catalisar a reação com produção de éster carboxílico e água. O SN-38 será metabolizado pela enzima UDP-glucuronosiltransferase (UGT) com a formação do metabólito inativo, SN-38 glucuronidado (SN-38G). Este componente inativo será excretado para o TGI, pela bile. Bactérias presentes no TGI que expressam genes produtores da enzima β -glucuronidase irão converter esta forma inativa em sua forma ativa, SN-38, que causará danos à mucosa intestinal com conseqüente desenvolvimento de diarreia (CHENG et al., 2018; FAKIHA et al., 2018).

O processo de diarreia por meio da utilização do CPT-11 como agente antitumoral se dá por duas maneiras. A primeira conhecida como colinérgica (estimulação excessiva da captação de acetilcolina com conseqüente dilatação de esfíncteres ou relaxamento muscular), que atua pouco tempo após a administração

do fármaco e tem a atropina como um efeito inibitório deste processo. A segunda, também chamada de diarreia tardia ou hiperosmolar, ocorre por vários fatores como modificação da motilidade intestinal e menor absorção de eletrólitos e água (SEZER; USTA; CICIN, 2009).

2.5 Mucosite

A mucosite é um efeito colateral que acomete de 50 a 80% dos pacientes em tratamento oncológico (TOUCHEFEU et al., 2014; GIBSON et al., 2013). Este termo foi criado na década de 80, sendo a mucosite conhecida como a complicação não hematológica mais presente no tratamento oncológico (CHAVELI-LÓPEZ; BAGÁN-SEBASTIÁN, 2016). O início da mucosite se dá por meio de um processo inflamatório no TGI com a formação de lesões com intensidades diferenciadas causadas pelo agente quimio ou radioterápico (MARIA-AGGELIKI et al., 2009). A apoptose dos fibroblastos e demais tecidos endoteliais parece preceder às lesões epiteliais. De maneira simplificada, o dano às células epiteliais é resultante de uma desregulação da conformação celular com aumento na produção de ROS e citocinas inflamatórias que promovem a lesão tecidual (CHAVELI-LÓPEZ; BAGÁN-SEBASTIÁN, 2016). As lesões na mucosa intestinal iniciam com apoptose das criptas e posteriormente atrofia das vilosidades, o que favorece a TB. A intensidade do processo inflamatório vai de acordo com o tipo celular presente tanto na cavidade oral, como também no esôfago, duodeno, jejuno e cólon (MARIA-AGGELIKI et al., 2009; SOUTHCOTT et al., 2008).

As células com rápida proliferação são as mais afetadas, ou seja, quanto maior o número de células produzidas em um menor espaço de tempo, maiores serão os danos causados pelo tratamento (MARIA-AGGELIKI et al., 2009). Nos casos de mucosite em que há instauração de um processo inflamatório exacerbado, faz-se necessário a suspensão do tratamento quimio e/ou radioterápico para melhora da condição clínica do paciente (TOUCHEFEU et al., 2014). Desse modo, o tempo de internação do paciente será maior, o que pode vir a comprometer o tratamento oncológico (GIBSON et al., 2013).

Não se sabe ao certo se a mudança na composição da microbiota é a causa ou a consequência deste processo inflamatório no epitélio intestinal durante o desenvolvimento da mucosite. Busca-se saber se esta inflamação ocorre por meio da mudança na composição da microbiota durante o tratamento ou se a inflamação é a

responsável pela mudança na composição destes micro-organismos (TOUCHEFEU et al., 2014). TOUCHEFEU et. al., (2014)

A modificação da composição da microbiota pode ser observada em relação ao uso de CPT-11 como agente quimioterápico em animais. Há relatos de estudos experimentais em que a mucosite intestinal foi induzida pelo fármaco com dose única intraperitoneal (i.p). Encontrou-se aumento dos gêneros *Escherichia* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *Serratia* spp. e *Staphylococcus* spp. no cólon; enquanto *Bacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. estavam diminuídos nas amostras de fezes coletadas. Observou-se também que as bactérias dominantes no TGI são as produtoras de β -glucuronidase, o que contribui para o desenvolvimento de diarreia e conversão da forma inativa do CPT-11 (SN-38G) em forma ativa (SN-38). Outro ponto em destaque é que o número de micro-organismos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* continuam baixos no sétimo dia após indução de mucosite (TOUCHEFEU et al., 2014).

O diagnóstico da mucosite é observado com maior frequência na fase aguda da doença (SOUTHCOTT et al., 2008). As manifestações clínicas que aparecem são dores nos locais em que há ulcerações, presença de inchaço, vômitos e diarreia, sendo esta última a mais recorrente. Alguns fatores como a área do TGI exposta à radiação, a quantidade e a intensidade da dose oferecida, bem como a técnica de radiação e o uso concomitante de algum quimioterápico estão associados ao desenvolvimento e a gravidade deste quadro de diarreia (MARIA-AGGELIKI et al., 2009).

A fisiopatologia da mucosite é constituída de 5 etapas:

- 1) Início da produção de ROS;
- 2) Fase inicial da inflamação e conseqüentemente apoptose das células;
- 3) Amplificação da sinalização de vias inflamatórias com aumento de apoptose;
- 4) Formação de ulcerações no tecido epitelial e TB;
- 5) Início do processo de cicatrização com proliferação celular após remissão do uso do quimio ou radioterápico (SONIS, 2004).

Não há tratamento específico para a mucosite; entretanto, o que se busca são medidas que possam diminuir o impacto da doença nos pacientes em tratamento

químico e/ou radioterápico. Há estudos que sugerem o uso de aminoácidos (glutamina, arginina, triptofano e citrulina), AGCC (acetato, butirato e propionato), ômega 3, ácido conjugado linoleico (ANDRADE et al., 2015), fibras (como prebióticos: inulina e oligofrutose) e também os probióticos (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces*) (ANDRADE et al., 2015; MARIA-AGGELIKI et al., 2009)..

Guias recentes citam outros métodos no tratamento da mucosite induzida por quimioterápico como o fator de crescimento de queratinócitos para manutenção da integridade epitelial, fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) para modificações nos processos biológicos que favoreçam a formação de matriz extracelular, peptídeos associados ao glucagon (GLP), em particular o GLP-2, e fatores de crescimento derivados do leite bovino, em especial aqueles que estão presentes no colostro (RATHE; SHEN; SANGILD, 2018).

2.6 Probióticos

Probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). Dentre os vários tipos de probióticos, destacam-se as bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* (SOUTHCOTT et al., 2008) e leveduras como a *Saccharomyces boulardii* por promoverem uma melhora na função da barreira intestinal (MARIA-AGGELIKI et al., 2009), modulação da resposta imune do indivíduo (ANDRADE et al., 2015), e na prevenção e no tratamento de determinados tipos de doenças como a diarreia induzida por rotavírus e DII (MOHAMMADI et al., 2018).

Outras características dos probióticos são descritas como: possuir resistência ao suco biliar e à acidez no estômago e produzir componentes antimicrobianos como bacteriocinas (OH et al., 2018). Promover proteção ao hospedeiro contra micro-organismos patogênicos, por meio da interação com as células produtoras de muco e as secretoras de células do sistema imune, e apresentar viabilidade na produção industrial também estão entre as características dos micro-organismos com propriedades probióticas (MOHAMMADI et al., 2018; MARIA-AGGELIKI et al., 2009).

Além dos benefícios promovidos pelos probióticos citados anteriormente, observa-se resultados positivos no uso destes micro-organismos na perda de peso, melhora de perfil glicêmico, lipídico e da pressão arterial (CROVESY et al., 2017;

KANG; YUN; PARK, 2010), doenças alérgicas (SASHIHARA et al., 2007), intolerância à lactose, menor incidência de câncer de cólon (KLAENHAMMER, 2012) e síntese de vitaminas essenciais ao metabolismo humano como as do complexo B e K (EWE; WAN-ABDULLAH; LIONG, 2010).

Os principais produtos industrializados contendo probióticos são os alimentos como leites fermentados, iogurtes e bebidas gaseificadas (MARÍN et al., 2009).

2.6.1 *Lactobacillus gasseri*

As espécies do gênero *Lactobacillus* pertencem ao grupo de micro-organismos mais importantes no TGI dos humanos e animais devido à sua fácil adaptação e desenvolvimento simbiótico com o hospedeiro (KAWASE et al., 2011).

O *L. gasseri* pertence ao grupo de bactérias não patogênicas, não esporuladas, Gram-positivo (MOHAMMADI et al., 2018; CARVALHO et al., 2017), anaeróbias facultativas (CARVALHO et al., 2017) e habitantes naturais do TGI dos humanos tanto em recém-nascidos quanto adultos. Está presente também na cavidade oral, vaginal e no estômago conferindo benefícios à saúde do hospedeiro como atividade antimicrobiana e probiótica (TADA et al., 2017), além de serem facilmente encontradas na decomposição de vegetais e frutas (CARVALHO et al., 2017).

A temperatura ideal de crescimento do *L. gasseri* varia entre 35 a 38°C (AZCARATE-PERIL et al., 2008). Possuem a habilidade de produzirem ácidos orgânicos, ácidos graxos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Ativam o sistema imune com produção de interleucinas, como a IL-10, e imunoglobulinas (KAWASE et al., 2011), aumento de células natural killer (NK) e monócitos (MOHAMMADI et al., 2018; KLAENHAMMER, 2012).

Até a década de 80 o *Lactobacillus gasseri* era classificado como *L. acidophilus* devido a não só sua semelhança morfológica como também na utilização de fontes de carboidrato, prebióticos, durante a fermentação. As inovações de extração de DNA e sequenciamento genético possibilitou diferenciá-los com consequente reclassificação (AZCARATE-PERIL et al., 2008).

Dentre as atividades antimicrobianas, tem-se a produção de gassericina A pelo *L. gasseri* LA39 isolado de fezes de crianças (OH et al., 2018). Trata-se de um peptídeo antimicrobiano tolerante ao calor e pH (ARAKAWA et al., 2015) usado com a finalidade de inibir o crescimento de linhagens patogênicas (TOBA; YOSHIOKA; ITOH, 1991).

KAWASE et al., (2011) relatam que o *L. gasseri* TMC0356 isolado das fezes de humanos saudáveis foi capaz de suprimir o aumento da síntese de IgE sérica em modelo experimental e em humanos com rinite alérgica, bem como em japoneses alérgicos a pólen de cedro durante a estação de polinização; porém, os mecanismos pelos quais houve a supressão de IgE não estão claros.

Segundo FUJIMURA et al. (2006) há estudos relacionados com o uso de *L. gasseri* no tratamento de infecção por *Helicobacter pylori*. Houve inibição do crescimento da bactéria no estômago e diminuição dos processos de ulcerações e gastrite crônica, além de promover efeito protetor no desenvolvimento de câncer gástrico.

A fixação do *L. gasseri* à mucosa intestinal ocorre por meio da sua capacidade adesiva junto às fibronectinas celulares e plasmáticas, presentes no epitélio intestinal, que conferem permanência em longo prazo. O fator de agregação ou adesão molecular que auxilia na fixação epitelial é conhecido por ser uma proteína ligada à camada celular, denominada de fatores de APF1. Esta mesma APF1 é responsável pela exclusão de linhagens patogênicas, como *Campylobacter jejuni* (ARAI et al., 2016).

Dentre os vários trabalhos publicados relacionados ao uso do *L. gasseri* no tratamento preventivo ou até mesmo curativo de várias doenças, não foi encontrado qualquer trabalho mostrando o efeito deste micro-organismo no tratamento preventivo da mucosite intestinal induzida por irinotecano.

3. Justificativa

Uma vez que a mucosite é uma doença que acomete grande parte ou a totalidade dos pacientes em tratamento oncológico e está relacionada com alterações da microbiota e danos patológicos relevantes no intestino ocasionando a suspensão do tratamento com aumento da morbidade do indivíduo, estratégias terapêuticas alternativas tornam-se de grande valia. Sendo assim, o *Lactobacillus gasseri* que já vem demonstrando ter papel importante como imunomodulador, principalmente pelo auxílio na produção de mucina que possui relação direta com a parte protetora da mucosa intestinal, bem como menor ativação de células inflamatórias, torna-se, então, um forte candidato como estratégia bioterapêutica para a mucosite. Assim, uma vez que a mucosite leva a uma alteração da microbiota intestinal (disbiose) e que a suplementação da bactéria induz a uma melhor manutenção da integridade epitelial, estudar também os possíveis efeitos desse micro-organismo e sua contribuição na regulação da resposta inflamatória e na manutenção da integridade epitelial intestinal em um contexto de resposta inflamatória induzida na mucosite é de suma importância. Desta forma, a utilização de bactérias, em especial o *Lactobacillus gasseri*, parece ser de grande valia, uma vez que a manipulação da microbiota intestinal com consequente melhora na resposta imune como também na integridade física das vilosidades intestinais são estratégias relevantes que se apresentam atualmente como uma importante e promissora forma de tratamento para diversas doenças, incluindo a mucosite.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo principal

Avaliar o efeito do tratamento com *L. gasseri* na mucosite intestinal induzida por irinotecano em modelo experimental murino.

4.2 Objetivos específicos:

Verificar o efeito de *L. gasseri* na mucosite induzida, avaliando:

- Sintomas clínicos (diarreia, perda de peso e consumo de alimento);
- Parâmetros histológicos (infiltrado inflamatório, destruição tecidual e escore histológico);
- Permeabilidade intestinal;
- Parâmetros microbiológicos (análise de enterobactérias e BAL no conteúdo fecal);
- Parâmetros imunológicos (infiltrado de neutrófilos e eosinófilos nos tecidos inflamados e níveis de sIgA).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Micro-organismo

O *L. gasseri* utilizado para este trabalho foi isolado do leite materno de mães atendidas em um hospital público na cidade de Belo Horizonte, MG, Brasil (DAMACENO et al., 2017). A cultura foi mantida a -80°C em caldo de *Man, Rogosa & Sharpe* (MRS) (Difco, Sparks, USA), adicionado de 20% de glicerol esterilizado. A ativação foi feita em caldo MRS, a 37°C, por 24 horas, em estufa bacteriológica. A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), UFC/mL, foi feita em ágar MRS. O micro-organismo cultivado foi centrifugado a 10.000 rotações por minuto (RPM), com posterior descarte do sobrenadante e ressuspenso em 5 mL de PBS (tampão fosfato salino) estéril para administração via gavagem aos animais.

5.2 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), fêmeas, de seis a oito semanas de idade, da linhagem Balb/c, no total de 40 animais provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB/UFMG. Para o experimento, os camundongos foram mantidos em mini-isoladores de modelo ALE.MIL.01.03 (Alesco, Monte Mor, Brasil), no biotério do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, nível de biossegurança 2 (NB2). Os animais receberam ração sólida (Nuvital, Nuvilab, Curitiba, Brasil) esterilizada por calor úmido e água filtrada *ad libitum*. Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério, assim como ventilação forçada, umidade (60-80%) e temperatura (22±1°C) também foram controladas. Os experimentos aqui realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob o número 186/2012. (Anexo 1).

5.3 Delineamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos com 10 animais em cada. Os grupos foram: controle tratado com PBS (CTL), controle tratado com *L. gasseri* (LG), controle mucosite (Muc) e o grupo com mucosite tratado com *L. gasseri* (LG+Muc). Do total de 40 animais, 20 foram usados para avaliação de EPO, MPO, slgA, avaliação e contagem de *Enterobactérias* e BAL; os 20 restantes foram usados para análise histológica, classificação de escores histológicos e permeabilidade intestinal.

Os animais dos grupos CTL e Muc receberam 0,1 mL de PBS estéril por gavagem, enquanto que os animais dos grupos LG e LG+Muc receberam 0,1 mL de suspensão com 10^9 UFC/mL de *L. gasseri*. A gavagem tanto de PBS quanto de probiótico ocorreu durante os 15 dias de experimento, sendo que a indução de mucosite ocorreu do 10^o ao 12^o dia de experimento nos grupos Muc e L-G+Muc. A eutanásia ocorreu no 15^o dia de experimento com deslocamento de cervical precedido de anestesia geral.

5.4 Indução de mucosite

Para indução de mucosite utilizou-se o quimioterápico cloridrato de irinotecano (CPT-11) (cloridrato de irinotecano, Evoterin®, EVOLABIS, São Paulo, SP, Brasil), com 75 mg de CPT-11 por kg de peso corpóreo por via intraperitoneal (i.p), nos dias 10, 11 e 12 (PEDROSO et al., 2015).

5.5 Avaliação clínica dos animais e consumo de alimento

O peso dos animais foi mensurado a partir da indução de mucosite até o dia da eutanásia, ou seja, do 10^o ao 15^o dia de experimento. A eutanásia ocorreu no 15^o dia de experimento por deslocamento cervical, sendo este procedimento precedido por anestesia geral com solução de cetamina/xilazina (100 mg/kg cetamina e 10 mg/kg de xilasina). O resultado foi expresso como média da porcentagem de ganho ou perda de peso em relação ao peso do dia de indução à mucosite. A ração foi pesada todos os dias após a indução da doença com o cálculo do consumo de ração por gaiola. Os resultados foram expressos em consumo de ração (grama) por gaiola.

5.6 Determinação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi avaliada pela determinação da radioatividade no sangue após a administração oral de ^{99m}Tc-ácido dietilenoaminopentacético (DTPA). No 5^o dia após a indução da mucosite, alíquotas de 0,1 mL de solução de DTPA marcado com 18,5 MBq de ^{99m}Tc foram administradas, por gavagem, aos 20 animais que seriam usados para histologia e escore histopatológico. Após 4 horas da administração, os 20 camundongos foram anestesiados i.p. com solução de xilazina (10 mg/Kg) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg). Em seguida, 500 µL de sangue foram coletados por punção axilar para determinação da radioatividade. Para os cálculos do

percentual de dose foi utilizado um padrão de dose contendo o mesmo volume de ^{99m}Tc -DTPA administrado aos camundongos, de acordo com a seguinte fórmula conforme descrito por BASTOS et al., 2016:

$$\% \text{ dose no sangue} = \frac{\text{cpm da dose padrão}}{\text{cpm da dose (padrão) administrada}} \times 100$$

cpm= contagem por minuto

5.7 Avaliação de enterobactérias e BAL pelo método dependente de cultivo

Amostras de fezes dos animais foram coletadas de maneira asséptica no dia da eutanásia. Em seguida foram pesadas e acrescentado PBS estéril em uma diluição inicial da ordem de 10^{-2} . Logo após foram realizadas diluições seriadas até a ordem de 10^{-8} , que foram plaqueadas com alíquotas de 0,1mL pelo método de *spread plate* nas placas de Agar MacConkey (Difco), para análise de enterobactérias, e MRS para BAL. Após o plaqueamento, os meios foram incubados em estufa microbiológica a 37°C , por 24 horas e os resultados foram expressos em \log_{10} UFC/g.

5.8 Análises histopatológicas

Após a eutanásia, amostras do jejuno e íleo foram retiradas, estendidas sobre um papel filtro e abertas longitudinalmente no sentido distal para proximal. Retirou-se o conteúdo luminal e, em seguida, os tecidos foram lavados com PBS estéril até a remoção completa do fluido intestinal. Logo após, os papéis filtros foram colocados sobre um reservatório contendo fixador *Bouin* com 2% de ácido acético. Após fixação do *Bouin*, os papéis filtros com as amostras foram retirados do reservatório e os tecidos enrolados com a mucosa voltada para a parte interior, como um “rocambole”, no sentido distal para proximal, amarrados com uma linha e colocados em formol tamponado 4% por 24 horas. Após esse período, as amostras foram transferidas para uma solução contendo álcool 70% e encaminhadas para coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação histológica. As amostras de jejuno e íleo de cinco animais de cada grupo foram processadas para inclusão em parafina e submetidos à microtomia para obtenção de cortes histológicos de 4 μm de espessura. As lâminas foram coradas por HE.

5.8.1 Coloração HE

Cortes de 4 µm dos órgãos de cada animal foram desparafinizados em dois banhos de xilol, 15 minutos cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%) por 3 minutos cada, e hidratados em água corrente por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram corados por Hematoxilina de Harris por 50 segundos e lavados em água corrente durante 20 minutos sendo, em seguida, corados por Eosina por 1 minuto e 30 segundos. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool e diafanizadas em xilol. Os cortes histológicos foram montados com *Entellan* (Merck) e lamínulas de vidro. As lâminas microscópicas foram avaliadas pela Prof. Dra. Camila Megale de Almeida Leite (Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas/UFMG), sendo as lesões de mucosa avaliadas e classificadas de acordo com a metodologia proposta por SOARES et al., 2008.

5.8.2 Análise das lâminas e fotodocumentação

Todas as lâminas codificadas foram observadas e analisadas sequencialmente pela Profa. Dra. Camila Leite, que não teve acesso aos códigos. As amostras foram decodificadas somente após o laudo ter sido emitido pela patologista. Imagens obtidas ao microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) foram transferidas por meio de vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, Bethesda, EUA) para um sistema de vídeo acoplado ao computador por meio do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics) para documentação fotográfica. Para as análises morfométricas do jejuno e íleo, foram obtidas fotografias em aumento de 10X de modo a abranger a maior área possível do órgão.

5.9 Avaliação dos parâmetros imunológicos

5.9.1 Medida da atividade de MPO

A avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi utilizada como índice de recrutamento de neutrófilos nos tecidos. Sumariamente, fragmentos do jejuno e íleo dos animais foram removidos e congelados em microtubos individuais a -80°C. Após o descongelamento, cada amostra de tecido foi homogeneizado em

tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaH₂PO₄.1H₂O, 0,015 M Na₂-EDTA) (100 mg de tecido em 1,9 mL de tampão), utilizando-se homogeneizador de tecidos (Ultra-turrax IKA T10 basic) e centrifugado a 9.500 rpm (Eppendorf 5430 R, São Paulo, SP, Brasil) por 15 minutos a 4°C em que o precipitado foi submetido à lise hipotônica (500 µL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos após) para lise de hemácias. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em tampão NaH₂PO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% (Sigma) e re-homogeneizados. Alíquotas de 1 mL da suspensão de cada amostra de tecido foram transferidas para tubos de microcentrifugação de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 9.500 rpm. Os sobrenadantes foram recolhidos e a atividade da MPO nos precipitados ressuspensionados foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) à 450 nm utilizando tetrametilbenzidina (TMB) (1,6 mM) (Sigma) e H₂O₂ (0,5 mM). A leitura foi feita em leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc., USA) e os resultados expressos como unidades relativas.

5.9.2 Medida da atividade de EPO

A atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO) como quantidade relativa de eosinófilos presentes no íleo e jejuno, foi avaliada por meio de testes enzimáticos como descrito anteriormente por STRATH; WARREN; SANDERSON, (1985). Para isso, para cada 100 mg de tecido pesado, foi adicionado 1,9 mL de PBS (pH 7,2), em seguida o tecido foi homogeneizado (Ultra-turrax IKA T10 basic) e centrifugado a 9.500 rpm (Eppendorf 5430 R, São Paulo, SP, Brasil) por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi submetido à lise hipotônica por adição de 500 µL de salina 0,2%, seguido pela adição de 500 µL de salina 1,6%, suplementada com glicose 5%. Em seguida, o material foi novamente centrifugado sob as mesmas condições anteriormente utilizadas e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspensionado em 1,9 mL de PBS (pH 7,4), contendo HTAB (Sigma) 0,5% para cada 100 mg de amostra. Dessa solução foi recolhida uma alíquota de 1 mL e transferida para um microtubo de 1,5 mL, seguido de 3 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Essa amostra foi centrifugada a 9.500 rpm por 15 minutos a 4°C. Utilizamos

apenas o sobrenadante para quantificação da peroxidase. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo que em cada poço 75 μ L de amostra ou branco (PBS/HTAB 0,5%) foi incubada com 75 μ L de substrato [1,5 mM de *o*-fenilenodiamina, (OPD, Sigma) em tampão Tris-HCl - 0,075 μ M pH 8,0 suplementado de H₂O₂ 6,6 mM]. A placa foi incubada a 20°C, no escuro, por aproximadamente 30 minutos e a reação interrompida pela adição de 50 μ L de H₂SO₄ 1M. A leitura ocorreu em leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.) com filtro de 492 nm.

5.9.3 Dosagem de sIgA

A determinação do nível de sIgA no fluido intestinal foi realizada pelo método de ELISA. Após o sacrifício dos animais, o intestino delgado foi removido pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo foi retirado, pesado e lavado com PBS, pH 7,2, suplementado com inibidores de protease (1 μ M de aprotinina; 25 μ M de leupeptina; 1 μ M de pepstatina e 1 mM de PMSF), na proporção de 2,0 mL de PBS para cada 500 mg do conteúdo. Depois de centrifugado a 5.000 g, por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e congelado a -80°C, para análises posteriores. Para a determinação da sIgA foi utilizado para o revestimento das microplacas anticorpos anti-IgA (M-8769, SIGMA) de camundongos desenvolvidos em cabra, bem como anticorpo conjugado a peroxidase anti-IgA de camundongo (A-4789, SIGMA). A concentração de sIgA total foi determinada utilizando um padrão de IgA purificado (0106-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA). As leituras foram realizadas, a 492 nm, em um leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, USA) e a concentração de sIgA foi dada em μ g/g de fluido intestinal.

5.10 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão e analisados usando análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados no programa GraphPad Prism versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, USA) e consideradas significativas as diferenças em que $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Consumo de ração e perda de peso

A mucosite é um efeito colateral causado pelo uso de drogas antineoplásicas que consiste de um processo inflamatório na camada de mucosa do TGI com desenvolvimento de ulcerações, principalmente na cavidade oral, com consequente diminuição do consumo alimentar, como também diarreia, dores abdominais, vômitos, entre outros (BISCHOFF et al., 2014).

Neste trabalho observamos que após 120 horas de indução de mucosite intestinal por irinotecano, a média de consumo de ração (figura 4) e peso corporal (figura 5) dos animais do grupo Muc diminuíram ao longo do tempo avaliado e com diferença estatística tanto no consumo de ração ($p > 0,0001$) quanto no peso ($p > 0,005$) quando comparado aos grupos CTL e LG. O grupo LG+Muc obteve resultados semelhantes ao grupo Muc tanto no consumo de ração quanto na evolução do peso no mesmo período avaliado e com valores estatísticos iguais ao grupo Muc em relação aos CTL e LG. Desta forma, estes resultados evidenciam que a bactéria não foi capaz de prevenir a perda de peso nos animais com mucosite durante a inflamação.

Figura 4. Avaliação do consumo de ração dos animais após a indução de mucosite.

Dados expressos em média \pm SEM (n=10). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos. CTL = controle PBS; LG = grupo apenas tratado com *L. gasseri*; Muc = mucosite; LG+Muc = grupo tratado com *L. gasseri* e mucosite induzida.

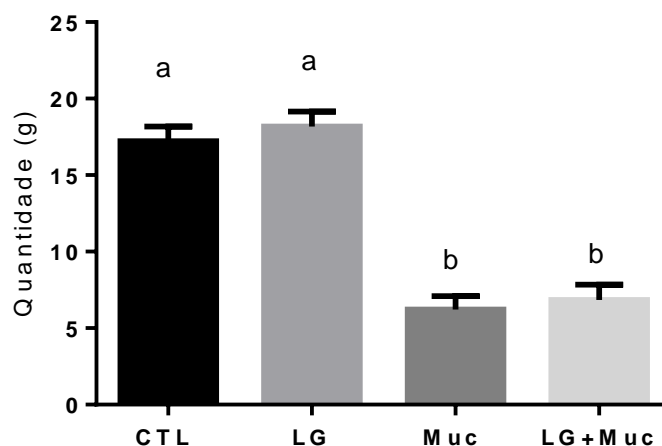
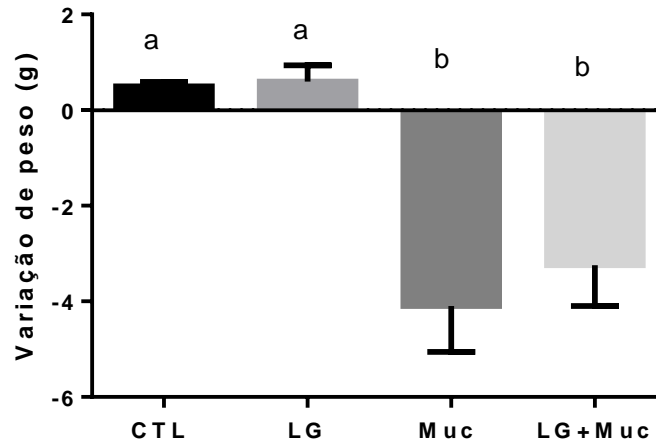


Figura 5. Evolução do peso dos animais após indução de mucosite.

Dados expressos em média \pm SEM (n=10). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos. CTL = controle PBS; LG = grupo apenas tratado com *L. gasseri*; Muc = mucosite; LG+Muc = grupo tratado com *L. gasseri* e mucosite induzida.



Estes resultados corroboram aos trabalhos de LEVIT e colaboradores (2018), BASTOS e colaboradores (2016) JUSTINO e colaboradores (2015) e MAIOLI e colaboradores (2014), em que animais com mucosite induzida por 5-FU ou CPT-11 tanto no grupo com mucosite quanto no grupo tratado com probiótico e com mucosite induzida, também apresentaram uma perda de peso e baixo consumo de ração a partir da indução da doença. Já os grupos CTL e LG mantiveram um comportamento semelhante tanto no consumo de ração, quanto na avaliação do peso.

A perda de peso pode ser explicada pelo fato dos animais desenvolverem diarreia tanto pela conversão da forma inativa do CPT-11, SN-38G, em sua fórmula ativa tóxica, SN-38, por meio de bactérias do TGI produtoras de β -glucuronidase, que irão interferir na síntese de DNA dos enterócitos por meio da inibição da enzima topoisomerase I levando a injúria no tecido, como pela diarreia hiperosmótica em função da não absorção de água e demais eletrólitos presentes no lúmen intestinal (CHENG et al., 2018; FAKIHA et al., 2018).

O não *turnover* celular no TGI acarreta no desenvolvimento de um processo inflamatório com conseqüente diarreia. Desta forma, observa-se que os animais ficam menos ativos, e, com isso, deixam de consumir ração (CHAVELI-LÓPEZ; BAGÁN-SEBASTIÁN, 2016; MARIA-AGGELIKI et al., 2009; SONIS, 2004). Outra hipótese,

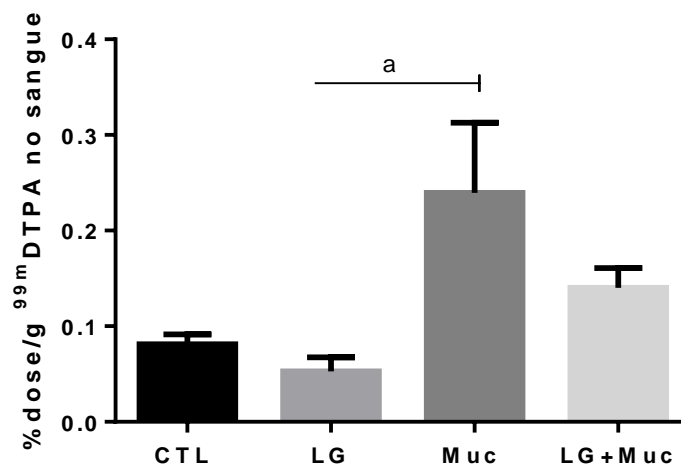
porém não analisada neste trabalho, seria o surgimento de lesões na cavidade oral dos animais que dificultaria o consumo de ração (BISCHOFF et al., 2014).

6.2 Avaliação da permeabilidade intestinal

O processo inflamatório exacerbado no TGI em função do uso do quimioterápico promove um aumento da PI por meio da ruptura na mucosa intestinal com TB e possível desenvolvimento de sepse (ANDRADE et al., 2015; BISCHOFF et al., 2014; MAIOLI et al., 2014). Assim, quando avaliamos a PI foi observado que o grupo Muc apresentou um valor maior em relação aos demais grupos e apresentou diferença estatística apenas com o grupo LG ($p < 0,05$) (figura 6). Desta forma, observa-se que o uso do LG na mucosite não foi eficaz em manter a integridade epitelial e evitar a inflamação.

Figura 6. Permeabilidade intestinal 120h após indução de mucosite.

Dados expressos em média \pm SEM (n=10). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos. CTL = controle PBS; LG = grupo apenas tratado com *L. gasseri*; Muc = mucosite; LG+Muc = grupo tratado com *L. gasseri* e mucosite induzida.



A PI foi avaliada pela contagem de DTPA marcado com ^{99m}Tc no sangue dos animais 120 horas após indução de mucosite por CPT-11. Esta macromolécula, em condições normais, dificilmente ultrapassaria a camada epitelial. Entretanto, na presença de um processo inflamatório na mucosa intestinal teremos rupturas nas junções laterais às células com passagem de micro-organismos para o compartimento interno com consequente aumento de citocinas pró inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF e INF- γ) que vão promover um aumento na degradação epitelial (ANDRADE et al., 2015;

BISCHOFF et al., 2014). Outro ponto a ser destacado é que o processo inflamatório irá modificar a composição da microbiota intestinal, tendo os micro-organismos patogênicos em maior quantidade, como também uma camada de muco mais espessa na tentativa de evitar a TB (MARIA-AGGELIKI et al., 2009).

Nossos resultados foram contrários aos de BASTOS e colaboradores (2016) que utilizaram *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 como probiótico e o mesmo foi capaz de proteger o epitélio dos danos causados pelo quimioterápico. Entretanto, foram semelhantes aos de MAIOLI e colaboradores (2014) em que o tratamento com *S. boulardii* no grupo com mucosite induzida por 5-FU não foi eficaz na manutenção da integridade da mucosa intestinal. Tanto *S. boulardii* quanto *L. gasseri* são micro-organismos com qualidades probióticas já reconhecidas na literatura, porém estes resultados nos mostram que nem todos eles exercem os mesmos efeitos esperados na mucosite. O que se propõe é que exista uma especificidade de linhagens para cada tipo de tratamento.

6.3 Avaliação dos níveis de sIgA

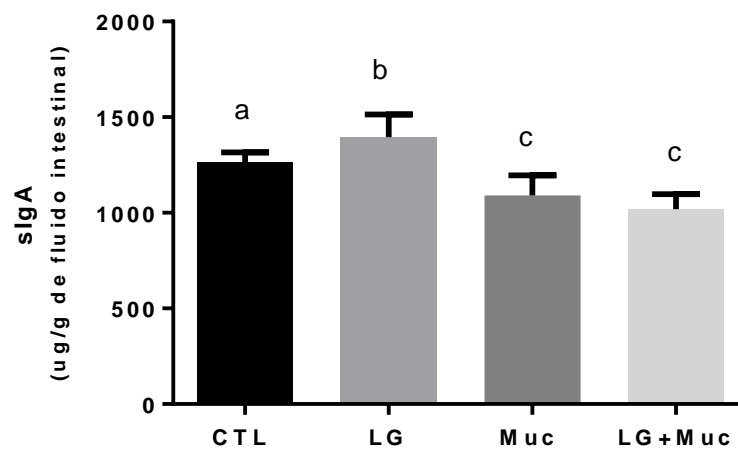
Mesmo na ausência de foco inflamatório no TGI, a síntese de IgA é uma condição normal devido a passagem de alguns micro-organismos pela mucosa com ativação de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF e INF- γ) (LYCKE; BEMARK, 2017; BISCHOFF et al., 2014; HOWARTH; WANG, 2013). Desta forma, a IgA tem importância fundamental no combate a micro-organismos ou substâncias que se aderem ou ultrapassam a barreira intestinal. Esta imunoglobulina tem sua maior produção nos linfonodos presentes no TGI por meio do estímulo de troca da cadeia pesada da célula B, que pertence ao GALT e MALT, para IgA. O estímulo ao recrutamento pode ser comprometido pelo processo de degeneração tecidual instalado nos enterócitos (CARVALHO et al., 2017; BISCHOFF et al., 2014).

Sendo assim, podemos observar na figura 7 que a concentração de sIgA no fluido intestinal foi expressiva em todos os grupos, porém, o grupo LG+Muc apresentou diferença quando comparado com grupo CTL ($p < 0,005$). Estes resultados são contrários aos de MAIOLI e colaboradores (2014) com indução de mucosite por 5-FU, em que o grupo com mucosite tratado com *S. boulardii* apresentou um aumento dos níveis de sIgA quando comparado aos grupos controle e mucosite, sem diferença estatística. No trabalho de PEDROSO e colaboradores (2015) os resultados foram

semelhantes ao nosso, ao passo que os animais convencionais do grupo controle obtiveram produção maior de sIgA quando comparado ao grupo com indução de mucosite por CPT-11 ($p < 0,05$). Estes resultados demonstram que o processo de degeneração nos enterócitos causado pela inflamação no grupo LG+Muc interferiu na síntese de IgA.

Figura 7. Dosagem de sIgA intestinal após indução de mucosite.

Dados expressos em média \pm SEM (n=10). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos. CTL = controle PBS; LG = grupo apenas tratado com *L. gasseri*; Muc = mucosite; LG+Muc = grupo tratado com *L. gasseri* e mucosite induzida.

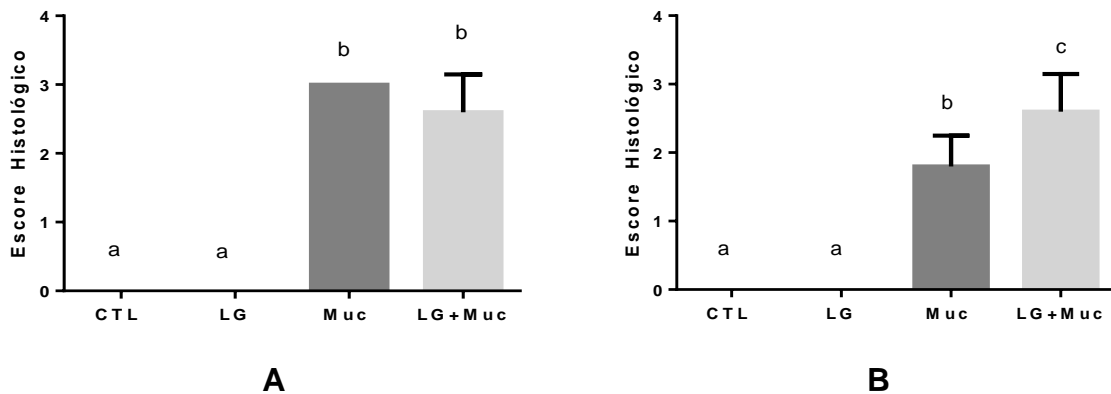


6.4 Escore histológico e análise histológica

Ao avaliarmos os escores histológicos (figura 8) de jejuno e íleo para comprovar os resultados das imagens (figura 9), fica mais uma vez evidente que o *L. gasseri* não foi eficaz na manutenção da integridade epitelial durante a mucosite. De acordo com a classificação proposta para a avaliação morfológica presente no epitélio intestinal em modelo de mucosite, observou-se que no jejuno o valor da média encontrado no grupo LG+Muc está entre 2 e 3, o que caracteriza vilosidades rombas e encurtadas, infiltração de células inflamatórias na lâmina própria (LP) e camada muscular, bem como necrose de cripta. O valor encontrado foi diferente dos demais grupos e sem diferença estatística. Este resultado é semelhante ao de WANG e colaboradores (2013) quando utilizou *Streptococcus thermophilus* TH-4 em modelo de mucosite induzida por doxorubicina. Ainda de acordo com o estudo citado, o grupo tratado com probiótico e com mucosite induzida obteve escores relativamente menores e sem

diferença estatística quando comparado ao grupo mucosite, e maiores quando comparados aos grupos controles.

Figura 8. Escore histológicos de jejuno e íleo após indução de mucosite. Jejuno (A) e íleo (B). Dados expressos em média \pm SEM (n=10). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos. CTL = controle PBS; LG = grupo apenas tratado com *L. gasseri*; Muc = mucosite; LG+Muc = grupo tratado com *L. gasseri* e mucosite induzida.

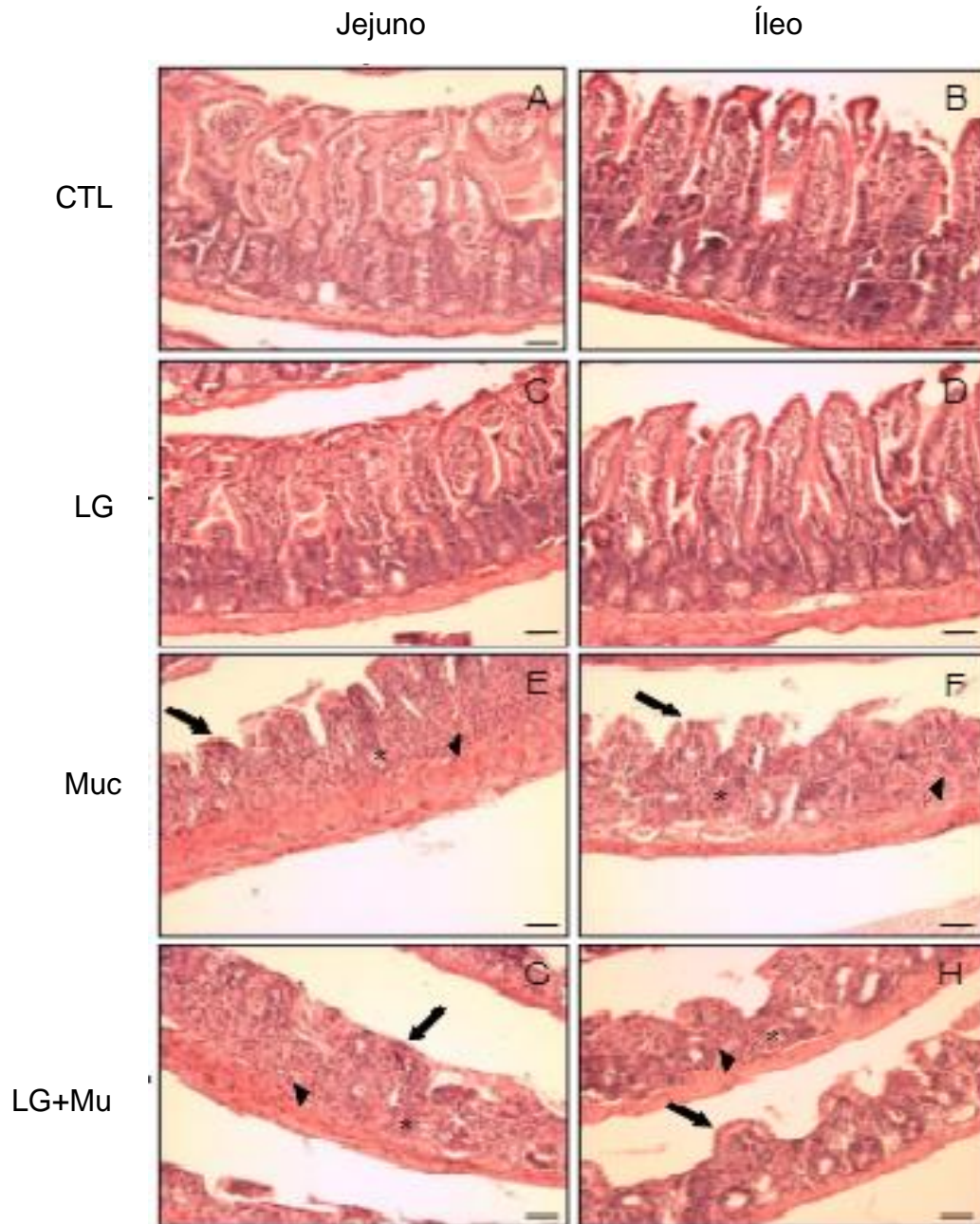


Em relação ao escore histológico no íleo (figura 8B) o valor da média encontrado no grupo LG+Muc está entre 2 e 3 e com diferença estatística quando comparado o grupo Muc ($p < 0,05$), que obteve média de escore igual a 2. Este resultado foi contrário ao de WANG e colaboradores (2013) que obteve média de escore relativamente menor do grupo mucosite + tratamento quando comparado ao grupo mucosite, porém, sem diferença estatística.

Para estes resultados a hipótese proposta é que em condições normais de sobrevivência, a concentração de micro-organismos seja maior na parte final do íleo quando comparada ao jejuno. Desta forma, espera-se que durante o dano tecidual o número de patógenos seja maior tanto em função da ausência de competição com os demais micro-organismos benéficos, como pela ausência de compostos antimicrobianos responsáveis pela homeostase e ativação de citocinas anti-inflamatórias. Com a disbiose é possível que o processo inflamatório intensifique provocando maiores rupturas no tecido com consequente aumento da TB ou até mesmo o próprio *L. gasseri* tenha participação na inflamação (BISCHOFF et al., 2014).

Figura 9. Análise histológica do jejuno e íleo.

Os grupos controles estão representados pelas letras A, B (CTL), respectivamente e C, D (LG) e os animais com mucosite estão representados pelas letras E, F (Muc) e G, H (LG+Muc). Vilosidades encurtadas e rombas (setas), infiltração de células inflamatórias na lâmina própria (cabeças de seta) e destruição da arquitetura das criptas (asterisco) estão presentes nos grupos mucosite (B). Barra = 50 μ M, coloração HE. CTL = controle; LG = controle *L. gasseri*; Mucosite = Muc; LG+Muc = grupo tratado com *L. gasseri* e mucosite induzida.



6.5 Avaliação do infiltrado inflamatório

Parte deste processo inflamatório pode ser observado pelos resultados referentes aos encontrados na mensuração da enzima EPO presente nos eosinófilos. Trata-se de células pertencentes ao sistema imune e que estão presentes no sangue, porém, parte delas estão fixadas aos tecidos com a capacidade auxiliar no processo inflamatório, seja ele por invasão de micro-organismos patogênicos ou parasitas. É uma das primeiras células a serem recrutadas na instalação da inflamação. Eosinófilos secretam enzimas, por endocitose, que destroem as células parasitas quando em contato com a membrana do micro-organismo patogênico. Da mesma forma que atuam na degradação de micro-organismos estranhos, estas mesmas células são capazes de estimularem o processo inflamatório pela síntese de ROS, prostaglandinas e leucotrienos, como também IL-1, IL-4 e TNF (SPENCER et al., 2014).

Diante dos resultados obtidos pela análise de EPO no jejuno, observamos na figura 10A que o grupo LG+Muc obteve um valor menor da enzima quando comparada ao grupo Muc e sem diferença estatística com os demais grupos. Estes resultados foram contrários aos de PEDROSO e colaboradores (2015) que submeteram camundongos convencionais à mucosite e obtiveram valores maiores da enzima quando comparado ao grupo controle e com diferença estatística entre eles ($p < 0,01$).

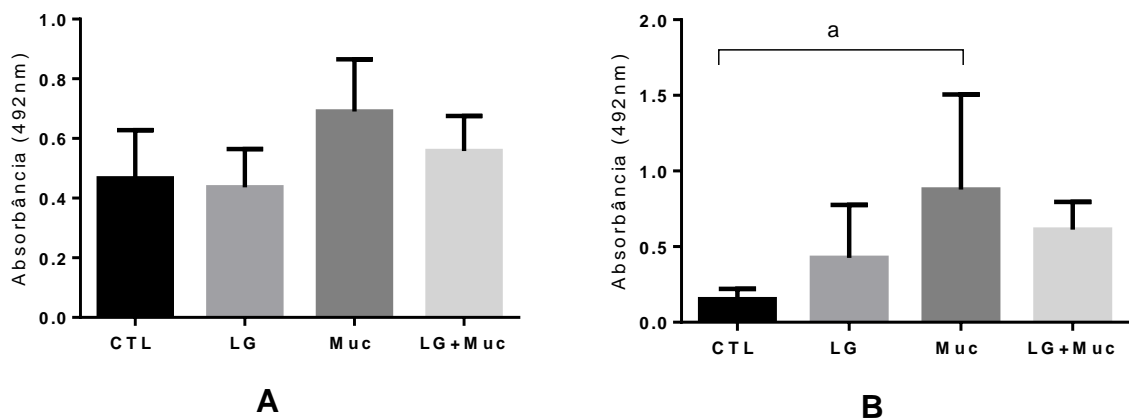
Já na avaliação de EPO no íleo (figura 10B), observamos o mesmo quadro do jejuno, entretanto houve uma diferença significativa em relação aos grupos mucosite, que apresentou uma relação maior de enzimas EPO quando comparado ao grupo CTL ($p < 0,05$).

Outro marcador bioquímico quanto à infiltração é a avaliação da enzima MPO, presente nos neutrófilos. Os neutrófilos são células imunes de vida curta recrutados logo na fase inicial da inflamação via corrente sanguínea. Sua migração ocorre por diapedese e com passagem pela parte interna da célula até o local da inflamação. Este fenômeno é de fundamental importância para a ativação da resposta imune inata do hospedeiro contra patógenos ou inflamação tecidual. Estes mesmos neutrófilos possuem a capacidade de fagocitar micro-organismos estranhos, com consequente morte celular, liberam proteases e fatores citotóxicos, promovem a remodelação do tecido lesionado e regulam a ativação de citocinas pró-inflamatórias por meio da secreção de moléculas imunomodulatórias. A destruição tecidual é o efeito colateral

ocasionado pela liberação de enzimas dos neutrófilos no hospedeiro durante o processo inflamatório (VOISIN; NOURSHARGH, 2018).

Figura 10. Infiltrado de eosinófilo (EPO) do jejuno e íleo após indução de mucosite.

Jejuno (A) e íleo (B). Dados expressos em média \pm SEM (n=10). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. CTL = controle PBS; LG = grupo apenas tratado com *L. gasseri*; Muc = mucosite; LG+Muc = grupo tratado com *L. gasseri* e mucosite induzida.



Diante destas informações, a avaliação da atividade da enzima MPO no jejuno (figura 11A) não apresentou relevância estatística entre os grupos. No íleo (figura 11B) a situação foi inversa: o grupo LG+Muc obteve um aumento expressivo em comparação a todos os demais grupos sendo o CTL e L.G com as menores quantidades ($p < 0,05$). O resultado encontrado no jejuno foi contrário ao de KATO e colaboradores (2017) que utilizou *Bifidobacterium bifidum* G9-1 em modelo de mucosite induzida por 5-FU em que o grupo com mucosite e tratamento obteve valores maiores de MPO quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$).

De maneira resumida, foi possível observar que apesar de o *L. gasseri* ter apresentado efeitos benéficos ao hospedeiro em diversas doenças e até mesmo no tratamento da obesidade (MOHAMMADI et al., 2018; TADA et al., 2017), ele não foi capaz de proteger em modelo de mucosite intestinal. É possível observar pela contagem de enterobactérias (figura 12A) e BAL (figura 12B), 120 horas após indução de mucosite, em meio MacConkey e MRS, respectivamente, que a contagem de enterobactérias foi significativamente maior no grupo LG+Muc quando comparado tanto com o grupo CTL ($p < 0,005$), LG ($p < 0,05$) e Muc ($p < 0,05$). Já na contagem de BAL percebemos que os níveis foram relativamente diferentes entre os grupos;

entretanto, pelas análises estatísticas, não foi observada nenhuma diferença entre os grupos pelo teste de múltiplas comparações.

Figura 11. Infiltrado de neutrófilos (MPO) do jejuno e íleo após indução de mucosite.

(A) jejuno e (B) íleo. Dados expressos em média \pm SEM (n=10). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos. CTL = controle PBS; LG = grupo apenas tratado com *L. gasseri*; Muc = mucosite; LG+Muc = grupo tratado com *L. gasseri* e mucosite induzida.

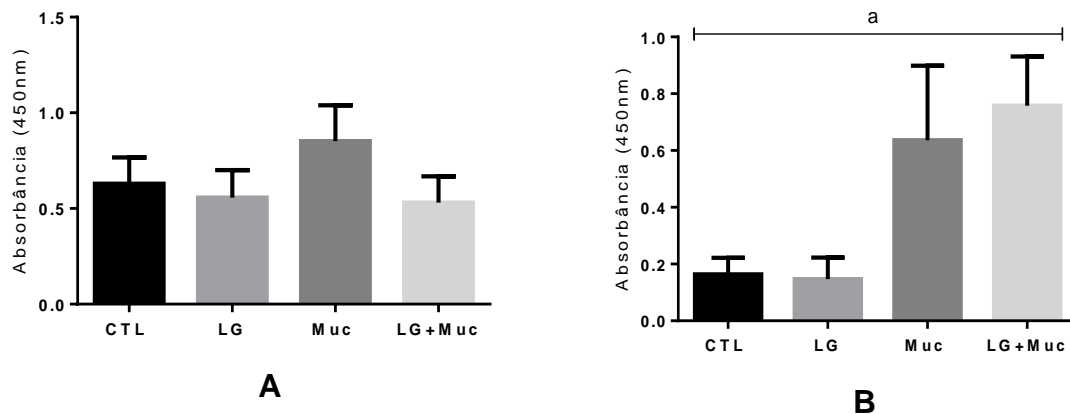
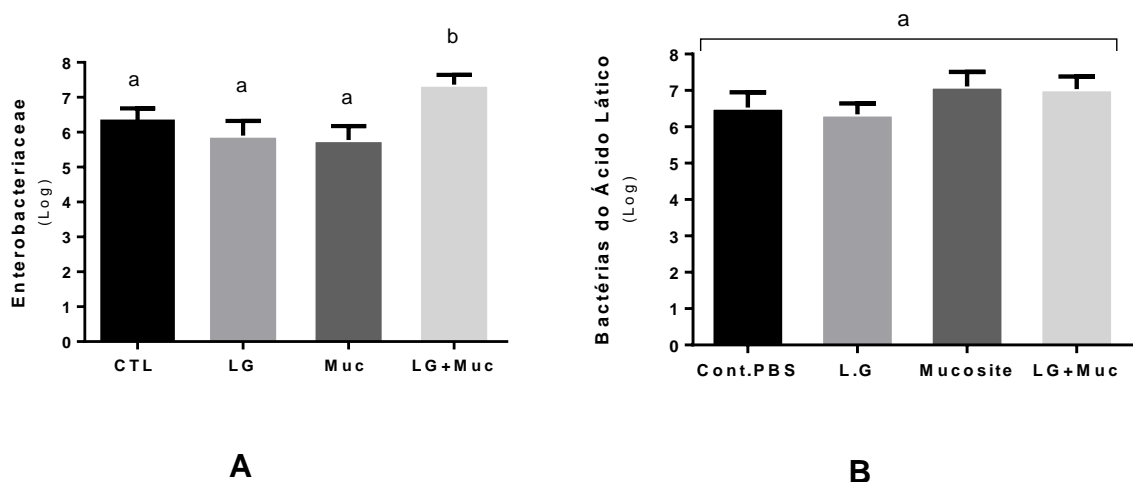


Figura 12. Avaliação de Enterobactérias (A) e BAL (B) no conteúdo fecal após indução de mucosite.

Dados expressos em média \pm SEM (n=10). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos. CTL = controle PBS; LG = grupo apenas tratado com *L. gasseri*; Muc = mucosite; LG+Muc = grupo tratado com *L. gasseri* e mucosite induzida.



7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados quanto à administração de *L. gasseri* no tratamento preventivo de mucosite induzida por irinotecano em modelo animal, observamos que a bactéria não foi eficaz na manutenção da integridade epitelial, e nem em diminuir os efeitos colaterais oriundos do uso deste fármaco no tratamento oncológico.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, E.; IDRIS, A.; SAPARON, A. Paper reduction using scs-slm technique in stfbc mimo-ofdm. **ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 12, n. 10, p. 3218–3221, 2017.
- AMIT-ROMACH, E. et al. Bacterial population and innate immunity-related genes in rat gastrointestinal tract are altered by vitamin A-deficient diet. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 70–77, 2009.
- ANDRADE, M. E. R. et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 6, p. 1080–1087, 2015.
- ARAI, T. et al. In vitro investigation of molecules involved in *Lactobacillus gasseri* SBT2055 adhesion to host intestinal tract components. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 6, p. 1658–1667, 2016.
- ARAKAWA, K. et al. *Lactobacillus gasseri* requires peptides, not proteins or free amino acids, for growth in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 3, p. 1593–1603, 2015.
- AZCARATE-PERIL, M. A. et al. Analysis of the genome sequence of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 reveals the molecular basis of an autochthonous intestinal organism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4610–4625, 2008.
- BASTOS, R. W. et al. *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 treatment reduces intestinal damage in a murine model of irinotecan-induced mucositis. **Beneficial Microbes**, v. 7, n. 4, p. 549–558, 2016.
- BISCHOFF, S. C. et al. Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. **BMC Gastroenterology**, v. 14, n. 1, p. 1–25, 2014.
- CARVALHO, R. D. D. O. et al. Use of wild type or recombinant lactic acid bacteria as an alternative treatment for gastrointestinal inflammatory diseases: A focus on inflammatory bowel diseases and mucositis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–13, 2017.
- CHAVELI-LÓPEZ, B.; BAGÁN-SEBASTIÁN, J. V. Treatment of oral mucositis due to chemotherapy. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 8, n. 2, p. e201–e209, 2016.
- CHENG, K.-W. et al. Pharmacological inhibition of bacterial β -glucuronidase prevents

irinotecan-induced diarrhea without impairing its antitumor efficacy in vivo. **Pharmacological Research**, 2018.

CONG, Y.; LI, Y. Different flavors of IL-21 in regulation of intestinal IgA to commensals. **Mucosal Immunology**, n. September, p. 19–21, 2018.

CROVESY, L. et al. Effect of Lactobacillus on body weight and body fat in overweight subjects: a systematic review of randomized controlled clinical trials. **International Journal of Obesity**, n. July, p. 1–22, 2017.

DAMACENO, Q. S. et al. Evaluation of Potential Probiotics Isolated from Human Milk and Colostrum. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 9, n. 4, p. 371–379, 2017.

DI LUCCIA, B. et al. Lactobacillus gasseri SF1183 Affects Intestinal Epithelial Cell Survival and Growth. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

EWE, J. A.; WAN-ABDULLAH, W. N.; LIONG, M. T. Viability and growth characteristics of Lactobacillus in soymilk supplemented with B-vitamins. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, n. 1, p. 87–107, 2010.

FAKIHA, K. et al. Amitriptyline prevents CPT-11-induced early-onset diarrhea and colonic apoptosis without reducing overall gastrointestinal damage in a rat model of mucositis. p. 2–9, 2018.

FUJIMURA, S. et al. Detection of Lactobacillus gasseri OLL2716 strain administered with yogurt drink in gastric mucus layer in humans. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 578–581, 2006.

GIBSON, R. J. et al. Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. **Supportive Care in Cancer**, v. 21, n. 1, p. 313–326, 2013.

GÓMEZ-GUZMÁN, M. et al. Antihypertensive effects of probiotics *Lactobacillus* strains in spontaneously hypertensive rats. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 11, p. 2326–2336, 2015.

HOWARTH, G. S.; WANG, H. Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. **Nutrients**, v. 5, n. 1, p. 58–81, 2013.

JUSTINO, P. F. C. et al. Regulatory role of Lactobacillus acidophilus on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 559–567, 2015.

KANG, J. H.; YUN, S. IL; PARK, H. O. Effects of Lactobacillus gasseri BNR17 on body weight and adipose tissue mass in diet-induced overweight rats. **Journal of**

Microbiology, v. 48, n. 5, p. 712–714, 2010.

KATO, S. et al. Probiotic *Bifidobacterium bifidum* G9-1 attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice via suppression of dysbiosis-related secondary inflammatory responses. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 44, n. 10, p. 1017–1025, 2017.

KAWASE, M. et al. Strain-specific detection by pulsed-field gel electrophoresis of *Lactobacillus gasseri* TMC0356 in human feces after oral administration of these organisms. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 8, p. 589–594, 2011.

KLAENHAMMER, T. R. Characterization of *Lactobacillus gasseri* isolates from a breast-fed infant © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . n. February, p. 15–24, 2012.

LEVIT, R. et al. Protective effect of the riboflavin-overproducing strain *Lactobacillus plantarum* CRL2130 on intestinal mucositis in mice. **Nutrition**, v. 54, p. 165–172, 2018.

LYCKE, N. Y.; BEMARK, M. The regulation of gut mucosal IgA B-cell responses: Recent developments. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 6, p. 1361–1374, 2017.

MAIOLI, T. U. et al. Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. **Journal of Negative Results in Biomedicine**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2014.

MARIA-AGGELIKI, K. et al. The Potential Clinical Impact of Probiotic Treatment for the Prevention and/or Anti-Inflammatory Therapeutic Effect Against Radiation Induced Intestinal Mucositis. A Review. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 3, n. 3, p. 195–200, 2009.

MARÍN, M. L. et al. Cold storage of human milk: Effect on its bacterial composition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 49, n. 3, p. 343–348, 2009.

MARTÍN, R. et al. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. **Journal of Human Lactation**, v. 21, n. 1, p. 8–17, 2005.

MARTINO, E.; VOLPE, S. D.; TERRIBLE, E. *et al.* The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.27, p.701-707, 2017.

MIYAZAWA, K. et al. Enhancement of immunoregulatory effects of *Lactobacillus gasseri* TMC0356 by heat treatment and culture medium. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 210–216, 2011.

MOHAMMADI, F. et al. Characterization of bacteriocin production in *Lactobacillus* spp.

- isolated from mother's milk. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p. 242–246, 2018.
- OH, N. S. et al. Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–15, 2018.
- PEDROSO, S. H. S. P. et al. Evaluation of mucositis induced by irinotecan after microbial colonization in germ-free mice. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 161, n. 10, p. 1950–1960, 2015.
- RATHE, M.; SHEN, R. L.; SANGILD, P. T. Trophic factors in the treatment and prevention of alimentary tract mucositis. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 12, n. 2, p. 181–186, 2018.
- Sauls RS, Taylor BN. Histology, M Cell. [Updated 2019 Jan 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534232/>
- SASHIHARA, T. et al. Effect of growth conditions of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 on the immunostimulatory activity for production of interleukin-12 (p70) by murine splenocytes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 3, p. 274–281, 2007.
- SEZER, A.; USTA, U.; CICIN, I. The effect of *Saccharomyces boulardii* on reducing irinotecan-induced intestinal mucositis and diarrhea. **Medical Oncology**, v. 26, n. 3, p. 350–357, 2009.
- SOARES, P. M. G. et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 91–98, 2008.
- SONIS, S. T. Pathobiology of mucositis. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 20, n. 1, p. 11–15, 2004.
- SOUTHCOTT, E. et al. Yoghurts containing probiotics reduce disruption of the small intestinal barrier in methotrexate-treated rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 53, n. 7, p. 1837–1841, 2008.
- SPENCER, L. A. et al. Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–10, 2014.
- STRATH, M.; WARREN, D. J.; SANDERSON, C. J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **Journal of Immunological Methods**, v. 83, n. 2, p. 209–215, 1985.

- SUZUKI, Y. et al. Association between yogurt consumption and intestinal microbiota in healthy young adults differs by host gender. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–11, 2017.
- TADA, I. et al. Revealing the genomic differences between two subgroups in *Lactobacillus gasseri*. **Bioscience of microbiota, food and health**, v. 36, n. 4, p. 155–159, 2017.
- TOBA, T.; YOSHIOKA, E.; ITOH, T. Potential of *Lactobacillus gasseri* isolated from infant faeces to produce bacteriocin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 228–231, 1991.
- TOUCHEFEU, Y. et al. Systematic review: The role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis - Current evidence and potential clinical applications. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 40, n. 5, p. 409–421, 2014.
- VAN SEBILLE, Y. Z. A. et al. Management of Mucositis During Chemotherapy: From Pathophysiology to Pragmatic Therapeutics. **Current Oncology Reports**, v. 17, n. 11, 2015.
- VOISIN, M.-B.; NOURSHARGH, S. Neutrophil trafficking to lymphoid tissues: physiological and pathological implications. **The Journal of Pathology**, 2018.
- VOLSTATOVA, T. et al. Milk digesta and milk protein fractions influence the adherence of *Lactobacillus gasseri* R and *Lactobacillus casei* FMP to human cultured cells. **Food Funct.**, v. 7, n. 8, p. 3531–3538, 2016.
- WALL, M. E.; MANI, M. C.; NICHOLAS, A. W. *et al.* Plant antitumor agents. Synthesis and structure activity of novel camptothecin analogs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 2689-2700, 1993.
- WANG, H. et al. Effects of *Streptococcus thermophilus* TH-4 in a rat model of doxorubicin-induced mucositis. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 48, n. 8, p. 959–968, 2013.
- WEISS, G. et al. *Lactobacilli* and *bifidobacteria* induce differential interferon- β profiles in dendritic cells. **Cytokine**, v. 56, n. 2, p. 520–530, 2011.
- WHO, W.H.O **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. Otario, Canadá: [s.a].
- YAN, F. et al. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. **Gastroenterology**, v. 132, n. 2, p. 562–575, 2007.

Anexo 1



Universidade Federal de Minas Gerais

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CERTIFICADO/CERTIFICATE

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

Aprovada a prorrogação até 03/07/2019 -(reunião de 22/05/2017). Aprovada nova prorrogação até 02/07/2021 (reunião de 03/12/2018).

We hereby certify that the Protocol n.º 186/2012, related to the Project entitled “*Study of intestinal disorders associated with the use of chemotherapy and the therapeutic action of probiotics in animal experiments*”, under the supervision of **Flaviano dos Santos Martins**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 07/04/2012. This certificate expires in 07/03/2017.

New valid date: July/03/2019 – (Approve by CEUA in 05/22/2017). New valid date: July/02/2021 (Approve by CEUA 12/03/2018)

Belo Horizonte, 05/12/2018.

Prof. Marcelo Resende de Souza

Coordenador da CEUA/UFMG



V SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG

PROFESSOR EDUARDO OSÓRIO CISALPINO:

Desafios Atuais no Enfrentamento de Doenças Microbianas

CERTIFICADO

Certificamos que **Johnatan Caetano Braz** participou do “**V Simpósio de Microbiologia da UFMG – Professor Eduardo Osório Cisalpino: Desafios Atuais no Enfrentamento de Doenças Microbianas**”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 05 e 06 de setembro de 2018, contabilizando 16 horas.

Prof.ª Dra. Simone Gonçalves dos Santos
Coordenadora do V Simpósio de Microbiologia da UFMG

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