

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Ramon de Oliveira Souza

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM *AKKERMANSIA MUCINIPHILA* BAA-835
DA MUCOSITE INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA EM CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte
2022

Ramon de Oliveira Souza

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM *AKKERMANSIA MUCINIPHILA* BAA-835
DA MUCOSITE INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA EM CAMUNDONGOS**

Versão final

Tese apresentado ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos
Martins

Belo Horizonte
2022

043

Souza, Ramon de Oliveira.

Avaliação do tratamento com *Akkermansia muciniphila* BAA-835 da mucosite induzida por quimioterapia em camundongos [manuscrito] / Ramon de Oliveira Souza. – 2022.

92 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Probióticos. 3. Mucosite. 4. Neoplasias. I. Martins, Flaviano dos Santos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



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

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE **RAMON DE OLIVEIRA SOUZA**

Nº REGISTRO: [2018709490](#)

Às 13:30 horas do dia **19 de dezembro de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Simone de Vasconcelos Generoso (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG), Luciana Mara Costa Moreira (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG), Juliana Teixeira de Magalhães (Universidade Federal de São João Del Rei), Fabiana da Conceição Pereira Tiago (Centro de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG) e o Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins (Orientador), para julgar o trabalho final "**Avaliação do tratamento com *Akkermansia muciniphila* BAA-835 da mucosite induzida por quimioterapia em camundongos**" do aluno **Ramon de Oliveira Souza**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2022

Membros da Banca:

Profa. Dra. Simone de Vasconcelos Generoso

Profa. Dra. Luciana Mara Costa Moreira

Profa. Dra. Juliana Teixeira de Magalhães

Profa. Dra. Fabiana da Conceição Pereira Tiago

De acordo:

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

(Orientador)

Profa. Daniele da Glória de Souza

(*Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia*)



Documento assinado eletronicamente por **Flaviano dos Santos Martins, Professor do Magistério Superior**, em 20/12/2022, às 10:48, 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 **Simone de Vasconcelos Generoso, Professora do Magistério Superior**, em 20/12/2022, às 13:20, 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 **Fabiana da Conceição Pereira Tiago, Usuário Externo**, em 20/12/2022, às 14:03, 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 **Luciana Mara Costa Moreira, Usuário Externo**, em 20/12/2022, às 14:15, 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 **Juliana Teixeira de Magalhães, Usuária Externa**, em 22/12/2022, às 12:46, 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 **Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 22/12/2022, 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 **1913980** e o código CRC **3E5D1BEF**.

A minha amada mãe, Joana D' arc, que durante seu tratamento quimioterápico desenvolveu mucosite gastrointestinal e almejou por um tratamento eficaz.

AGRADECIMENTOS

Felizmente não estive sozinho nesta caminhada e, portanto, registro aqui meus mais sinceros agradecimentos à:

Deus, por me fortalecer diariamente para ser capaz de chegar ao fim desse desafio;

Minha mãe, Joana D' arc (in memorian), meu porto seguro, que sempre me motivou a estudar e alcançar meus objetivos, mas infelizmente não poderemos estar juntos para comemorar mais esta vitória;

Meu pai e irmão, Diogo e Rafael, que sempre torceram pelo meu sucesso;

Meu namorado, Marcelo, que tive a sorte de conhecer no primeiro ano do doutorado e hoje é o meu parceiro de vida. Agradeço por estar sempre ao meu lado, se fazer presente em momentos tão difíceis que achei que não teria forças para suportar;

Tia Luzia e Tia Cida, minhas mães de coração, pelo apoio incondicional;

Minha prima Fernanda, por não medir esforços em me auxiliar em todos os momentos necessários;

Vivian e Viviany, amigas que conheci ainda na graduação e trago comigo até hoje, e sempre me apoiaram a ir atrás dos meus sonhos e objetivos;

Flaviano, meu orientador, que prontamente aceitou minha orientação, sempre solicito no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pela paciência, e por ter compreendido os momentos difíceis que passei durante o doutorado, sendo sempre muito compreensivo;

Equipe do LABio, Samantha, Bruno, Mônica, Éricka e todos os alunos de iniciação científica, que sempre auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho;

Instituições que contribuíram para minha formação – UFMG, CAPES, CNPq e FAPEMIG;

Cada um que depositou em mim confiança e contribui para a conclusão deste trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos a cada um de vocês!

Obrigado!

“Educar é realizar a mais bela e complexa arte da inteligência. Educar é acreditar na vida e ter esperança no futuro” (Augusto Cury).

RESUMO

O 5-Fluouracil (5-FU) é um quimioterápico amplamente utilizado para diferentes tipos de câncer. Devido a não seletividade deste fármaco, diferentes efeitos colaterais podem surgir em pacientes em terapia, como por exemplo, a mucosite intestinal. Esta condição é caracterizada pela inflamação e ulceração da mucosa gastrointestinal e até o momento não existem tratamentos curativos, mas apenas intervenções paliativas que buscam melhorar a qualidade de vida dos pacientes. O uso de probióticos tem sido considerado uma importante estratégia terapêutica para o tratamento da mucosite, e a bactéria *Akkermansia muciniphila* tem se destacado devido a suas propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito probiótico de *A. muciniphila* BAA 835 em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU. Inicialmente, avaliou-se o efeito dose-resposta, a viabilidade bacteriana e o melhor protocolo de tratamento. Posteriormente, foram analisados os demais parâmetros clínicos, microbiológicos, imunológicos, histológicos e fisiológicos. Para isso, foram utilizados camundongos Balb/c com mucosite induzida com 5-FU (300 mg/Kg), em dose única, via intraperitoneal. Nossos resultados sugerem que a melhor dose do probiótico foi de 10^9 UFC, em sua forma viável, sob protocolo preventivo, já que nestas condições constatou-se atenuação da perda de peso e redução do comprimento intestinal, além da diminuição dos níveis de MPO e EPO no tecido. Seguindo este protocolo de tratamento, não foram observadas diferenças estatísticas no consumo alimentar dos animais tratados, contudo, houve uma melhora significativa dos parâmetros clínicos mensurados por meio do índice de atividade diária da doença (DAI). O probiótico também melhorou a integridade da barreira epitelial, diminuindo a permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana, além de contribuir para a preservação da arquitetura do intestino, e atenuação da perda de células caliciformes. *A. muciniphila* também contribuiu para diminuição dos níveis de enterobactérias no intestino e expansão de bactérias ácido lácticas. Além disso, foi demonstrado aumento significativo nos níveis de sIgA, linfócitos circulantes, citocina IL10, e redução de IL6, IL1 β , TNF, neutrófilos circulantes, hidróperóxidos e da enzima superóxido dismutase no tecido. Portanto, a administração oral de *A. muciniphila* foi capaz de atenuar os danos causados pela mucosite induzida por 5-FU.

Palavras-chave: probiótico, *Akkermansia muciniphila*, mucosite intestinal, câncer.

ABSTRACT

5-Fluouracil (5-FU) is a chemotherapy widely used for different types of cancer. Due to the non-selectivity of this drug, different side effects may appear in patients undergoing therapy, such as intestinal mucositis. This condition is characterized by inflammation and ulceration of the gastrointestinal mucosa, and so far there are no curative treatments, but only guidelines related to palliative interventions that seek to improve the quality of life of patients. The use of probiotics has been considered an important therapeutic strategy for the treatment of mucositis, and the bacterium *Akkermansia muciniphila* has stood out due to its anti-inflammatory and immunomodulatory properties. Therefore, the objective of this work was to evaluate the probiotic effect of *A. muciniphila* BAA 835 in a murine model of intestinal mucositis induced by 5-FU. Initially, the dose-response effect, bacterial viability and the best treatment protocol were evaluated. Subsequently, the other clinical, microbiological, immunological, histological and physiological parameters were analyzed. For this, Balb/c mice with mucositis induced with 5-FU (300 mg/Kg), in a single intraperitoneal dose, were used. Our results suggest that the best dose of probiotic was 10^9 CFU, in its viable form and under a preventive protocol, since in these conditions attenuation of weight loss and reduction of intestinal length was observed, in addition to the decrease in MPO and EPO levels in the tissue. Following this treatment protocol, no statistical differences were observed in the food consumption of the treated animals; however, there was a significant improvement in the clinical parameters measured using the daily disease activity index (DAI). The probiotic also improved the integrity of the epithelial barrier, decreasing intestinal permeability and bacterial translocation, in addition to contributing to the preservation of the architecture of the intestine, and attenuation of the loss of goblet cells. *A. muciniphila* also contributed to decreased the levels of enterobacteria in the intestine and expansion of lactic acid bacteria. In addition, a significant increase in the levels of sIgA, circulating lymphocytes, cytokine IL10, and reduction of IL6, IL1 β , TNF, circulating neutrophils, hydroperoxides and the enzyme superoxide dismutase in the tissue were demonstrated. Therefore, oral administration of *A. muciniphila* was able to attenuate the damage caused by mucositis induced by 5-FU.

Key-words: probiotics, *Akkermansia muciniphila*, intestinal mucositis, cancer

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da uracila e do 5-Fluoruracil	20
Figura 2 - Mecanismo de ação do 5-Fluouracil.....	21
Figura 3 - Representação esquemática da parede do trato gastrointestinal.	22
Figura 4 - Representação esquemática da barreira intestinal e seus componentes.	23
Figura 5 - Principais junções celulares encontradas em células epiteliais do intestino delgado, classificadas de acordo com sua função primária.	25
Figura 6 - Diferentes fontes de microrganismos que colonizam estavelmente o TGI de crianças.....	27
Figura 7 - Desenho esquemático das fases da mucosite oral e suas principais características.	29
Figura 8 - Mecanismo de ação dos probióticos no TGI de humanos.....	33
Figura 9 - Possíveis mecanismos de ação de <i>A. muciniphila</i>	33
Figura 10 - Delineamento experimental do modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-Fluoruracil	41
Figura 11 - Efeito dose-resposta de <i>A. muciniphila</i> BAA-835 em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU	51
Figura 12 - Efeito da viabilidade de <i>A. muciniphila</i> BAA-835 em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU	54
Figura 13 - Efeito do protocolo de tratamento, preventivo ou curativo de <i>A. muciniphila</i> BAA-835 em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU	57
Figura 14 - Avaliação do consumo de ração dos animais por gaiola.....	58
Figura 15 - Índice de atividade da doença após indução da mucosite	60
Figura 16 - Avaliação do efeito probiótico de <i>A. muciniphila</i> sobre a mielossupressão e leucopenia ocasionada pelo tratamento com 5-FU	64
Figura 17 - Avaliação dos níveis de sIgA no fluido intestinal.....	65
Figura 18 - Avaliação do estresse oxidativo tecidual e expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias em amostras de íleo de camundongos	69
Figura 19 - Avaliação da permeabilidade intestinal e tranlocação bacteriana	73
Figura 20 - Análise histológica e morfométrica do íleo de camundongos submetidos ao modelo murino de mucosite intestinal	76
Figura 21 - Quantificação de células caliciformes em seções de íleo de animais submetidos ao modelo de mucosite intestinal.....	77

Figura 22 - Quantificação de enterobactérias e bactérias ácido-lática em amostras de fezes de camundongos submetidos ao modelo de mucosite intestinal79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Desenho experimental 1 – Efeito dose-resposta. Grupos experimentais, tratamento e desafio.....	38
Quadro 2 - Desenho experimental 2 – Efeito da viabilidade do probiótico. Grupos experimentais, tratamento e desafio.	39
Quadro 3 - Desenho experimental 3 – Efeito do protocolo de tratamento. Grupos experimentais, tratamento e desafio.	40
Quadro 4 – Escore dos parâmetros utilizados para avaliação do Índice de Atividade da Doença.....	42
Quadro 5 – Sequência dos primers utilizados para quantificação das citocinas pela técnica de qPCR	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento
±	mais ou menos
°C	Grau Celsius
µL	Microlitros
µM	Micromolar
5-FU	5-Fluorouracil
AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
ANOVA	Análise de variância (do inglês <i>analysis of variance</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAL	Bactérias ácido lácticas
BCL2	B-cell lymphoma 2
BHI	Ágar Infuso de Cérebro e Coração (do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>)
BHT	Hidroxitolueno butilado
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEBIO	Centro de Bioterismo
cm	Centímetros
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
cpm	Contagem por minuto
D.O.	Densidade ótica
DAI	Índice de Atividade da Doença
DC	Doença de Crohn
DHFU	Dihidro-fluouracil
DII	Doenças inflamatórias intestinais
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPD	Dehidropirimidina-dehidrogenase
DTPA	Dietileno-triaminopentaacetato
EDTA	Ácido etilenodiamina
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês <i>enzyme immunosorbent assay</i>)
EPO	Peroxidase eosinofílica (do inglês <i>eosinophil peroxidase</i>)

FAO	Organização das Nações Americanas de Alimento e Agricultura (do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FdUMP	Fluorodeoxiuridina monofosfato
FdUTP	Fluorodeoxiuridina trifosfato
FUTP	5-fluouridina trifosfato
<i>g</i>	giros força gravitacional
g	gramas
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino (do inglês <i>gut associated lymphoide tissue</i>)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina e Eosina
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kg	Kilogramas
LP	Lâmina própria
M	Molar
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MBq	Megabecquerel
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Dimetiltiazol-difeniltetrazolium
MUC 2	Mucina 2
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
NB-2	Nível de biossegurança 2

NF-Kb	Fator nuclear kappa B
nm	Nanômetro
OPD	o-fenilenodiamina
p/v	Peso por volume
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PAS	Ácido periódico de Schiff (do inglês <i>periodic acid shiff</i>)
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
q-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RCU	Retocolite ulcerativa
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Rotação por minuto
slgA	Imunoglobulina A secretória
SOD	Superóxido dismutase
TB	Translocação Bacteriana
TBA	Ácido tiobarbitúrico
Tc	Tecnécio
TCA	Ácido Tricloroacético
TGI	Trato gastrointestinal
Th	Linfócito T helper
TLR	Toll like receptors
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
TPP	Trifenilfostina
T _{reg}	Linfócito T regulatório
UA	Unidades arbitrárias
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Câncer	18
1.2. 5-Fluorouracil	19
1.3. Microbiota intestinal	26
1.4. Mucosite intestinal	28
1.5. Probióticos	30
1.6. <i>Akkermansia muciniphila</i>	33
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	35
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo Geral	36
3.2. Objetivos Específicos	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. Microrganismo e condições de cultivo	37
4.2. Animais	37
4.3. Indução da mucosite	38
4.4. Desenho Experimental	38
4.4.1. Efeito dose-resposta	38
4.4.2. Viabilidade do probiótico	39
4.4.3. Protocolo de tratamento	39
4.4.4. Dose, viabilidade e protocolo de tratamento definido	40
4.5. Avaliação clínica dos animais, consumo de ração e comprimento intestinal ..	41
4.6. Relação de enterobactérias e bactérias do ácido lático	42
4.7. Medida da atividade da MPO e EPO	42
4.8. Dosagem de sIgA no conteúdo intestinal	43
4.9. Avaliação da mielossupressão	44
4.10. Contagem de leucócitos circulantes	44

4.11. Quantificação de citocinas por q-PCR	45
4.12. Permeabilidade intestinal.....	45
4.13. Avaliação do estresse oxidativo e da atividade da enzima superóxido dismutase	46
4.14. Análises histológicas.....	46
4.15. Análises estatísticas	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. Screening para determinação de dose, viabilidade e protocolo de tratamento de <i>A. muciniphila</i> na mucosite induzida por 5-FU.....	48
5.1.1. Avaliação da dose-dependência.....	48
5.1.2. Avaliação da viabilidade do probiótico.....	51
5.1.3. Avaliação do protocolo de tratamento.....	54
5.2. Avaliação do consumo alimentar	57
5.3. Avaliação do índice de atividade da doença (DAI)	59
5.4. Avaliação do efeito probiótico de <i>A. muciniphila</i> na mielossupressão e leucopenia ocasionada pelo tratamento com 5-FU.....	61
5.6. Influência do tratamento com <i>A. muciniphila</i> no estresse oxidativo tecidual e na expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias.....	66
5.7. Avaliação da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana.....	70
5.8. Avaliação dos parâmetros histológicos, morfométricos e quantificação de células caliciformes.....	74
5.9. Avaliação da população de enterobactérias e bactérias do ácido lático	78
6. CONCLUSÃO	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXOS	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

Câncer é o termo dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células. Devido à divisão acelerada, estas células são capazes de invadir tecidos e órgãos adjacentes, ou ainda aqueles mais distantes da origem, via corrente sanguínea ou linfática (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2019).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as causas genéticas relacionadas ao surgimento do câncer estão associadas às mutações pontuais em genes denominados proto-oncogenes que, em princípio, encontram-se inativados em células saudáveis. Com a sua ativação, proto-oncogenes tornam-se oncogenes, que são responsáveis por transformar células saudáveis em células cancerosas e, portanto, estão relacionados ao aparecimento e desenvolvimento de tumores (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2019). Somado aos fatores genéticos, fatores exógenos e comportamentais, como, hábitos ou costumes próprios de um ambiente social, e culturais, tais como, tabagismo, hábitos alimentares e sexuais, alcoolismo e radiação solar, contribuem para a transformação celular e aumentam as chances do desenvolvimento do câncer (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

De acordo com a *American Cancer Society*, o câncer é a causa de aproximadamente 1 em cada 6 mortes em todo o mundo, e atualmente é considerada a segunda principal causa de morte, perdendo apenas para doenças cardiovasculares. Dados indicam que 21% dos homens e 18% das mulheres desenvolverão algum tipo de câncer até os 75 anos de idade, e estima-se que em 2040 haverá 27,5 milhões de novos casos e 16,3 milhões de mortes. Assim, o câncer é considerado um dos maiores problemas de saúde pública do mundo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

Apesar da alta incidência e gravidade, o câncer apresenta elevada taxa de cura se diagnosticado e tratado precocemente. O tratamento pode ser realizado por meio de cirurgia oncológica, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Dependendo do tipo de câncer, localização, condição clínica do paciente e extensão da doença, torna-se necessário a combinação de mais de uma modalidade de tratamento (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

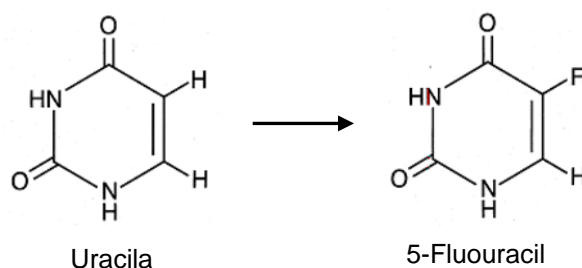
Dentre os tipos de tratamento, a quimioterapia antineoplásica consiste no uso de fármacos que atuam impedindo o crescimento de células cancerígenas, levando-as a processos apoptóticos ou impedindo-as de se dividirem, uma vez que os protocolos quimioterápicos podem ser curativos ou paliativos (SHIELDS, 2017).

O arsenal terapêutico utilizado para o tratamento oncológico é compreendido por diferentes agentes quimioterápicos que são classificados de acordo com seu mecanismo de ação. Dentre estes, incluem-se os agentes alquilantes, antibióticos antitumorais (antibióticos que atuam no DNA matando as células cancerígenas), inibidores da topoisomerase, inibidores mitóticos, corticosteroides e os antimetabólitos, que são fármacos que atuam inibindo a síntese de ácidos nucleicos, como é o caso do 5-Fluorouracil (5-FU) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020; SHIELDS, 2017).

1.2. 5-Fluorouracil

O 5-FU é um dos quimioterápicos mais frequentemente prescritos contra uma variedade de tumores, como os que acometem o trato gastrointestinal (TGI), pâncreas, fígado, mama, ovário, cabeça, pescoço e, principalmente, o cólon e reto (MURESAN-POP *et al.*, 2020; WANG; HAN; ZHANG, 2019). Este foi desenvolvido em 1957, quando se concluiu que o metabolismo da uracila era um alvo potencial para a quimioterapia antimetabólita, após observações de que células de hepatocarcinoma de ratos usavam a uracila mais rapidamente que células dos tecidos normais (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; RUTMAN; CANTAROW; PASCHKIS, 1954).

Tal fármaco é um composto orgânico aromático heterocíclico, com estrutura semelhante à das moléculas de pirimidina. É considerado um antimetabólito análogo da uracila, sintetizado a partir da substituição na posição C-5 de um átomo de hidrogênio por um átomo de flúor (Figura 1) (HEIDELBERGER *et al.*, 1957). Devido à sua estrutura, o 5-FU interfere no metabolismo dos nucleosídeos, podendo ser incorporado ao RNA e DNA, levando à citotoxicidade e morte celular (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

Figura 1 – Estrutura química da uracila e do 5-Fluoruracil.

Fonte: Adaptado de Longley *et al.*, 2003.

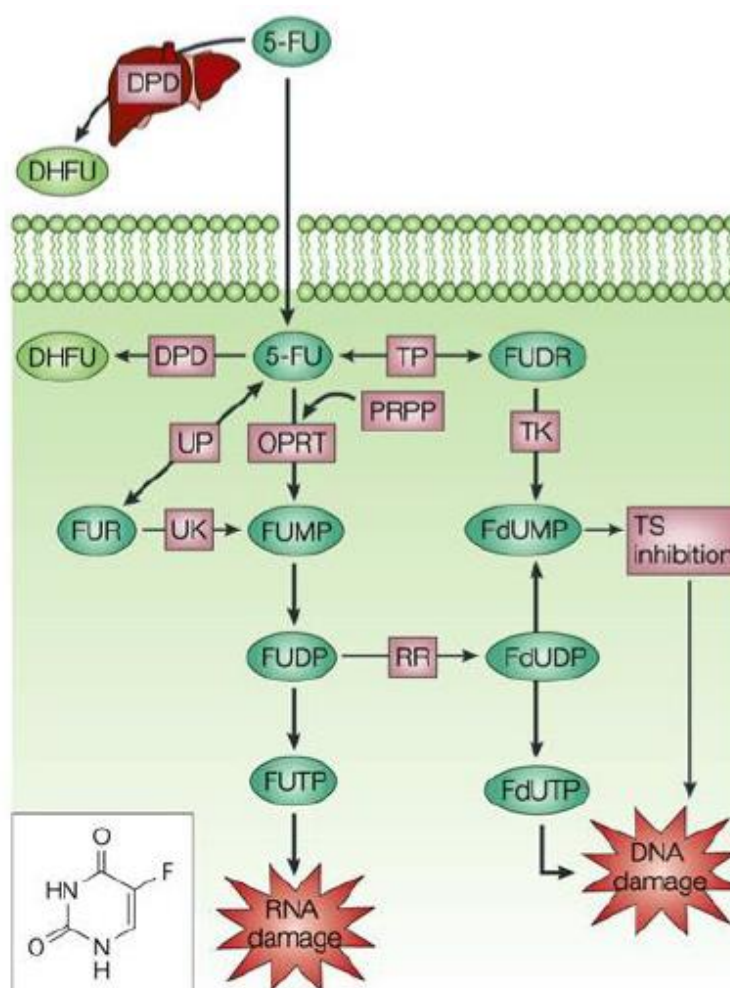
Quando administrado, o 5-FU entra rapidamente nas células por meio do mecanismo de transporte do seu análogo, a uracila. Inicialmente, o quimioterápico é convertido em três metabólitos ativos: fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) e 5-fluoridina trifosfato (FUTP). Aproximadamente 20% da dose administrada ao paciente é convertida nestes metabólitos ativos, e o restante é catabolizado em dihidro-fluouracil (DHFU), por meio da enzima hepática dehidropirimidina-dehidrogenase (DPD) (MIURA *et al.*, 2010).

Cada um dos metabólitos ativos atuará em uma via de ação do composto quimioterápico. O primeiro metabólito, o FdUMP, se liga à enzima timidilato sintase, inibindo-a. Esta enzima, é essencial para catalisar a biossíntese de timidina, necessária para a síntese de DNA. Com a inibição enzimática, ocorre um desbalanço na produção de nucleotídeos, comprometendo a síntese e reparo do DNA. Em consequência, ocorre um aumento da concentração de FdUTP, o segundo metabólito, que por sua vez é capaz de incorporar-se na cadeia de DNA, inibindo a síntese desta molécula. Por último, FUTP incorpora-se ao RNA, gerando danos à sua composição (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; MIURA *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2008). Assim, o mecanismo de ação do 5-FU resume-se à incorporação de fluoronucleotídeos no RNA e DNA, bem como na inibição da enzima timidilato sintase (Figura 2).

A terapia com fluoropirimidinas está associada a ocorrência de diferentes efeitos adversos (MURESAN-POP *et al.*, 2020). Por não fazer distinção entre as células sadias e neoplásicas, o antimetabólito 5-FU resulta em efeitos colaterais graves, como por exemplo, náusea, cardiotoxicidade, leucopenia, alopecia, diarreia, mielossupressão e mucosite (SARA *et al.*, 2018; SONG *et al.*, 2016; THOMAS *et al.*, 2016; WANG; HAN; ZHANG, 2019). Isto ocorre devido a ação do quimioterápico sobre as células hígdas, principalmente sob aquelas que se dividem rapidamente, como as

células da medula óssea e as células epiteliais do TGI (SONG; PARK; SUNG, 2013).

Figura 2 - Mecanismo de ação do 5-Fluouracil. Após administrado, o 5-FU entra nas células e aproximadamente 80% do composto é detoxificado no fígado à um composto inativo. O restante é metabolizado e convertido em três principais metabólitos ativos: fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) e 5-fluorouridina trifosfato (FUTP). FdUMP se liga à enzima timidilato sintase ocasionando um desbalanço de nucleotídeos. Com o aumento da concentração de FdUTP, este metabólito incorpora-se ao DNA, bloqueando sua síntese. Por outro lado, FUTP é incorporado ao RNA, resultando em perda de função com conseqüente morte celular.

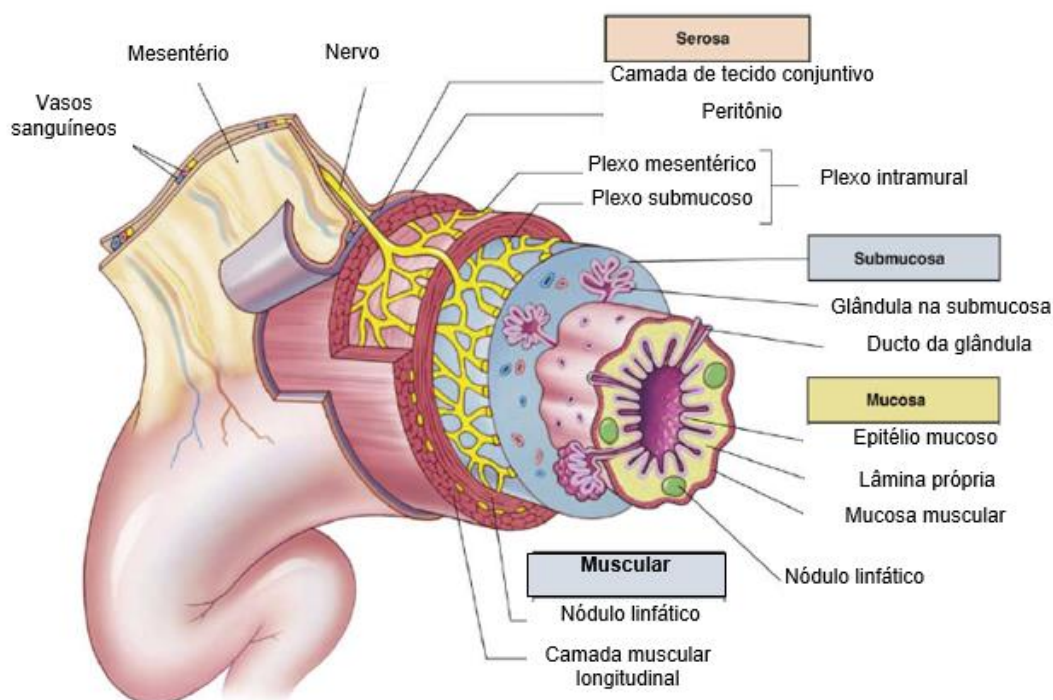


Fonte: Longley *et al.*, 2003.

1.3. Trato gastrointestinal

O TGI é conhecido por suas funções primárias inerentes à saúde do organismo, tais como, digestão, absorção, excreção e proteção (WELLS; SPENCE, 2014). Estas funções são alcançadas por meio de um conjunto de órgãos com papéis distintos que estão dispostos desde a cavidade oral, tendo como segmento terminal o ânus. O TGI é revestido por uma estrutura composta por quatro camadas: serosa, muscular, submucosa e mucosa (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática da parede do trato gastrointestinal.



Fonte: Adaptado de Reed *et al.*, 2009.

A mucosa é a camada mais interna, sendo constituída por um epitélio de revestimento associado a um tecido conjuntivo denominado lâmina própria (LP). A especialização deste tecido correlaciona-se com a função local do TGI, como a resistência ao baixo pH do estômago e a capacidade de absorver substâncias e água no intestino delgado e grosso, respectivamente (CHENG *et al.*, 2010). Além disso, tal camada atua como barreira física contra a invasão de patógenos de importância clínica (MOWAT; AGACE, 2014).

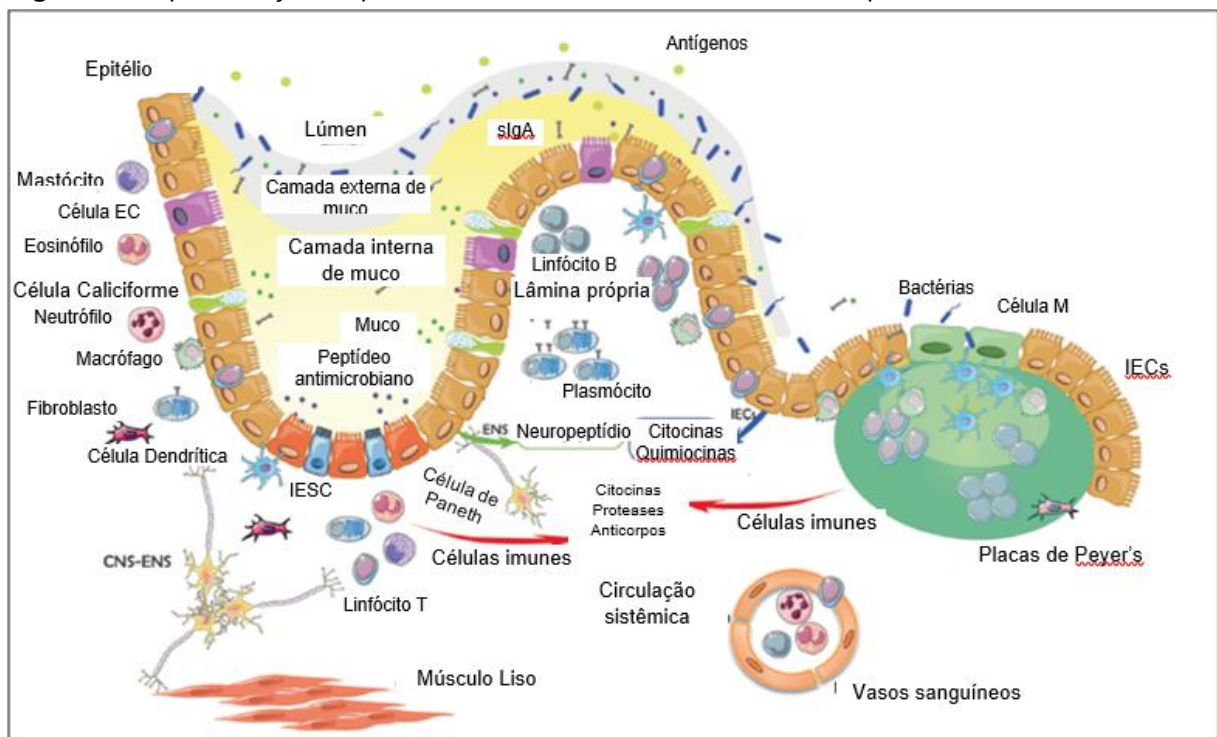
A submucosa é uma camada de tecido conjuntivo adjacente ao epitélio, que compreende vasos sanguíneos e linfáticos, glândulas submucosas e o plexo de *Meissner*, uma importante rede de nervos capaz de controlar a musculatura lisa da camada muscular (REED; WICKHAM, 2009). Em continuidade, a camada muscular externa é formada por uma camada de músculo estriado no TGI superior (boca, faringe e esôfago), que auxilia na deglutição. Ao longo do TGI, a camada muscular externa possui duas camadas musculares lisas, separadas por inervações neuronais que controlam a contração destes músculos, permitindo o peristaltismo dos alimentos presentes no lúmen (REED; WICKHAM, 2009). Por fim, a camada serosa é a camada mais externa da parede do intestino, localizando-se mais distante do lúmen. Esta é

constituída por vasos sanguíneos e linfáticos, tecido adiposo e conjuntivo frouxo, sendo revestida por um epitélio pavimentoso simples, denominado mesotélio (REED; WICKHAM, 2009).

É importante ressaltar que o TGI é considerado o maior compartimento do sistema imunológico, uma vez que a mucosa que o reveste é continuamente exposta a agentes imunomoduladores da dieta, antígenos da microbiota indígena e patógenos externos. Deste modo, a mucosa é considerada a primeira linha de defesa do TGI, constituindo uma barreira física a estes agentes (MOWAT; AGACE, 2014).

Diferentes elementos presentes na mucosa intestinal auxiliam sua função de barreira de defesa física e imunológica. Estes elementos são organizados em diferentes níveis de proteção, de acordo com a localização anatômica e a natureza de seus componentes celulares e extracelulares (SALVO ROMERO *et al.*, 2015). Estes incluem a camada de muco associada à microbiota do intestino, peptídeos antimicrobianos e moléculas de imunoglobulina A secretória (sIgA); a camada celular central composta por células epiteliais especializadas; e, por fim, a LP interna onde as células imunes inatas e adaptativas residem, tais quais, células T, células B, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células dendríticas (SALVO ROMERO *et al.*, 2015; VANCAMELBEKE; VERMEIRE, 2017) (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática da barreira intestinal e seus componentes.



Fonte: Adaptado de Salvo-Romero, *et al.*, 2015.

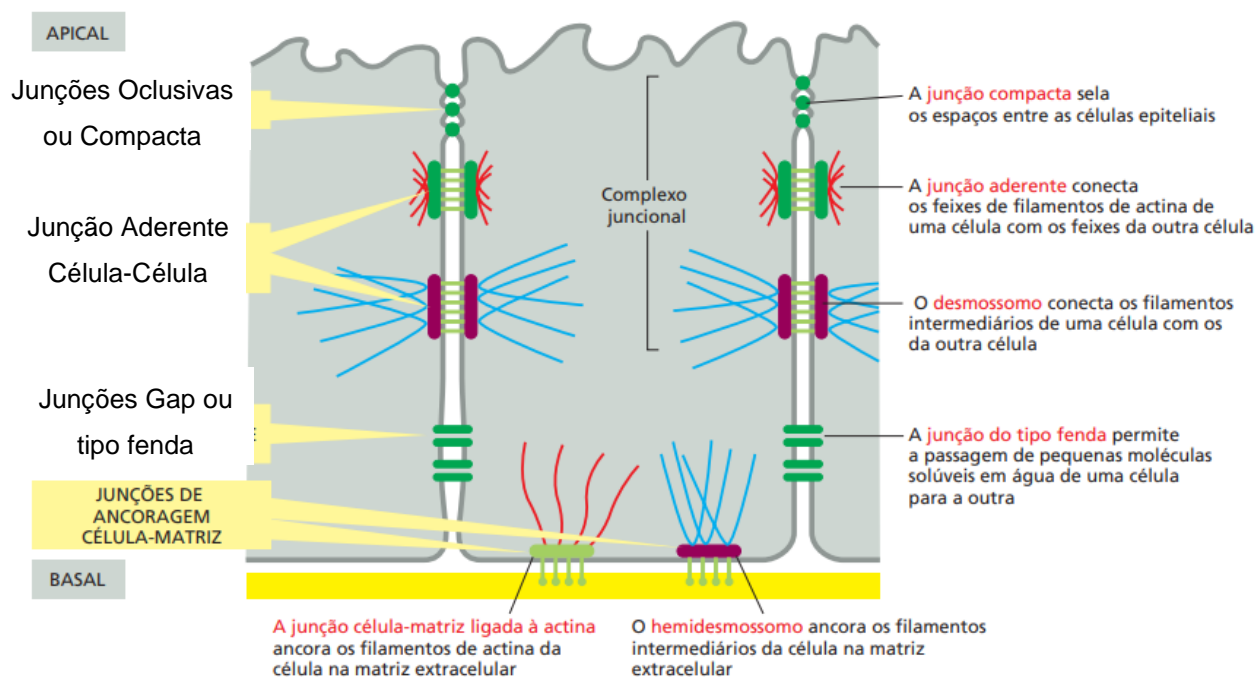
Com relação à camada de muco, as mucinas são os principais constituintes desta camada, sendo a mucina 2 (MUC2) a proteína mais abundante na superfície intestinal (VANCAMELBEKE; VERMEIRE, 2017). Estas proteínas formam uma estrutura semelhante a um gel na superfície do epitélio intestinal, evitando que agentes nocivos sejam capazes de transpor o epitélio (PELASEYED *et al.*, 2014). Por outro lado, a microbiota indígena associada ao muco pode agir por meio de competição pelo nicho ecológico ou nutrientes, ou mais ativamente pela síntese e liberação de metabólitos, como os ácidos graxos de cadeias curtas (AGCC), impedindo a colonização por patógenos (CAMILLERI *et al.*, 2012). Em contrapartida, patógenos e antígenos microbianos podem ser inibidos pela ação de peptídeos antimicrobianos e pela sIgA. Juntos, esses fatores aumentam a função da barreira intestinal e, conseqüentemente, a proteção contra microrganismos exógenos (KÖNIG *et al.*, 2016).

Subjacente à camada de muco, tem-se a camada epitelial. Esta é constituída por uma única camada de células composta por aproximadamente 80% de enterócitos, que são células especializadas na absorção de moléculas e estão organizadas entre as vilosidades e criptas intestinais (GEHART; CLEVERS, 2019). As células que compõem o epitélio intestinal estão conectadas por meio de complexos proteicos denominados *tight junctions*. Tais conexões são formadas principalmente pelas junções oclusivas, junções aderentes, desmossomos e junções *gap*, que funcionam como uma vedação entre as células epiteliais adjacentes, regulando o fluxo transepitelial de íons e solutos entre as células, e bloqueando a passagem paracelular de agentes exógenos (HU *et al.*, 2015) (Figura 5).

As funções desempenhadas pelo epitélio intestinal estão relacionadas a um conjunto de células que o compõem, como as células caliciformes, células de Paneth, células enteroendócrinas e as células M (*Microfold*). As células caliciformes são responsáveis pela produção e secreção de mucinas e peptídeos que são requeridos para a função de crescimento epitelial e reparo da mucosa. As células de Paneth possuem a capacidade de secretar substâncias antimicrobianas, tais como, defensinas e lisozimas, que atuam diretamente no controle da microbiota intestinal. As células enteroendócrinas têm como principal função a produção de diferentes hormônios, como a serotonina que atua no eixo cérebro-intestino (ALLAIRE *et al.*, 2018; GEHART; CLEVERS, 2019). Não menos importante, as células M atuam no

direcionamento de antígenos do lúmen para a LP, de forma que sejam apresentados e processados por células especializadas do sistema imune.

Figura 5 - Principais junções celulares encontradas em células epiteliais do intestino delgado, classificadas de acordo com sua função primária.



Fonte: Adaptado de Alberts, *et al.*, 2017.

Nesta perspectiva, é possível observar a importância da barreira intestinal para a proteção do hospedeiro. Contudo, tal barreira pode ser comprometida por meio de danos estruturais da mucosa, ou alterações em seus componentes reguladores. Tem sido descrito que disfunções na barreira intestinal estão associados a uma gama de doenças, como, doença celíaca, doença inflamatória intestinal (DII) e carcinoma de cólon. Além disso, um fluxo descontrolado de antígenos através do epitélio intestinal, pode comprometer o sistema imune do hospedeiro, iniciando mecanismos inflamatórios no intestino ou em órgãos mais distantes, resultando em doenças extra-intestinais, como, doença hepática crônica (GIORGIO *et al.*, 2014), diabetes do tipo 1 (FASANO, 2011) e obesidade (HAMILTON *et al.*, 2015; VANCAMELBEKE; VERMEIRE, 2017).

Além disso, todo o TGI é colonizado por uma diversificada comunidade bacteriana, sendo a mucosa intestinal particularmente adaptada à colonização por esses microrganismos, que ocorre logo após o nascimento, e é responsável por

modular diferentes funções que influenciam a saúde do hospedeiro (SALVO ROMERO *et al.*, 2015).

1.3. Microbiota intestinal

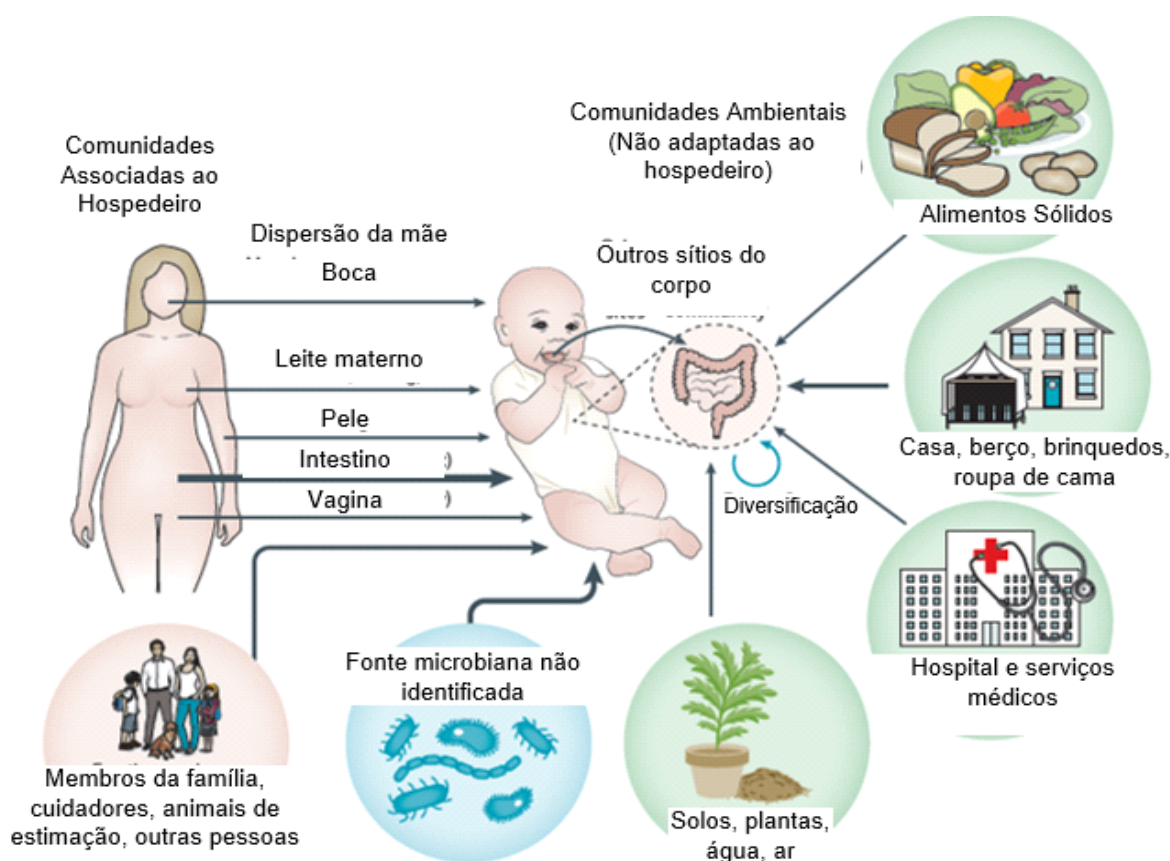
Humanos e outros mamíferos possuem uma complexa microbiota intestinal que é definida como o conjunto de microrganismos que pode causar inúmeras alterações metabólicas e fisiológicas que afetam a saúde do hospedeiro. Neste sentido, os microrganismos são capazes de disponibilizar ao hospedeiro alguns componentes da dieta que, a princípio, se encontram de forma inacessível. Podem também estimular o desenvolvimento do sistema imunológico, atuar na síntese de vitaminas (vitaminas B e K), sinalização endócrina e proteger o hospedeiro contra a invasão e colonização por patógenos (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2016; SPROCKETT; FUKAMI; RELMAN, 2018).

O estabelecimento da microbiota inicia-se após o nascimento e pode ser influenciada pelo tipo de parto, uma vez que a transmissão vertical de microrganismos da mãe para o bebê é fator preponderante para iniciar uma simbiose microrganismo-hospedeiro ao longo da vida (KORPELA *et al.*, 2018). No parto pélvico, os recém-nascidos são expostos a um contato direto com a microbiota vaginal da mãe, permitindo uma colonização microbiana semelhante ao trato vaginal que é composto predominantemente por *Lactobacillus*. Já pela via cesariana, os bebês podem entrar em contato com a pele da mãe, podendo ter uma colonização influenciada por uma comunidade microbiana cutânea, com predominância de *Staphylococcus* (THOMAS *et al.*, 2017). Além destes, outros fatores podem contribuir para que microrganismos de diferentes fontes colonizem o TGI de neonatos (Figura 6), como, o aleitamento materno, as relações afetivas, interação com animais de estimação, visitas a creches e hospitais, além da contínua exposição de microrganismos desconhecidos que estão presentes no ambiente (SPROCKETT; FUKAMI; RELMAN, 2018). A composição da microbiota intestinal muda com a idade do hospedeiro (KUNDU *et al.*, 2017). Por exemplo, em neonatos, é sabido que a colonização se dá inicialmente por um grande número de anaeróbios facultativos. Com a idade, a introdução de alimentos sólidos, e, mais tarde, o influxo de hormônios sexuais associados à puberdade resultam numa maturação da microbiota. Este processo leva a um declínio da população de anaeróbios facultativos e uma maior prevalência por anaeróbios obrigatórios, incluindo *Bacteroides* e espécies do gênero *Clostridium*. Portanto, em adultos, a microbiota

intestinal é considerada mais estável em relação aos primeiros anos de vida (HOOPER, 2004; KUNDU *et al.*, 2017).

Atualmente, alguns autores sugerem que a microbiota do TGI apresenta uma relação de 1:1 quando comparada ao número de células do hospedeiro, e não mais 10:1, como se acreditava anteriormente. Em relação à sua diversidade, em indivíduos adultos saudáveis, a microbiota é dominada por bactérias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, enquanto Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia encontram-se em menor quantidade (SENDER; FUCHS; MILO, 2016; TAP *et al.*, 2009).

Figura 6 - Diferentes fontes de microrganismos que colonizam estavelmente o TGI de crianças.



Fonte: Adaptado de Sprockett *et al.*, (2018).

A importância da colonização pela microbiota intestinal em humanos é bem conhecida e estudos como o de LI e colaboradores (2017) tem sugerido que alterações na homeostase da microbiota intestinal por agentes quimioterápicos está intimamente associada a quadros de mucosite intestinal grave, indicando que a microbiota intestinal está fortemente envolvida no processo patológico da mucosite

intestinal. Além disso, estudos utilizando animais isentos de germes, demonstraram que, na ausência de microbiota, esses animais, quando tratados com agentes quimioterápicos, não desenvolveram mucosite, o que reforça a teoria de que a microbiota está envolvida no desenvolvimento da doença (BRANDI, 2006; PEDROSO *et al.*, 2015).

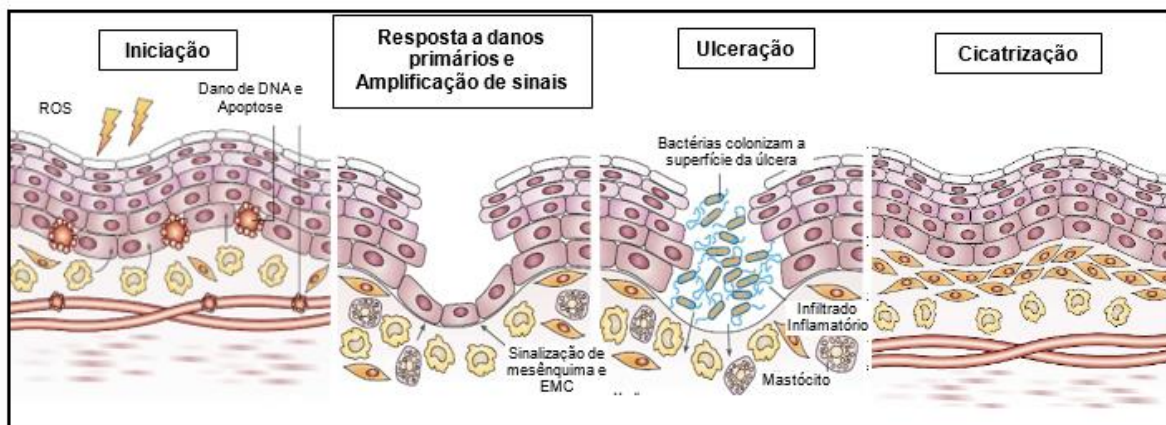
1.4. Mucosite intestinal

A mucosite é um efeito colateral comum da quimioterapia, sendo caracterizada pela inflamação e ulceração da mucosa intestinal (BEUTHEU *et al.*, 2014). Essa doença é considerada um fator limitante no tratamento contra o câncer, justificando interrupções ou redução no tratamento, com consequente aumento da morbidade e mortalidade em pacientes submetidos a esta terapia. Neste cenário, 40% dos pacientes que recebem dose padrão de quimioterápico, e 100% que recebem doses elevadas, apresentam dor, ulceração, inchaço, êmese e diarreia associada à mucosite; portanto, esta é considerada uma condição debilitante. Além disso, tal doença é apontada como fator de risco para infecção por patógenos devido à ruptura da barreira intestinal (ATIQ *et al.*, 2019; BEUTHEU *et al.*, 2014; ZHENG *et al.*, 2019).

Em geral, agentes quimioterápicos induzem a apoptose de células cancerígenas, bem como de células hígdas, principalmente aquelas que se dividem rapidamente. Neste sentido, é importante mencionar que a mucosite intestinal afeta principalmente o intestino delgado, uma vez que os ciclos de substituição da mucosa duram aproximadamente 3 a 4 dias (SONG; PARK; SUNG, 2013). Logo, o desenvolvimento da mucosite é caracterizado pela ocorrência de inflamação, diminuição da barreira epitelial intestinal, danos aos vasos da submucosa e criptas, além de atrofia das vilosidades intestinais, conferindo menor absorção de nutrientes. Também têm sido descrito uma diminuição do número de células calciformes e um desequilíbrio nas *tight junctions* levando ao aumento da permeabilidade intestinal (KEEFE, 2007; LI *et al.*, 2017; STRINGER *et al.*, 2009).

SONIS (2004) descreve uma sequência de eventos biológicos que caracterizam a mucosite como um processo dinâmico dividido em cinco fases: (i) iniciação, (ii) resposta primária ao dano, (iii) amplificação de sinais, (iv) ulceração e (v) cicatrização (Figura 7).

Figura 7 - Desenho esquemático das fases da mucosite oral e suas principais características.



Fonte: Adaptado de Sonis, 2004.

A fase inicial (iniciação) ocorre quando o hospedeiro é exposto à terapia quimioterápica ou radioterápica. Neste momento, devido à inibição da topoisomerase e síntese de timidilato, as células epiteliais, bem como as células do tecido conjuntivo, são acometidas por danos no DNA. Além disso, alterações no RNA levam à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que suprimem a renovação celular, ocasionando dano tecidual (SONIS, 2004).

Em consequência aos danos que ocorrem no DNA e RNA, inicia-se a fase de resposta aos danos primários. No primeiro momento ocorre a ativação de fatores nucleares de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NFκB), aumentando a regulação da transcrição da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), e indução de genes associados à produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL), como IL1β e IL6. Estas citocinas estimulam enzimas pró-apoptóticas (família BCL2 - B-cell lymphoma 2), alterando os mecanismos de crescimento e diferenciação celular, resultando em danos teciduais (SONIS, 2004).

Na fase de amplificação de sinal, as citocinas pró-inflamatórias ativadas agem por meio de um mecanismo de feedback positivo, induzindo as vias que aumentam a produção de citocinas e o estresse oxidativo. Em consequência a esta autorregulação, há um aumento de reações inflamatórias que resultam na ativação de metaloproteinases de matriz, que por sua vez levam a danos teciduais adicionais, principalmente ao epitélio, endotélio e fibroblastos, agravando, desta forma, a lesão (SONIS, 2004).

Na fase sintomática ulcerativa, é observada a perda da integridade da mucosa, onde são desenvolvidas úlceras profundas que permitem a colonização por bactérias

patogênicas (CINAUSERO *et al.*, 2017). Também é observado o encurtamento de vilosidades e o aumento na profundidade das criptas intestinais, além da presença de um infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, que chegam ao local da lesão via quimiotaxia (SONIS, 2004).

Por fim, na última fase (cicatrização), ao final da terapia antineoplásica, moléculas sinalizadoras são emergidas da matriz extracelular ao epitélio ulcerado, induzindo a divisão, migração e diferenciação celular, resultando na restauração da mucosa (BOWEN *et al.*, 2019; SONIS, 2004)

É importante ressaltar que o modelo supracitado foi baseado em dados observacionais da mucosite oral, uma vez que pouco se conhece sobre a fisiologia da mucosite intestinal (SUKHOTNIK *et al.*, 2014) devido às dificuldades em se acessar as lesões. Desta forma, hipóteses têm sido levantadas baseadas em estudos pré-clínicos com animais (FIJLSTRA *et al.*, 2011).

Neste contexto, conhecer melhor a fisiopatologia da mucosite pode possibilitar alterações no tratamento, que conseqüentemente irão resultar na melhoria da qualidade de vida do paciente, durante, e após o tratamento quimioterápico (LOGAN *et al.*, 2007). Nesta perspectiva, estudos recentes como o de QUINTANILHA e colaboradores (2022) tem sugerido o uso de probióticos como um tratamento adjuvante para atenuar os sintomas da mucosite intestinal.

1.5. Probióticos

O termo probiótico tem origem grega e significa “para a vida”. Foi introduzido pela primeira vez em 1908 com base em observações de que indivíduos que viviam na Bulgária apresentavam uma expectativa de vida mais longa em relação ao restante da Europa, fato atribuído à ingestão regular de coalhada (DINAN; QUIGLEY, 2011). Atualmente, os probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

Em linhas gerais, os produtos probióticos devem atender alguns requisitos para serem reconhecidos, tais como, (i) os microrganismos devem estar viáveis e em número adequado quando administrado; (ii) as linhagens devem ser identificadas geneticamente, classificada usando a terminologia mais recente e designada por números, letras ou nomes; (iii) estudos apropriados devem ser projetados usando a linhagem específica no hospedeiro ao qual o mesmo se destina; (iv) as linhagens

demonstradas a conferir um benefício para uma condição podem não ser probiótica para outro fim; (v) linhagens que são designadas como probióticas para humanos, mas estão sendo usadas em estudos com animais, devem ser claramente designadas como probióticos sob teste experimental (HILL *et al.*, 2014; REID; GADIR; DHIR, 2019).

Devido à falta de efetiva regulamentação, muitos produtos têm sido comercializados como probióticos, mas nem todos cumprem com a definição correta. Em muitos casos, estes produtos não são adequadamente testados para garantir que os microrganismos sobrevivam em condições específicas, como, temperatura e ambiente, ou pelo período de tempo de prateleira, de dias até meses, podendo não conferir benefícios à saúde do hospedeiro (DINAN; QUIGLEY, 2011).

Os produtos probióticos estão amplamente difundidos nos setores comerciais como produtos farmacêuticos, alimentos infantis e produtos lácteos. O último é o mais representativo deles, e compõe diferentes preparações, como, iogurtes, leites fermentados, queijos e sorvetes (principalmente em países desenvolvidos) (SAAD, 2006). Tais produtos já movimentaram uma economia de aproximadamente U\$\$ 40 bilhões de dólares e apresentam projeções para atingir mais de U\$\$ 64 bilhões até 2023. Estes dados sugerem que a busca por estes produtos beneficia o crescimento do mercado de probióticos, dado que os consumidores estão cada vez mais conscientes da relação entre nutrição, dieta e saúde (GLOBAL MARKET INSIGHTS INC., 2016; REID; GADIR; DHIR, 2019).

Nesta perspectiva, inúmeros estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar novas linhagens probióticas que apresentam diferentes efeitos protetores devido à modulação da microbiota intestinal (BAUTISTA-GALLEGO *et al.*, 2019). Tais efeitos podem ser observados pela redução da alergia alimentar (MA *et al.*, 2019; MIRANDA *et al.*, 2020) imunomodulação (SHINDE *et al.*, 2019), atenuação da intolerância à lactose (ROŠKAR *et al.*, 2017) e diminuição da inflamação intestinal (RODRIGUES *et al.*, 2018).

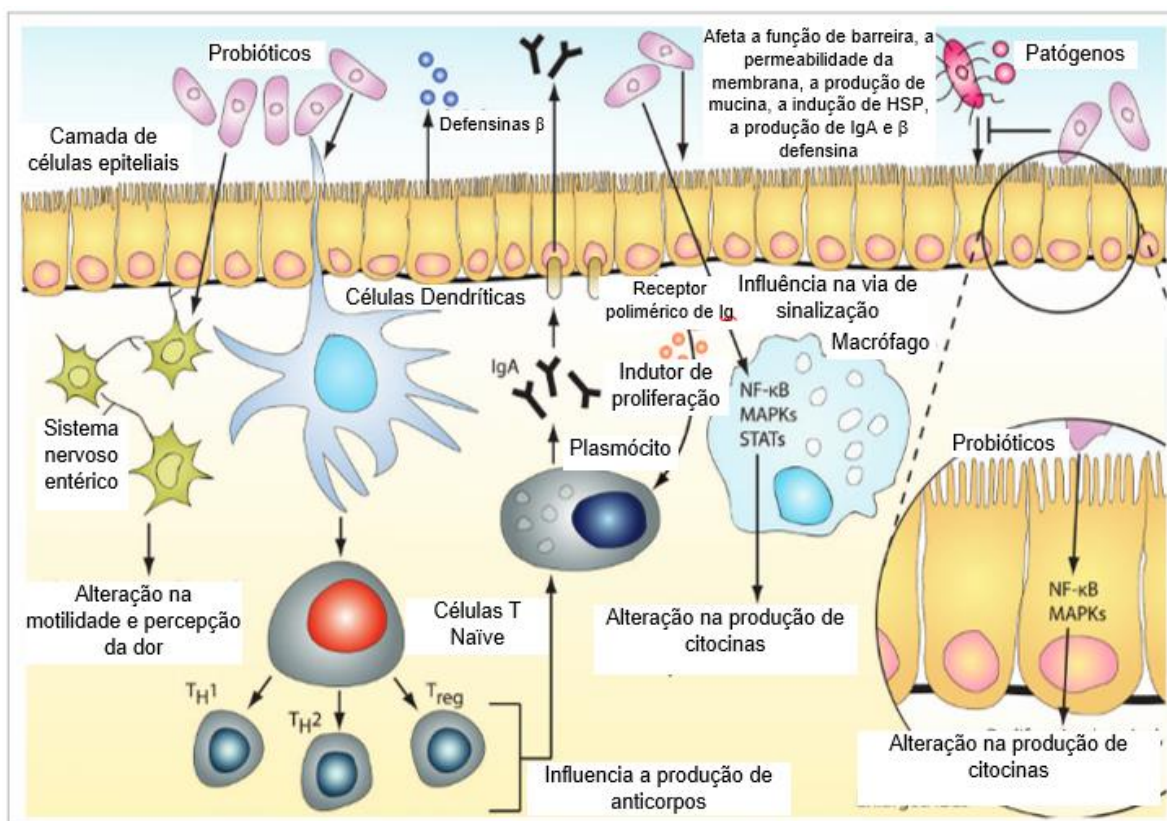
Alguns autores têm demonstrado que os probióticos melhoram o quadro de doenças gastrointestinais, como é o caso da mucosite intestinal. De Jesus e colaboradores (2019) avaliaram os efeitos benéficos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 em modelo murino de mucosite intestinal induzido por 5-FU. Resultados histopatológicos e de permeabilidade intestinal demonstraram que os animais tratados com o probiótico apresentaram preservação das vilosidades e criptas

intestinais, redução da perda de células caliciformes e da presença de infiltrado inflamatório em seções de íleo, além de menor permeabilidade intestinal. Em um estudo semelhante, Tang e colaboradores (2017) demonstraram que o uso de uma mistura probiótica melhorou a lesão da mucosa intestinal, com possível redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, os autores atribuíram a melhora da permeabilidade intestinal ao reestabelecimento da homeostase microbiana (TANG *et al.*, 2017).

Em relação aos possíveis mecanismos desenvolvidos pelos probióticos no TGI de humanos, estes podem beneficiar o hospedeiro comunicando-se com diferentes tipos de células (Figura 8). Via de regra, a função de barreira epitelial é reforçada por meio da modulação nas *tight junctions* das células epiteliais pelos probióticos, bem como na indução da produção de mucina. Podem também suprimir o crescimento de patógenos via estimulação da produção de defensinas β e de IgA pelos plasmócitos, bloqueando diretamente as vias de sinalização desencadeadas pelos patógenos. Por outro lado, os probióticos são capazes de modular as principais vias de sinalização, como NF κ B e MAPK (proteínas cinases ativadas por mitógenos), resultando na secreção de citocinas específicas pelas células epiteliais, macrófagos e células dendríticas. Por meio da interação com as células dendríticas, os probióticos podem influenciar as subpopulações de células T e direcioná-las a uma resposta Th₁, Th₂ ou T_{reg}. Por fim, a motilidade intestinal e a nocicepção podem ser moduladas por meio da regulação da expressão do receptor da dor e da secreção de neurotransmissores (HEMARAJATA; VERSALOVIC, 2013; THOMAS; VERSALOVIC, 2010).

Desta forma, observa-se que os probióticos apresentam diferentes mecanismos que resultam num efeito benéfico sobre o sistema imunológico e sobre o epitélio intestinal que, por sua vez, podem prevenir ou diminuir a inflamação e o dano tecidual, que são comuns em quadros de mucosite intestinal. Sendo assim, é crescente a busca por novos microrganismos que possuam efeitos probióticos capazes de estabelecer tais benefícios ao hospedeiro, como é o caso da *Akkermansia muciniphila*, uma bactéria que vem sendo estudada como potencial probiótico de próxima geração.

Figura 8 - Mecanismo de ação dos probióticos no TGI de humanos.



Fonte: Adaptado de Thomas e Versalovic, 2010.

1.6. *Akkermansia muciniphila*

Akkermansia muciniphila é uma bactéria Gram-negativo, anaeróbia obrigatória, sendo o primeiro isolado pertencente ao filo Verrucomicrobia. Foi originalmente isolada a partir de fezes de uma mulher caucasiana saudável, em um meio contendo mucina como única fonte de carbono (DERRIEN *et al.*, 2004).

Sua capacidade de degradação de mucina fornece uma vantagem ecológica, especialmente em condições de falta de outras fontes dietéticas, exceto mucina (LUKOVAC *et al.*, 2014). Até o momento sua abundância tem sido mais observada no intestino de indivíduos saudáveis, e em menor proporção em pacientes diabéticos (TILG; MOSCHEN, 2014), obesos (KARLSSON *et al.*, 2012), portadores de doenças intestinais (PNG *et al.*, 2010) e desordens metabólicas (BRAHE *et al.*, 2015). Neste contexto, *A. muciniphila* tem sido sugerida como um probiótico altamente promissor com potencial para a prevenção de tais doenças (ZHOU, 2017), contudo, os mecanismos pelos quais *A. muciniphila* exerce efeitos benéficos para saúde ainda não estão bem elucidados.

A princípio, o uso probiótico de um microrganismo capaz de degradar mucina pode parecer incomum devido ao receio em causar prejuízos à camada de muco que

reveste o intestino. Contudo, já foi demonstrado que *A. muciniphila* estimula a taxa de renovação de muco a partir da produção de AGCC, sendo estes a principal fonte de energia para o epitélio do hospedeiro sintetizar e secretar mucina (ZHOU, 2017). Também já foi observado que a administração de *A. muciniphila* aumentou o número de células caliciformes em camundongos (SHIN *et al.*, 2014), e está fortemente associada ao espessamento da camada de muco e a integridade da barreira intestinal em humanos e animais (COLLADO *et al.*, 2007; EVERARD *et al.*, 2013). Tal microrganismo é capaz, ainda, de estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL10), promover o aumento de células T_{reg}, estimular a produção de peptídeos antimicrobianos e regular a integridade da barreira intestinal (DERRIEN; BELZER; DE VOS, 2017; NAITO; UCHIYAMA; TAKAGI, 2018), com consequente diminuição da permeabilidade intestinal (Figura 9). Neste sentido, a modulação do espessamento da camada de muco e da integridade da barreira intestinal são as causas mais prováveis para os efeitos probióticos supracitados, e sugerem que *A. muciniphila* possa ter impacto positivo para a prevenção ou tratamento da mucosite intestinal.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O 5-FU é um antimetabólito frequentemente utilizado para o tratamento de diferentes tipos de câncer. Contudo, a terapia antineoplásica não apresenta seletividade para as células cancerígenas, apresentando efeitos adversos que podem comprometer o prognóstico do tratamento e, conseqüentemente, aumentar a morbidade dos pacientes submetidos a esta terapia. A mucosite intestinal decorrente da quimioterapia é resultado da toxicidade do 5-FU que pode levar a sérios quadros de desidratação, má absorção de nutrientes, ulceração da mucosa intestinal, e conseqüente comprometimento do bem-estar dos pacientes. Desta forma, a mucosite intestinal é considerada um problema recorrente na clínica médica, e apesar dos esforços para se compreender a fisiopatologia da doença, ainda não existe um tratamento eficaz disponível. Deste modo, as atuais diretrizes de tratamento da mucosite se limitam a intervenções paliativas, tornando imprescindível a busca por alternativas terapêuticas capazes de amenizar o desenvolvimento e a gravidade desta doença.

Por sua vez, os probióticos vêm sendo estudados como alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças gastrointestinais, como a mucosite, graças a suas possíveis propriedades anti-inflamatórias. Neste sentido, *A. muciniphila* tem sido considerada como um probiótico de nova geração, uma vez que têm apresentado capacidade de promover efeitos imunomoduladores se destacando devido aos excelentes resultados já obtidos quando utilizada para o tratamento de obesidade, diabetes tipo 2 e inflamação intestinal. Para este último caso, em especial, alguns autores têm demonstrado que *A. muciniphila* é capaz de aumentar o número de células caliciformes e, conseqüentemente, promover o espessamento da camada de muco que reveste o epitélio. Além disso, a estimulação da taxa de renovação da camada de muco, a partir da produção de AGCC, e a produção de peptídeos antimicrobianos também já foram relatadas. Juntos, estes fatores corroboram para a manutenção da função de barreira epitelial e podem contribuir para amenizar os efeitos advindos da mucosite intestinal.

Por fim, sabendo que as propriedades de um probiótico são linhagem dependente, este trabalho propõe avaliar o efeito terapêutico de *A. muciniphila* BAA-835 em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito probiótico de *A. muciniphila* BAA-835 em modelo experimental de mucosite intestinal induzida pelo tratamento antineoplásico com 5-Fluoruracil.

3.2. Objetivos Específicos

- A) Avaliar se o efeito terapêutico de *A. muciniphila* BAA-835 é dependente da dose (10^7 , 10^8 e 10^9 UFC) e da viabilidade do microrganismo (probiótico ou pós-biótico), bem como definir o melhor protocolo de tratamento (preventivo ou curativo) para o tratamento da mucosite induzida, avaliando os sintomas clínicos (perda de peso e comprimento intestinal) e o infiltrado inflamatório (influxo de neutrófilos e eosinófilos) no tecido;
- B) Definir a dose, viabilidade e protocolo de tratamento, e então avaliar os efeitos terapêuticos nos níveis:
- a. Clínico, analisando:
 - i. Consumo de ração;
 - ii. Índice de Atividade da Doença;
 - b. Microbiológico, analisando:
 - i. Relação de enterobactérias e bactérias do ácido lático em amostras de fezes;
 - ii. Translocação bacteriana
 - c. Imunológicos, analisando:
 - i. Quantificação de sIgA no conteúdo intestinal;
 - ii. Nível de mielossupressão e contagem de leucócitos circulantes;
 - iii. Perfil de citocinas no tecido;
 - iv. Estresse oxidativo e atividade da enzima Superóxido Dismutase;
 - d. Fisiológicos, analisando:
 - i. Permeabilidade intestinal;
 - e. Histológico, analisando:
 - i. Escore histológico;
 - ii. Contagem de células calciformes;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo e condições de cultivo

Akkermansia muciniphila BAA-835 (DSM 22959) foi obtida da Coleção Alemã de Microrganismos e Cultura de Células (GMBH). Culturas estoques foram preservadas em glicerol 20% e ativadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion* – Sigma-Aldrich, Merck) suplementado com hemina (0,1%), menadiona (0,1%), extrato de levedura (0,5%), L-cisteína (0,5 g/L) e mucina (0,1%) (Sigma, Merck KGaA, St. Louis, MO, USA). A cultura foi incubada a 37°C por 48 horas em jarra anaeróbica, utilizando o Kit Comercial ANAEROBAC® (Probac, São Paulo, Brasil) como sistema de geração de anaerobiose. Após crescimento, a concentração bacteriana foi ajustada para 10⁸, 10⁹ e 10¹⁰ UFC/mL. Para inativação, a cultura foi centrifugada (9500 rpm, 10 minutos) (Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific, Osterode am Harz, Alemanha) e o *pellet* ressuspensão em solução salina (0,9%), e colocado em banho-Maria a 72°C, 10 minutos. Para confirmação da inativação bacteriana, a cultura foi estriada em ágar BHI suplementado com hemina e menadiona (0,1%), extrato de levedura (5 g/L), sangue de carneiro desfibrinado (5%) e mucina (0,1%), seguido de incubação a 37°C por 72 horas.

4.2. Animais

A manutenção e o uso dos animais nos experimentos foram conduzidos respeitando as normas estabelecidas pelo “Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal” (CONCEA) (BRASIL, 2008). Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, convencionais, de seis a oito semanas de idade, da linhagem BALB/c, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB/UFMG. Para os experimentos, os camundongos foram mantidos em mini-isoladores modelo ALE.MIL.01.03 (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), no biotério do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, nível de biossegurança 2 (NB-2). Os animais receberam ração sólida (Nuvital, Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil) esterilizada por calor úmido e água filtrada *ad libitum*. O controle de fotoperíodo (ciclo diurno/noturno de 12 horas), aeração, umidade (60-80%) e temperatura (22 ± 1°C) foram mantidos no biotério. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo este procedimento precedido por anestesia geral com solução de cetamina/xilazina (80 mg/kg de cetamina e 15 mg/kg de xilazina) (WIRTZ *et al.*, 2007). Para o desenvolvimento

experimental foram utilizados 7 animais por grupo, sendo este, o número amostral necessário para que as variáveis analisadas fossem significativas. Além disso, todos os experimentos propostos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) (Anexo 1).

4.3. Indução da mucosite

Para indução da mucosite, foi utilizado o quimioterápico 5-FU (Fauldfluour®, Libbs, São Paulo, SP, Brasil). Os animais receberam dose única de 300 mg/kg, no dia zero (desafio), por via intraperitoneal (i.p.), e sacrificados no terceiro dia após a administração do quimioterápico, conforme descrito por MAIOLI e colaboradores (2014). Como controle, foi utilizada solução salina (0,9%) estéril, pela mesma via.

4.4. Desenho Experimental

4.4.1. Efeito dose-resposta

Com o objetivo de avaliar se o efeito probiótico é dose-dependente, os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais (n = 7 animais/grupo), sendo estes: **I – CTL** (Controle), **II – BAA-835** (Controle Probiótico), **III – 5-FU** (Controle Mucosite), **IV – BAA-835 10⁹ UFC + 5-FU** (tratamento com dose diária de *A. muciniphila* 10⁹ UFC e mucosite induzida), **V – BAA-835 10⁸ UFC + 5-FU** (tratamento com dose diária de *A. muciniphila* 10⁸ UFC e mucosite induzida) e **VI – BAA-835 10⁷ UFC + 5-FU** (tratamento com dose diária de *A. muciniphila* 10⁷ UFC e mucosite induzida), como apresentado na Quadro 1.

Quadro 1 - Desenho experimental 1 – Efeito dose-resposta. Grupos experimentais, tratamento e desafio.

Grupos Experimentais	Tratamento (via intragástrica)	Desafio (via intraperitoneal)
CTL	Salina 0,9%	Salina 0,9%
BAA-835	0,1 mL de <i>A. muciniphila</i>	Salina 0,9%
5-FU	Salina 0,9%	5-FU (300 mg/Kg)
BAA-835 10 ⁷ + MUC	0,1 mL de <i>A. muciniphila</i> viável (10 ⁷ UFC)	5-FU (300 mg/Kg)
BAA-835 10 ⁸ + MUC	0,1 mL de <i>A. muciniphila</i> viável (10 ⁸ UFC)	5-FU (300 mg/Kg)
BAA-835 10 ⁹ + MUC	0,1 mL de <i>A. muciniphila</i> viável (10 ⁹ UFC)	5-FU (300 mg/Kg)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para isso, foram analisados o comprimento intestinal, perda de peso e o infiltrado inflamatório (influxo de neutrófilos e eosinófilos no tecido). Definido a melhor

dose probiótica, avaliou-se então a viabilidade do probiótico (bactéria ativa vs. bactéria inativa).

4.4.2. Viabilidade do probiótico

A avaliação da administração probiótica ou pós-biótica no tratamento da mucosite induzida foi conduzida por meio de 5 grupos experimentais (n= 7 animais/grupo), sendo estes: **I – CTL** (Controle), **II – BAA-835** (Controle Probiótico), **III – 5-FU** (Controle mucosite), **IV – BAA-835_{ativa} + 5-FU** (tratamento com probiótico ativo e mucosite induzida) e **V – BAA-835_{inativa} + 5-FU** (tratamento com probiótico inativo – pós-biótico - e mucosite induzida), como apresentado na Quadro 2.

Quadro 2 - Desenho experimental 2 – Efeito da viabilidade do probiótico. Grupos experimentais, tratamento e desafio.

Grupos Experimentais	Tratamento (via intragástrica)	Desafio (via intraperitoneal)
CTL	Salina 0,9%	Salina 0,9%
BAA-835	0,1 mL de <i>A. muciniphila</i>	Salina 0,9%
5-FU	Salina 0,9%	5-FU (300 mg/Kg)
BAA-835 _{ativa} + MUC	0,1 mL de <i>A. muciniphila</i> viável	5-FU (300 mg/Kg)
BAA-835 _{inativa} + MUC	0,1 mL de <i>A. muciniphila</i> inativa	5-FU (300 mg/Kg)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os mesmos parâmetros citados anteriormente foram analisados, e após a definição do efeito da viabilidade do probiótico, avaliou-se o melhor protocolo de tratamento (tratamento preventivo e tratamento curativo).

4.4.3. Protocolo de tratamento

Com o objetivo de definir o melhor protocolo de tratamento para mucosite intestinal, foram testados os protocolos preventivo e curativo. Para o protocolo preventivo, os animais receberam o probiótico 10 dias antes da indução da mucosite e durante todo o período de indução da doença, até o dia do sacrifício (14^o dia). Já para o protocolo curativo, os animais receberam o tratamento apenas a partir do dia da indução da doença (dia 0), até o 14^o dia. Para tal, os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos experimentais (n= 7 animais/grupo) sendo estes: **I – CTL** (Controle), **II – BAA-835** (Controle Probiótico), **III – 5-FU** (Controle Mucosite), **IV – BAA-835_{preventivo} + 5-FU** (tratamento probiótico preventivo com mucosite induzida) e

V – BAA-835_{curativo} + 5-FU (tratamento probiótico curativo com mucosite induzida), conforme demonstrado na Quadro 3.

Quadro 3 - Desenho experimental 3 – Efeito do protocolo de tratamento. Grupos experimentais, tratamento e desafio.

Grupos Experimentais	Tratamento / Tempo de Protocolo(dias) (via intragástrica)	Desafio (via intraperitoneal)
CTL	Salina 0,9% (14 dias)	Salina 0,9%
BAA-835	0,1 mL de <i>A. muciniphila</i> (14 dias)	Salina 0,9%
5-FU	Salina 0,9% (14 dias)	5-FU (300 mg/Kg)
BAA-835 _{Preventivo} + 5-FU	0,1 mL de <i>A. muciniphila</i> (14 dias)	5-FU (300 mg/Kg)
BAA-835 _{Curativo} + 5-FU	0,1 mL de <i>A. muciniphila</i> (4 dias)	5-FU (300 mg/Kg)

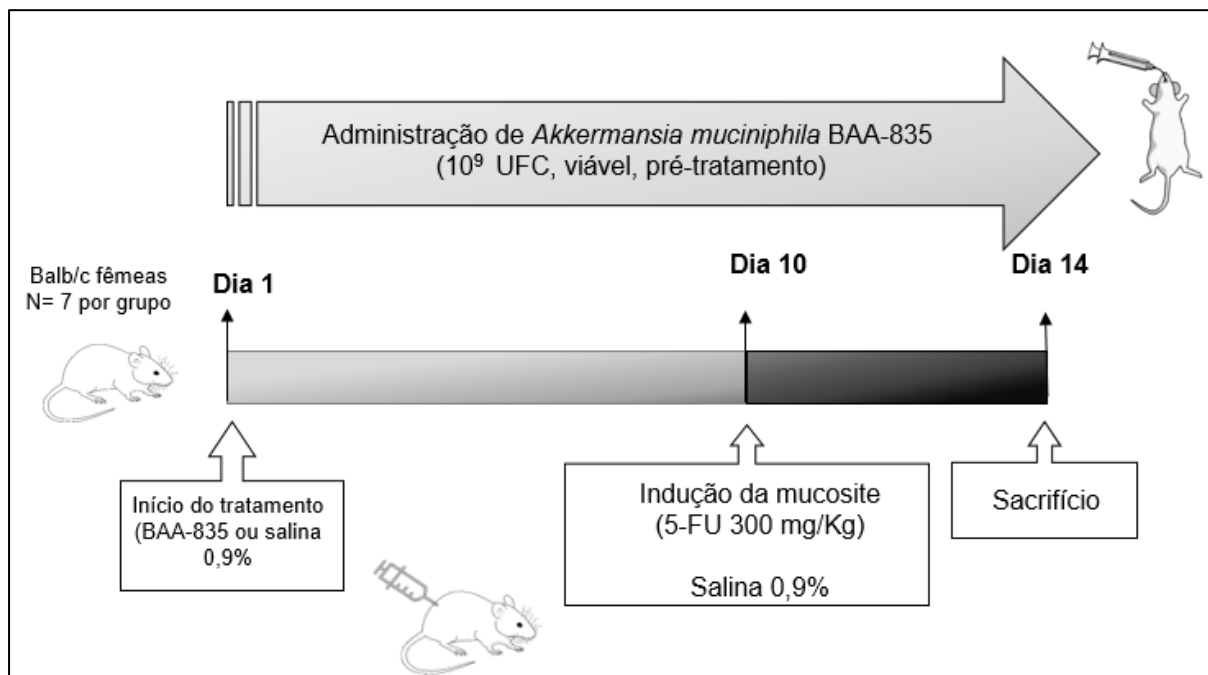
Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram analisados a perda de peso, comprimento intestinal e o infiltrado inflamatório (influxo de neutrófilos e eosinófilos no tecido). Por fim, definidos a dose, viabilidade e protocolo de tratamento, foram avaliados os demais parâmetros clínicos, microbiológicos, imunológicos e histológicos.

4.4.4. Dose, viabilidade e protocolo de tratamento definido

Após definição da melhor abordagem terapêutica para mucosite induzida, a experimentação animal foi realizada conforme Figura 10. Os animais foram avaliados diariamente, em horário fixo, quanto à perda de peso e o consumo alimentar. A partir do dia da indução da doença (dia 0) até o final do protocolo experimental (14^o dia), as fezes foram coletadas para verificação de sua consistência, bem como a presença ou ausência de sangue oculto. Amostras de fezes, apenas do último dia, também foram utilizadas para avaliação da relação entre enterobactérias e bactérias do ácido lático na microbiota intestinal. Os animais foram anestesiados e procedeu-se com a coleta de sangue para contagem diferencial de células sanguíneas, avaliação da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana. Em seguida, foram sacrificados por deslocamento cervical, e fragmentos do intestino delgado (íleo) foram coletados para dosagens de mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO), citocinas e estresse oxidativo. Órgãos como pulmão, baço, coração, fígado, linfonodos mesentéricos e rins foram excisados para avaliação da translocação bacteriana, enquanto o conteúdo intestinal foi coletado para dosagem de sIgA e o fêmur removido para avaliação da mielossupressão.

Figura 10 - Delineamento experimental do modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-Fluoruracil. Camundongos Balb/c fêmeas foram divididos aleatoriamente (n = 7 por grupo), e receberam solução salina estéril (CTL e 5-FU) ou *A. muciniphila* BAA-835 10^9 UFC, viável (BAA-835 e BAA 835 + 5-FU) por gavagem oral durante todo o protocolo experimental. Mucosite foi induzida por uma única dose de 5-FU intraperitoneal no dia 10 (5-FU e BAA 835 + 5-FU) ou salina (CTL e BAA-835). No dia 14, os camundongos foram sacrificados e amostras de fezes, sangue, órgãos e tecido foram coletadas para análises.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5. Avaliação clínica dos animais, consumo de ração e comprimento intestinal

A avaliação clínica dos animais foi baseada em um escore acumulativo (0 – 9) pela análise de três parâmetros diferentes: 1) consistência das fezes; 2) avaliação da presença de sangue nas fezes por meio do Kit Feca-Cult (Inlab, São Paulo, SP, Brasil); e 3) perda de peso dos animais (Quadro 4). Por questão de ética em experimentação animal, os animais que por ventura, perdessem 20% ou mais do peso, seriam sacrificados e seus dados excluídos das análises. Contudo, é importante ressaltar que nenhum animal atingiu este nível de gravidade e, portanto, não foi necessário realizar este procedimento (COUTINHO *et al.*, 2022).

Quadro 4 – Escore dos parâmetros utilizados para avaliação do Índice de Atividade da Doença.

Escore Acumulativo - Índice de Atividade da Doença			
Parâmetros Pontuação	Consistência das Fezes	Presença de Sangue nas Fezes	Perda de Peso
0	Endurecidas e bem formadas	Negativo para presença de sangue oculto	Menos que 1% de perda de peso
1	Pouco umedecidas com aspecto brilhante, porém formadas	Positivo para presença de sangue oculto	1 a 5% de perda de peso
2	Não formadas (pastosas)	Sangue visível nas fezes	6 a 10% de perda de peso
3	Não formadas (aquosas)	Sangramento Retal	11 a 20% de perda de peso
4	-	-	Mais de 20% de perda de peso

Fonte: Adaptado de Quintanilha *et al.*, 2022.

Para o consumo alimentar, a ração foi pesada diariamente antes e após a indução da doença e os dados foram expressos como média do consumo de ração (grama) por gaiola (SOUZA *et al.*, 2016). Para mensuração do comprimento intestinal, o intestino delgado, que compreende a porção distal à incisão sobre o piloro até a válvula íleo-cecal foi removido e medido com uma régua milimetrada, e os resultados expressos em centímetros.

4.6. Relação de enterobactérias e bactérias do ácido láctico

A quantificação de enterobactérias e bactérias ácido-láticas foi realizada conforme descrito anteriormente por QUINTANILHA *et al.*, (2022). Após coleta das fezes, as amostras foram pesadas e homogeneizadas em função do peso, numa diluição 10^{-2} , em PBS estéril, e então novas diluições decimais foram realizadas. Alíquotas de 25 μ L foram semeadas em ágar MacConkey (Difco, Sparks, EUA), e ágar de Man, Rogosa & Sharpe (MRS, Merck, Darmstadt, Alemanha), e então as placas foram incubadas em condições aeróbicas a 37°C durante 24-48 horas. As contagens bacterianas foram expressas em \log_{10} UFC/g de fezes.

4.7. Medida da atividade da MPO e EPO

A avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) foram utilizadas como índice de recrutamento de neutrófilos e

eosinófilos no tecido, respectivamente. Sumariamente, 100 mg de tecido foram homogeneizados em 1,9 mL de solução tampão salina-fosfato (0,1 M NaCl, 0,02 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, 0,015 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, pH 7,4) utilizando um homogeneizador de tecidos. O homogenato foi centrifugado a 10000 rpm, 10 minutos, 4°C, e os *pellets* submetidos a lise hipotônica (500 μL NaCl a 0,2%), e a osmolaridade restaurada pela adição de volume igual de solução salina 1,6%, contendo glicose a 5%. As amostras foram centrifugadas (10000 rpm, 10 minutos, 4°C), e os *pellets* ressuspensos em 1,9 mL de 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio em tampão fosfato (PBS-HTAB). As amostras foram novamente homogeneizadas e submetidas a choque térmico por meio de três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, e então, centrifugadas por 15 minutos a 10000 rpm, 4°C.

Para quantificação de MPO, 25 μL do sobrenadante foram adicionados a 25 μL de 1,6 mM 3,3,5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB-Sigma-Aldrich, EUA) seguido da adição de 100 μL de H_2O_2 0,5 mM. A solução foi incubada a 37°C por 5 minutos. Para avaliação de EPO, 75 μL de sobrenadante foram adicionados a 75 μL de substrato [1,5 mM de o-fenilenodiamina (OPD-Sigma-Aldrich, EUA), solubilizado em 0,075 mM de Tris-HCl e 6,6 mM de H_2O_2] e incubado a 20°C por 30 minutos, ao abrigo da luz. Ambas as reações foram interrompidas pela adição de 50 μL de 1 M H_2SO_4 , e a absorbância lida a 450 nm (MPO) e 492 nm (EPO) utilizando um espectrofotômetro de microplaca (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Os resultados foram expressos em D.O. (SOUZA *et al.*, 2000).

4.8. Dosagem de sIgA no conteúdo intestinal

Os níveis de sIgA no fluido intestinal foram determinadas por método imunoenzimático (ELISA), conforme descrito por MARTINS e colaboradores (2009). Após o sacrifício dos animais, o intestino delgado foi removido e seu conteúdo coletado, pesado e ressuspensão em PBS (pH 7,2) previamente suplementado com um coquetel anti-protease (1 μM de aprotinina, 25 μM de leupeptina, 1 μM de pepstatina e 1 mM de PMSF), na proporção de 500 mg de conteúdo intestinal por 2,0 mL de PBS. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (9.000 rpm, 30 minutos, 4°C) (Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific, Osterode am Harz Alemanha), e o sobrenadante recolhido. Para o revestimento das microplacas foi utilizado o anticorpo IgA anti-camundongo desenvolvido em cabra, enquanto que para a detecção foi utilizado o IgA anti-camundongo biotilado. Para o desenvolvimento de cor, utilizou-

se o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e a absorbância a 492 nm foi determinada em espectrofotômetro de microplaca (Epoch). Um padrão de IgA de camundongo purificado (Southern Biotechnology, Birmingham, EUA) foi usado para determinar as concentrações da imunoglobulina, e os resultados expressos em µg/g de fluido intestinal.

4.9. Avaliação da mielossupressão

Para avaliação da mielossupressão, foi procedida uma incisão na região acima do acetábulo, permitindo a remoção do fêmur e tibia. Em seguida, o músculo foi removido para expor o canal medular, e as extremidades epifisárias foram cortadas. A medula foi lavada com uma seringa de 26 gauge utilizando PBS 1X, e a suspensão celular obtida foi centrifugada a 1200 rpm (Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific, Osterode am Harz Alemanha) por 10 minutos. O *pellet* obtido foi ressuspensão em 2 mL de solução de lise de hemácias 1X, e incubado a 37°C por 5 minutos. Em seguida, 4 mL de PBS 1X foi adicionado, e a solução obtida foi centrifugada a 1200 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 1 mL de PBS 1X. Para contagem total das células, 5 µL da suspensão de células foi diluído em 95 µL de Turck, e uma alíquota de 10 µL foi utilizada para contagem celular total em câmara de *Neubauer*. Os resultados foram mensurados utilizando a seguinte fórmula:

$$Q = \frac{40 \times 10^4 \times 1 \text{ mL} \times (\text{n}^\circ \text{ de células})}{4}$$

Sendo,

Q= quantidade de células encontradas

40 = 10 µL x número de quadrantes da câmara de *Neubauer*

10⁴ = fator de correção

1 mL = volume final da ressuspensão celular

(÷4) = número de quadrantes da câmara de *Neubauer*

Para medula, o número de células se encontra na faixa de 10⁷ células/mL.

4.10. Contagem de leucócitos circulantes

Para contagem diferencial de leucócitos, a análise tipológica das células foi realizada por microscopia óptica em esfregaço de sangue fixado com metanol por

cinco minutos e corado com coloração de Wright-Giemsa. A quantificação de neutrófilos e eosinófilos foram realizadas utilizando critérios morfológicos padrão por meio da contagem de pelo menos 100 células.

4.11. Quantificação de citocinas por q-PCR

Para avaliação da expressão gênica quantitativa, fragmentos de íleo foram coletados em microtubos RNase-free contendo 150 µL de RNA later (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) e armazenados a -80°C para análise posterior. Sumariamente, o RNA total foi extraído utilizando TRIzol (Ludwig Biotec, Alvorada, RS, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante, e avaliado qualitativamente e quantitativamente por gel de agarose 1,5% e NanoDrop® 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Posteriormente, DNase I (Invitrogen, Waltham, WA, USA) foi utilizada para digerir o DNA genômico residual, e o cDNA das amostras foi sintetizado utilizando o kit Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher), seguindo as recomendações do fabricante. Para execução da PCR quantitativa (qPCR), foi utilizando o cDNA, o kit PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (ThermoFisher) e os primers específicos dos genes de interesse descritos na Quadro 5, para as citocinas IL10, IL6, IL1β e TNF. Os ciclos de amplificação foram realizados nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto no aparelho Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR System. A expressão de genes alvos foi analisada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando β-actina como referência endógena.

Quadro 5 - Sequência dos primers utilizados para quantificação das citocinas pela técnica de qPCR

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
β actina	GCTGAGAGGGAAATCGTGCGTG	CCAGGGAGGAAGAGGATGCCG
IL 10	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT
IL 1β	CTCCATGAGCTTTGTACAAGG	TGCTGATGTACCAGTTGGGG
IL 6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
TNF α	ACGTGGAAGTGGCAGAAGAG	CTCCTCCACTTGGTGGTTTG

Fonte: Barroso *et al.*, 2022

4.12. Permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi determinada medindo a radioatividade do sangue após administração oral do ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA)

marcado com tecnécio-99m (^{99m}Tc). Ao final do protocolo experimental, os camundongos receberam 0,1 mL de solução de ^{99m}Tc -DTPA com 10 MBq de atividade, por gavagem. Passadas 4 horas da administração intragástrica, os animais foram anestesiados e o sangue coletado, pesado e armazenado em tubos apropriados. Os níveis de radioatividade nas amostras foram determinados utilizando um contador gama automatizado (PerkinElmer Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter, PerkinElmer, Waltham, MA), e os dados expressos como porcentagem da dose por grama de sangue (% dose/g) como previamente descrito por ANDRADE e colaboradores (2016).

4.13. Avaliação do estresse oxidativo e da atividade da enzima superóxido dismutase

Fragmentos de íleo (100 mg) foram coletados e homogeneizados com 1 mL de PBS gelado e centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos, temperatura ambiente. O sobrenadante foi recuperado e analisado para os ensaios de concentração de hidroperóxidos e da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), conforme descrito por Quintanilha e colaboradores (2022). Todos os resultados foram normalizados pela concentração total de proteínas presente no tecido, sendo esta concentração determinada através do método de Lowry *et al.* (1951).

4.14. Análises histológicas

Seguindo a metodologia descrita por Arantes e Nogueira (1997), sessões de íleo foram coletadas, abertas longitudinalmente sobre um papel filtro, cuidadosamente lavadas e processadas por microtomia. Resumidamente, os tecidos foram pré-fixados em solução *Bouin* 2%, e enrolados da porção distal em direção à proximal, (rolos *swiss*), e então, fixados em formaldeído tamponado a 4% por 24 horas. As amostras foram processadas para inclusão em parafina e submetidas à microtomia para obtenção de cortes histológicos de 4 μm de espessura. As lâminas resultantes foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) ou ácido periódico de Schiff (PAS). As alterações na arquitetura da mucosa e o infiltrado de células polimorfonucleares foram avaliadas nas lâminas de coloração HE, usando um sistema de classificação histopatológica (SOARES *et al.*, 2008), enquanto que lâminas coradas com PAS foram usadas para quantificação de células calciforme. As imagens utilizadas para exame morfológico, e contagem de células calciformes foram capturas em aumento de 10

e 40x, respectivamente, usando um microscópio óptico BX41 (Olympus, Tóquio, Japão), e processadas usando o software ImageJ 1.5j.8 (NIH, Bethesda, MD, EUA). A altura das vilosidades e a profundidade das criptas foram medidas e suas proporções foram calculadas, utilizando o software ImageJ. A análise foi realizada por um único patologista que desconhecia as condições experimentais de cada amostra.

4.15. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey ou Bonferroni usando o software GraphPad Prism versão 7.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Os resultados foram apresentados como média \pm desvio-padrão, sendo considerado significativo valores com $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Screening para determinação de dose, viabilidade e protocolo de tratamento de *A. muciniphila* na mucosite induzida por 5-FU

5.1.1. Avaliação da dose-dependência

O uso de probióticos em aplicações clínicas é de fato significativo, uma vez que inúmeros estudos têm sido conduzidos a fim de identificar linhagens probióticas que apresentam efeitos protetores devido à modulação da microbiota (BAUTISTA-GALLEGO et al., 2019; COUTINHO et al., 2022; MIRANDA et al., 2020; QUINTANILHA et al., 2022). Desde 1960, diversos estudos clínicos foram descritos na literatura apontando o uso de probióticos como possíveis tratamentos terapêuticos para infecções gastrointestinais (VIEIRA et al., 2007), e mais recentemente o número de doenças potencialmente tratáveis com probióticos é crescente. Contudo, não existe um consenso a respeito da dose apropriada, uma vez que a dificuldade em se fixar um valor para a dosagem correta é influenciada pela escolha do probiótico, o benefício esperado, o veículo de entrega e sua via de administração (OUWEHAND, 2017). Além disso, a definição de probióticos limita-se à administração de uma “quantidade adequada” para obter um benefício para a saúde (FAO/WHO, 2002; FORSSTEN; OUWEHAND, 2020). No entanto esta quantidade não é padronizada, gerando imprecisão a respeito da dosagem necessária. Erroneamente, acredita-se que as doses probióticas devem ser necessariamente elevadas para garantir o benefício desejado (SAAD, 2006). Porém, há relatos de que doses mais baixas também possam resultar na eficácia do tratamento (GOTOH et al., 2020; LI et al., 2012). No Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), define que a quantidade mínima viável se encontra na faixa de 10^8 – 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para consumo (ANVISA, 2008), sendo estas as dosagens mais frequentemente administradas.

Diante das imprecisões a respeito da definição da melhor dose probiótica e da insuficiência de pesquisas relacionadas à dose-resposta, nossos estudos foram conduzidos com o objetivo de determinar a melhor dose de *A. muciniphila*, necessária para o tratamento da mucosite intestinal induzida por 5-FU. Para tal, avaliou-se parâmetros comuns em quadros de mucosite, como o encurtamento do comprimento intestinal, a perda de peso e a migração de neutrófilos e eosinófilos no tecido por meio da dosagem das enzimas MPO e EPO.

Dentre estes parâmetros, o encurtamento do intestino delgado é uma característica macroscópica frequentemente observada, que se correlaciona com a diminuição do peso corpóreo em animais com mucosite induzida. Isto ocorre porque agentes quimioterápicos, como o 5-FU, acarretam danos no epitélio intestinal, com alterações na arquitetura, redução das vilosidades e aprofundamento das criptas. Tais alterações contribuem para a redução no comprimento total do intestino delgado que, por sua vez, resulta em uma menor superfície de absorção de nutrientes, justificando, assim, a perda de peso de animais doentes. Por outro lado, a destruição das células que compõem o epitélio é considerado o principal estímulo para o recrutamento de neutrófilos e eosinófilos para a mucosa intestinal, justificando a importância da mensuração destes tipos celulares no local da inflamação (DE JESUS *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2012; KATO *et al.*, 2017).

Os dados apresentados na Figura 11 demonstram que a administração de 5-FU contribuiu para uma redução significativa no comprimento do intestino delgado ($p < 0,001$) e perda de peso ($p < 0,0001$) dos animais inflamados, em relação ao grupo controle. Em contraste, o tratamento probiótico na concentração de 10^9 UFC, atenuou significativamente o encurtamento do intestino delgado ($p = 0,002$) e a perda de peso ($p = 0,01$) em animais que receberam o quimioterápico. Com relação aos parâmetros inflamatórios, a indução da mucosite contribuiu para o recrutamento significativo de neutrófilos intestinais ($p < 0,01$) e eosinófilos ($p < 0,0001$) medidos pelas atividades de MPO e EPO, respectivamente. Por outro lado, a atividade da MPO foi significativamente reduzida pelo uso de *A. muciniphila* nas doses de 10^7 ($p = 0,01$) e 10^9 UFC ($p = 0,01$), sem apresentar diferenças significativas entre doses. Contudo, apenas a maior concentração probiótica suprimiu significativamente a atividade de EPO ($p = 0,02$) no tecido inflamado. Assim, concluímos que os efeitos modulados pelo probiótico em questão, são dose-específicos, uma vez que a avaliação dos parâmetros clínicos e inflamatórios mostraram melhora significativas quando uma dose diária de 10^9 UFC foi administrada aos animais com mucosite induzida.

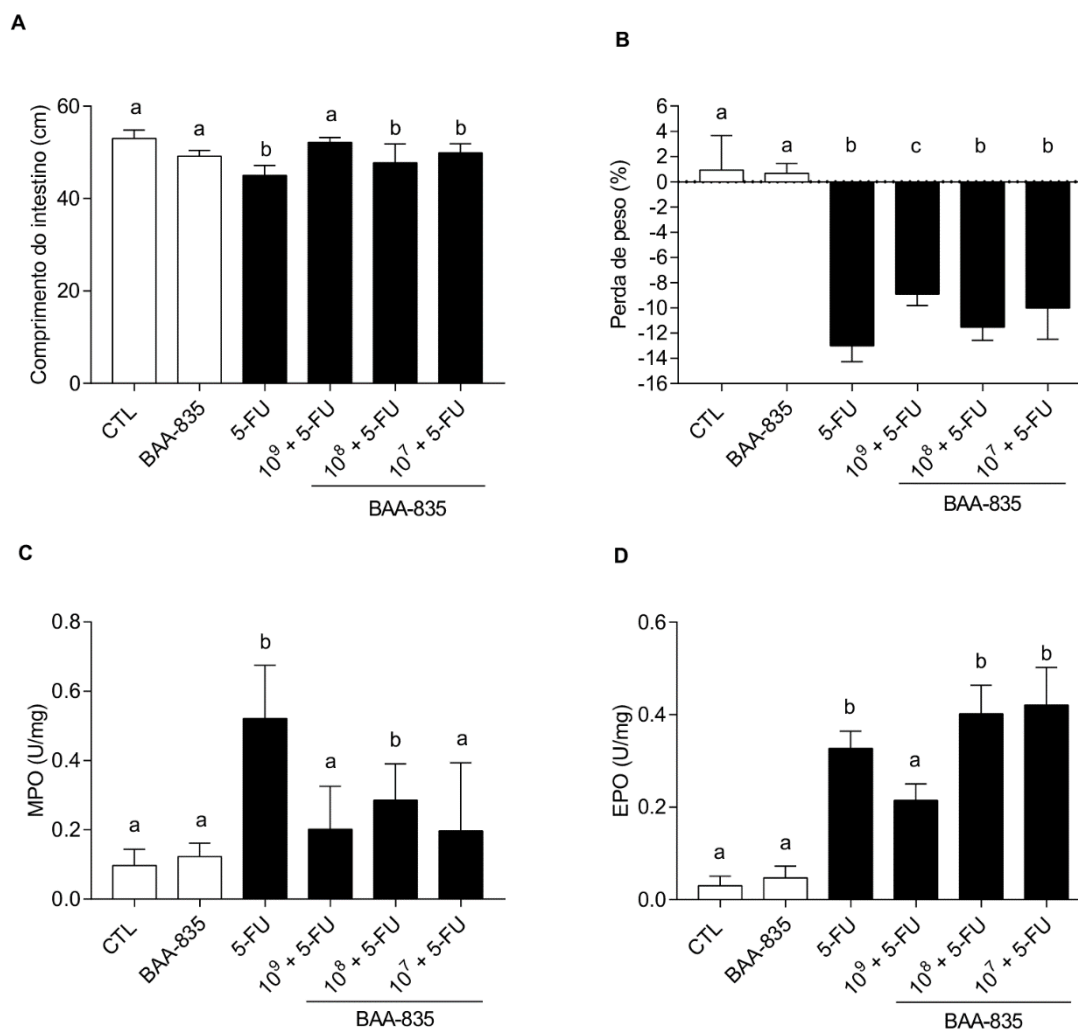
Semelhante ao nosso trabalho, Quintanilha e colaboradores (2022), avaliaram o efeito enteroprotetor de cinco diferentes concentrações de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} em modelo de mucosite induzida por irinotecano. Neste trabalho, foi observado que diferentes doses probióticas foram capazes de reduzir significativamente a atividade da enzima MPO em amostras de íleo, contudo, apenas a maior concentração probiótica resultou em menor migração de neutrófilos para o tecido. Em

um outro estudo avaliando a administração de *Bifidobacterium bifidum* G9-1 em concentrações variando de 10^7 a 10^9 UFC/mL na mucosite induzida por 5-FU, os autores observaram que os efeitos benéficos promovidos pelo probiótico eram dependentes da dose, porém, uma melhora significativa foi observada somente na dose de 10^9 UFC/mL (KATO *et al.*, 2017).

Recentemente, Milani e colaboradores (2022), avaliaram o efeito dose-resposta de *S. cerevisiae* UFMG A-905 em modelo murino de asma, e concluíram que a maior dose probiótica reduziu significativamente a hiperresponsividade brônquica, enquanto que as doses mais baixas não apresentaram o mesmo efeito. Sob outra perspectiva, um estudo clínico buscando determinar a melhor dose de *Bifidobacterium infantis* 35624 para o tratamento da síndrome do intestino irritável, revelou que a dose de 10^8 UFC/mL foi significativamente melhor que as doses 10^6 e 10^{10} UFC/mL (WHORWELL *et al.*, 2006).

Deste modo, os diferentes resultados encontrados na literatura reforçam a necessidade de realização de estudo dose-resposta, uma vez que a melhor dosagem é uma característica linhagem-dependente (OUWEHAND, 2017). Além disso, é importante conhecer um limiar seguro relativo à dosagem de probióticos destinados à prática clínica (FORSSTEN; OUWEHAND, 2020), uma vez que uma relação dose-efeito deve ser cuidadosamente estabelecida para evitar excessos, haja visto a falta de estudos demonstrando os impactos causados por overdose de probióticos ou até mesmo o uso de subdosagens, que implicaria em uma diminuição de eficiência (CAI *et al.*, 2022).

Figura 11 - Efeito dose-resposta de *A. muciniphila* BAA-835 em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. (A) Comprimento do intestino, (B) Perda de peso, (C) Atividade de MPO e (D) EPO no tecido. As barras representam os grupos analisados (CTL: Controle; BAA-835: *A. muciniphila*, 5-FU: Mucosite induzida e BAA-835 (10^9 – 10^7) + 5-FU: tratamento com *A. muciniphila* nas respectivas concentrações e mucosite induzida. Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.2. Avaliação da viabilidade do probiótico

Além da necessidade em se definir a melhor dose probiótica, existe um grande interesse no uso de microrganismos inativos, uma vez que vários estudos demonstram que os efeitos benéficos dos probióticos podem ser obtidos com a administração de células mortas, embora a definição clássica de probióticos requeira o uso de microrganismos vivos (GERALDO *et al.*, 2020; SAWADA *et al.*, 2016; SUGAWARA *et al.*, 2020). Neste sentido, em 2019 a Associação Internacional de Probióticos e Prebióticos definiu o termo pós-biótico como uma “preparação de

microrganismos inativados e/ou seus componentes que conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (SALMINEN *et al.*, 2021).

O uso de pós-bióticos traz consideráveis vantagens, sendo a mais significativa delas à segurança quanto ao uso de células microbianas vivas, dado que microrganismos viáveis podem desenvolver patogenicidade, especialmente quando usados por idosos ou pacientes imunocomprometidos (OGGIONI *et al.*, 1998). Na prática, este risco poderia ser minimizado pela utilização de bactérias probióticas inativas. Outra vantagem é que os produtos compostos por pós-bióticos possivelmente suportam maior tempo de prateleira, e dispensam o armazenamento sob refrigeração. Além disso, os pós-bióticos não podem ser isolados do produto comercial, garantindo que os fabricantes mantenham a propriedade de seus produtos (SALMINEN *et al.*, 2021).

Diante do exposto, e após a definição da melhor dose probiótica, objetivou-se investigar se o efeito probiótico é dependente da viabilidade bacteriana e, conseqüentemente, do seu metabolismo, ou então, se é dependente de algum componente estrutural. Para isso, os parâmetros clínicos e imunológicos supracitados (seção 5.1.1) comuns na mucosite intestinal foram reavaliados, testando a administração da bactéria viável e inativada pelo calor.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 12, a indução da mucosite resultou em encurtamento significativo do intestino delgado ($p=0,01$) e perda de peso ($p<0,0001$) nos animais (Figuras 12A e 12B), de modo que apenas a bactéria viável atenuou significativamente estes parâmetros. Contudo, para o infiltrado inflamatório tecidual, ambas as administrações foram capazes de reduzir as atividades de MPO ($p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente) e EPO ($p<0,02$ e $<0,04$, respectivamente) (Figuras 12C e 12D). Estes dados sugerem que o mecanismo de ação envolvido na supressão dos níveis de neutrófilos e eosinófilos no tecido possam estar relacionado a algum componente estrutural da bactéria.

Estudos de genômica comparativa tem apontado a presença de uma proteína de membrana externa, Amuc_1100, altamente conservada em diferentes isolados de *A. muciniphila* (XING *et al.*, 2019). Algumas evidências têm demonstrado que tal proteína encontra-se estável após o processo de pasteurização, indicando, portanto, ser termoestável quando submetida a temperaturas próximas a 70°C (CANI; DE VOS, 2017). Esta proteína está envolvida na homeostase imunológica do hospedeiro, sendo capaz de interagir com receptores do tipo Toll like (TLR)-2, promovendo efeitos

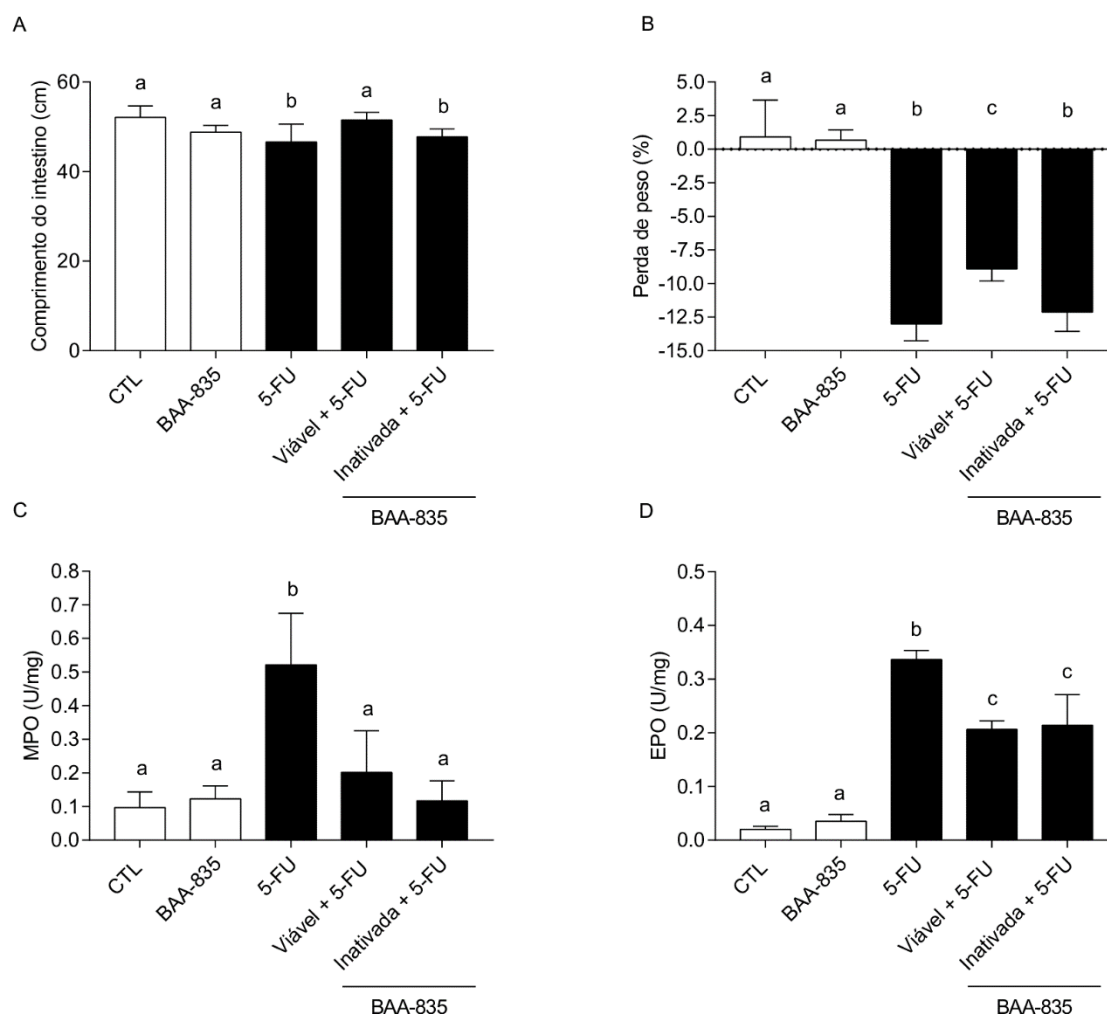
benéficos (OTTMAN *et al.*, 2017). Plovier e colaboradores (2017) demonstraram que a administração de *A. muciniphila* inativada pelo calor resultou em melhoras significativas em modelos murinos de obesidade e diabetes tipo 2, concluindo que tais efeitos possam estar relacionados à presença da proteína em questão (PLOVIER *et al.*, 2017).

Em outro trabalho, WANG e colaboradores (2020), demonstraram que a proteína Amuc_1100 purificada foi capaz de melhorar a colite induzida por DSS em camundongos, reduzindo a infiltração de macrófagos e linfócitos T CD8+ no cólon. Mais recentemente, um estudo avaliando a administração de Amuc_1100 na mucosite induzida por 5-FU, demonstrou que a proteína contribuiu para a redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL6, contribuindo para a melhora dos sintomas da mucosite intestinal (CHEN *et al.*, 2022).

Apesar da redução de MPO e EPO em ambas formas de administração, é importante reforçar que o conjunto de parâmetros analisados demonstram que a utilização probiótica é mais indicada para o tratamento da mucosite intestinal. Sugerimos que, além da presença da proteína de membrana capaz de reduzir a inflamação local, algum metabólito produzido pelo microrganismo ativo é necessário para melhora dos demais parâmetros avaliados. Esta hipótese pode ser reforçada pelos dados observados em um estudo utilizando modelo murino de alergia alimentar, que demonstrou que a administração de uma levedura probiótica inativada pelo calor, não foi capaz de promover os mesmos efeitos significativos quando utilizada em sua forma viável (MIRANDA *et al.*, 2020).

Por fim, após a definição da melhor dose probiótica, e da verificação do efeito da viabilidade bacteriana no modelo de mucosite intestinal, investigamos a atividade probiótica de *A. muciniphila* quando administrada em dois protocolos de tratamento diferentes, sendo os protocolos preventivo e curativo.

Figura 12 - Efeito da viabilidade de *A. muciniphila* BAA-835 em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. (A) Comprimento intestinal, (B) Perda de peso, (C) Determinação da atividade de MPO e (D) EPO no tecido. As barras representam os grupos analisados: CTL: Controle; BAA-835: *A. muciniphila*; 5-FU: Mucosite induzida; Viável + 5-FU: tratamento com *A. muciniphila* viável e mucosite induzida; Inativada + 5-FU: tratamento com *A. muciniphila* inativada e mucosite induzida. Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) por ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.3. Avaliação do protocolo de tratamento

Em geral os tratamentos preventivos são aqueles em que os probióticos são administrados antes do desenvolvimento da doença, com o objetivo de prevenir ou atenuar os sintomas desencadeados por uma determinada condição patológica. Neste sentido, a prescrição de probióticos com objetivos profiláticos é bastante comum, como na prevenção da diarreia do viajante (BAE, 2018). Esta doença ocorre com considerável frequência em indivíduos que viajam para países subdesenvolvidos, sendo adquirida a partir da ingestão de água ou alimentos contaminados (LARSON, 1997). Além desta, outras doenças como diarreia aguda infecciosa, diarreia associada

ao uso de antibióticos (VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008), e doenças alérgicas (PRAKASH *et al.*, 2014) são condições onde os probióticos também são utilizados de maneira profilática.

Já os tratamentos curativos, são aqueles onde os probióticos são utilizados com o intuito de tratar ou reduzir sintomas de uma determinada doença. A diarreia infecciosa aguda, é uma condição que além de ser prevenida, também pode ser tratada a partir da administração de um probiótico. Estudos têm demonstrado benefícios quando o protocolo curativo é empregado nestes casos, sendo observados resultados promissores no que se diz respeito à intensidade e duração da diarreia (VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008). Estudos também sugerem que a terapêutica com probióticos são capazes de atenuar os sintomas ocasionados pela síndrome do intestino irritável (MCFARLAND; DUBLIN, 2008). Além destas, outras doenças pré-existentes como a doença de Crohn (DC), a colite ulcerativa e as dislipidemias podem ser parcialmente atenuadas a partir do uso de um determinado microrganismo probiótico (VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008).

No que se refere à mucosite intestinal, poucos estudos são encontrados na literatura acerca do protocolo de tratamento mais adequado. Sabe-se que tal condição é desencadeada a partir da radio/quimioterapia necessários para o controle do câncer. Sob este ponto de vista, podemos sugerir que a mucosite intestinal é uma condição parcialmente previsível, já que após o diagnóstico do câncer, as orientações médicas sobre as medidas a serem tomadas serão definidas. Neste sentido, o conhecimento do melhor protocolo de tratamento probiótico para a mucosite é importante, uma vez que iniciar um tratamento profilático pode promover a atenuação dos sintomas. Contudo, um trabalho avaliando a administração de *S. boulardii* para o tratamento preventivo da mucosite induzida por 5-FU, não demonstrou efeitos significativos (MAIOLI *et al.*, 2014). Dentre as diferentes hipóteses, o tipo de protocolo empregado pode estar relacionado ao insucesso no tratamento da mucosite, uma vez que outros autores, ao utilizarem protocolos curativos, mostraram efeito benéfico de *S. boulardii* em modelos de mucosite intestinal (JUSTINO *et al.*, 2014, 2020).

Diante dessas considerações, torna-se clara a necessidade de novas pesquisas na busca de alternativas para a profilaxia e/ou terapêutica da mucosite intestinal. Para isso, *A. muciniphila* foi administrada aos animais sob protocolo preventivo, isto é, dez dias antes da indução da doença, e também de forma curativa, sendo, neste caso, após a indução da doença. Os parâmetros comuns da mucosite

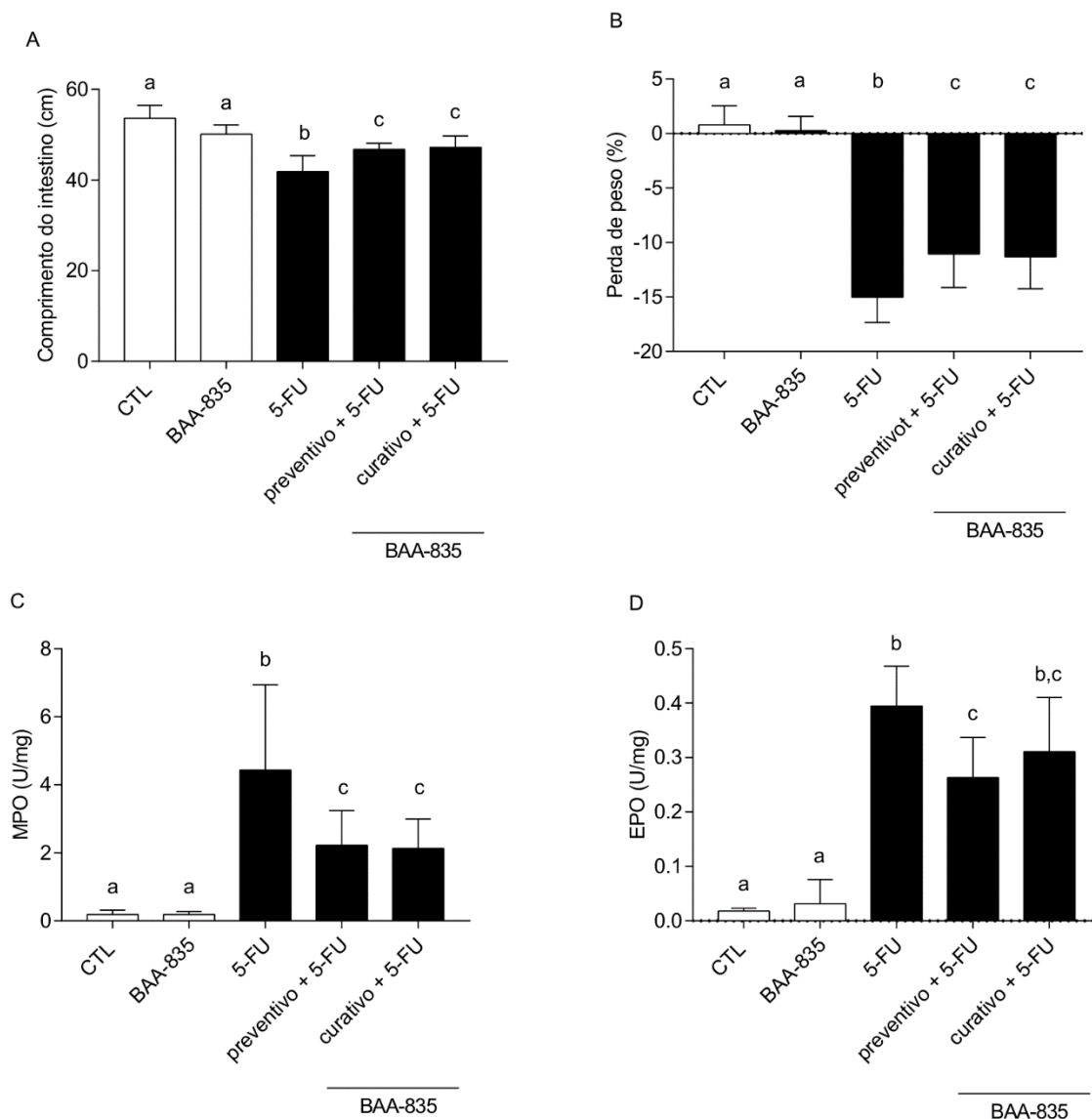
intestinal foram novamente analisados (seção 5.1.1), seguindo os protocolos supracitados, e os dados apresentados na Figura 13.

Nossos resultados mostram que camundongos submetidos à mucosite induzida por quimioterapia (5-FU) apresentaram piora significativa dos parâmetros clínicos e inflamatórios, em comparação aos animais CTL. Por outro lado, ambos protocolos de tratamento apresentaram resultados semelhantes quando os parâmetros clínicos foram avaliados, uma vez que a administração de *A. muciniphila* preveniu significativamente o encurtamento do intestino delgado (pré-tratamento: $p=0,04$; pós-tratamento: $p=0,02$) (Figura 13-A) e perda de peso (pré-tratamento: $p=0,03$; pós-tratamento: $p=0,04$) (Figura 13-B). Resultados semelhantes foram observados para a avaliação do influxo de neutrófilos no íleo, pois a atividade catalítica da MPO (Figura 13-C) foi significativamente suprimida em ambos os protocolos de tratamento (pré-tratamento: $p=0,04$; pós-tratamento: $p=0,02$). No entanto, os níveis de EPO (Figura 13-D) foram significativamente reduzidos apenas quando *A. muciniphila* foi administrado como uma estratégia preventiva no manejo da mucosite ($p=0,03$).

Os dados aqui apresentados corroboram o trabalho de Chen e colaboradores (2022), que demonstraram os efeitos benéficos da administração profilática de *A. muciniphila* no tratamento da mucosite induzida. Dados os efeitos anti-inflamatórios da bactéria, acredita-se que a administração preventiva é capaz de manter a homeostase intestinal e reduzir a ocorrência dos eventos inflamatórios causados pelo 5-FU, devido a inibição de citocinas pró-inflamatórias e principalmente pela redução da ativação de vesículas inflamatórias de NLRP3.

Em resumo, após avaliação dos parâmetros comuns da mucosite intestinal, entende-se que os efeitos benéficos obtidos pelo uso de *A. muciniphila* BAA-835 para o tratamento da mucosite requer dosagem de 10^9 UFC com a bactéria viável e, preferencialmente, em tratamento preventivo.

Figura 13 - Efeito do protocolo de tratamento, preventivo ou curativo de *A. muciniphila* BAA-835 em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU. (A) Comprimento intestinal, (B) Perda de peso, (C) Determinação da atividade de MPO e (D) EPO no tecido. As barras representam os grupos analisados: CTL: Controle, BAA-835: *A. muciniphila*, 5-FU: Mucosite induzida, Preventivo + 5-FU: tratamento profilático com *A. muciniphila* e mucosite induzida, Curativo + 5-FU: tratamento curativo com *A. muciniphila* e mucosite induzida. Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) por ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelo autor.

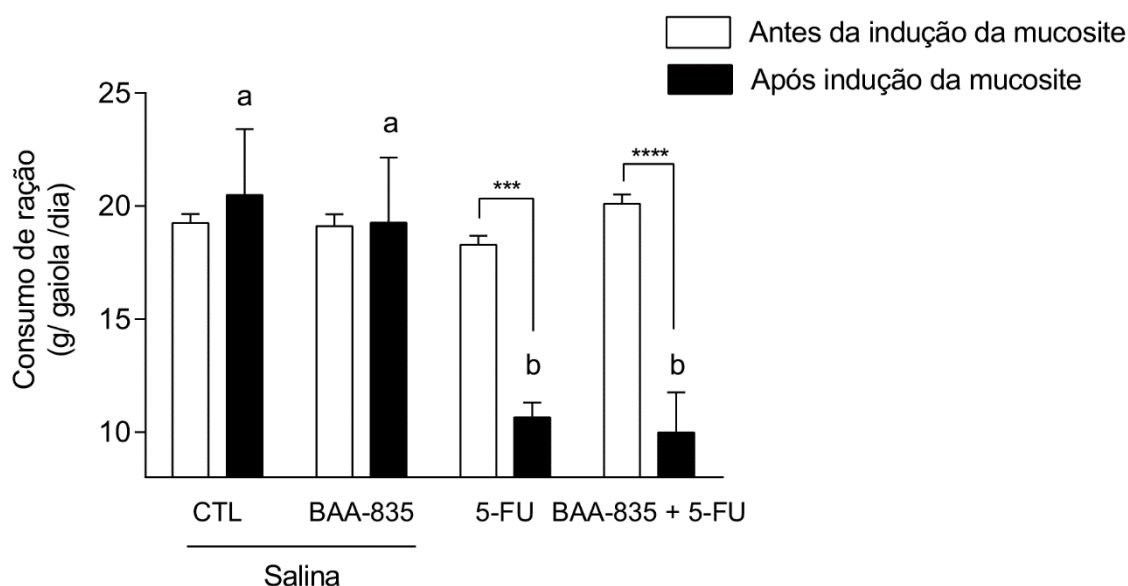
5.2. Avaliação do consumo alimentar

A mucosite é considerada uma das complicações clínicas mais comuns que podem afetar o estado nutricional de pacientes oncológicos, uma vez que o comprometimento na ingestão de alimentos pode ser ocasionado por anormalidades no trato digestivo desencadeada por doenças ou uso de determinados fármacos (EDUARDO *et al.*, 2018; NELSON; WALSH; SHEEHAN, 1994). Neste sentido, ao

definir o melhor protocolo de tratamento probiótico de *A. muciniphila* em modelo murino de mucosite intestinal, avaliou-se o consumo de ração dos animais, antes e após a indução da doença (Figura 14).

O consumo alimentar total foi semelhante em todos os grupos experimentais antes da indução da mucosite. Como esperado, após a injeção de 5-FU, a ingestão alimentar foi reduzida no grupo inflamado e não tratado (5-FU), em comparação ao controle ($p < 0,0001$). Entretanto a administração preventiva de 10^9 UFC de *A. muciniphila* viável não interferiu no consumo alimentar. É importante ressaltar que apenas a administração do probiótico não interfere negativamente no consumo alimentar, uma vez que o grupo BAA-835 não apresentou diferença estatística no consumo de ração antes e após a indução da doença.

Figura 14 - Avaliação do consumo de ração dos animais por gaiola. Barras brancas e pretas representam o consumo de ração antes e após indução da mucosite intestinal, respectivamente. Os grupos analisados foram: CTL: Controle, BAA-835: *A. muciniphila*, 5-FU: Mucosite, e BAA-835 + 5-FU: tratamento com *A. muciniphila* e mucosite induzida. Letras diferentes (a e b) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre grupos, determinado por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey. Símbolos (*) indicam diferença estatística significativa do consumo de ração antes e após a indução da mucosite (** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em concordância aos nossos achados, tratamentos probióticos não têm demonstrado efeitos significativos a respeito do consumo alimentar de animais em modelo de mucosite intestinal. DE JESUS e colaboradores (2019), demonstraram que o uso de *L. delbrueckii* subs. *lactis* CIDCA 133 não foi capaz de reverter o quadro de inanição dos animais após indução da mucosite com 5-FU. Outros trabalhos utilizando

S. boulardii e *S. thermophilus* como agentes bioterapêuticos, apontaram resultados semelhantes (MAIOLI *et al.*, 2014; TOOLEY *et al.*, 2011).

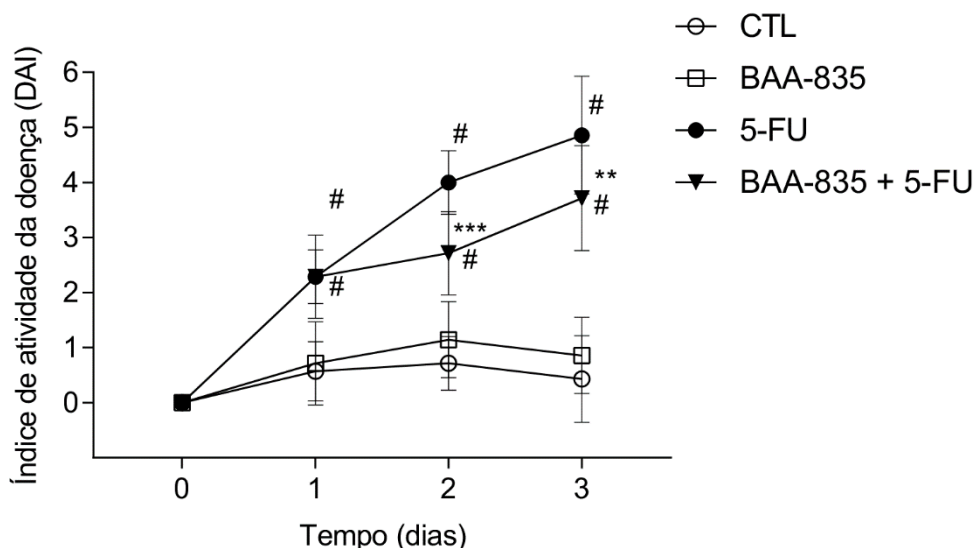
Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que a mucosite induzida por 5-FU pode levar ao comprometimento da ingestão oral devido à dificuldade de mastigação e deglutição de alimentos. Isto ocorre devido à presença de uma resposta inflamatória grave, gerando lesões e úlceras por todo TGI, implicando diretamente na ingestão dos alimentos (EDUARDO *et al.*, 2018; MAIOLI *et al.*, 2014). Além desta hipótese, SOARES e colaboradores (2008) têm sugerido que a administração do quimioterápico 5-FU está associado a um quadro de dispepsia e ao atraso no esvaziamento gástrico, já que a dismotilidade intestinal ocorre tanto no local da inflamação causada pelo quimioterápico, como nos sítios mais distantes e não inflamados (SOARES *et al.*, 2008).

5.3. Avaliação do índice de atividade da doença (DAI)

A mucosite intestinal é marcada por sintomas típicos que incluem desde a inflamação e ulceração da mucosa à uma expressiva perda de peso (GEORGE *et al.*, 2018). Uma vez que a gravidade da doença é dependente do tipo de quimioterápico administrado (WONG *et al.*, 2015), e diferentes propostas para seu tratamento têm sido sugeridas, torna-se importante mensurar a gravidade da mucosite, bem como a eficácia da terapêutica. Desta maneira, o índice de atividade da doença (DAI) tem sido proposto como um escore acumulativo indicador da gravidade do dano intestinal, e este é capaz de monitorar o agravamento desta condição de forma tempo-dependente (BAJIC *et al.*, 2016; CHARTIER; HOWARTH; MASHTOUB, 2020; MASHTOUB *et al.*, 2015; REINKE *et al.*, 2015; SMITH *et al.*, 2008).

Após administração do 5-FU ou solução salina, o DAI foi monitorado diariamente em uma escala de 0 – 9, tomando como parâmetros a perda de peso corporal, a pesquisa por sangue oculto e consistência das fezes. Como esperado, a administração do quimioterápico aumentou significativamente o DAI nos dias 1, 2 e 3, em comparação com os animais CTL. O tratamento com *A. muciniphila* promoveu redução significativa dos sintomas, atenuando a gravidade da doença e contribuindo para menor evolução da DAI no grupo BAA-835 + 5-FU, em relação ao grupo 5-FU, nos dias 2 ($p = 0,001$) e 3 ($p=0,006$) após a indução da doença (Figura 15).

Figura 15 - Índice de atividade da doença após indução da mucosite. CTL: Controle, BAA-835: *A. muciniphila*, 5-FU: Mucosite, BAA-835 + 5-FU: tratamento com *A. muciniphila* e mucosite induzida. Símbolos indicam diferença estatística significativa, sendo # diferença entre os grupos CTL vs. 5-FU e BAA-835 + 5-FU vs. CTL, e ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, entre grupos 5-FU vs. BAA-35 + 5-FU, determinado por ANOVA two-way, seguido do pós-teste de Bonferroni.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Considerando os parâmetros clínicos utilizados para construção do DAI, perda de peso é um dos sintomas mais comumente observado na mucosite intestinal. É relatado que 80% dos pacientes em terapia oncológica apresentam este sintoma, sendo justificado pela redução da absorção dos nutrientes devido à diminuição do comprimento das vilosidades intestinais e intensa perda de água e eletrólitos ocasionada pela diarreia (DE JESUS *et al.*, 2019; FERNANDES *et al.*, 2018).

Por sua vez, a diarreia se caracteriza pelo aumento da frequência das evacuações e redução da consistência das fezes, que pode ou não ser acompanhada de sangue e cólicas (SALTZ, 2003; GIBSON; KEEFE, 2006). Esta condição pode ser afetada por alterações no controle osmótico, na motilidade intestinal ou mudanças no perfil microbiano. Além disso, alguns trabalhos sugerem que a migração de neutrófilos para o epitélio promova aumento na permeabilidade intestinal, favorecendo a ocorrência de diarreia. Ainda, 20 a 40% dos pacientes apresentam quadros diarreicos graves, sendo muitas vezes acompanhados pela presença de muco e/ou sangue (STRINGER, 2008).

Neste sentido, diferentes propostas para o tratamento da mucosite têm utilizado o DAI como indicador dos danos intestinais, apontando níveis reduzidos, quando de fato o tratamento proposto resulta em efeitos benéficos no tratamento da doença.

Semelhante aos nossos resultados, COUTINHO e colaboradores (2022), observaram um DAI aumentado após indução da mucosite com 5-FU, enquanto que, animais tratados com *Rhodotorula mucilaginosa* UFMGCB 18,377 apresentaram redução dos danos intestinais e um DAI significativamente reduzido. Em outro estudo avaliando a administração de *B. longum* 5^{1A} na mucosite induzida por irinotecano, foi observado um DAI próximo a 6 no quinto dia após a administração do quimioterápico, enquanto que o tratamento preventivo com o probiótico resultou na atenuação dos parâmetros clínicos avaliados, contribuindo para um DAI significativamente reduzido (QUINTANILHA *et al.*, 2022).

Em geral, os resultados aqui apresentados corroboram os dados da literatura, uma vez que diferentes estudos têm demonstrado a ação dos probióticos na atenuação da perda de peso e na prevenção da ocorrência de diarreia. Neste trabalho, demonstramos que o tratamento probiótico com *A. muciniphila* resultou na melhora destes parâmetros, com conseqüente diminuição do DAI sugerindo redução dos danos intestinais.

5.4. Avaliação do efeito probiótico de *A. muciniphila* na mielossupressão e leucopenia ocasionada pelo tratamento com 5-FU

A mielossupressão ocasionada por agentes antineoplásicos, incluindo o 5-FU, é uma condição decorrente da inespecificidade do fármaco sobre as células cancerígenas. Em geral, drogas quimioterápicas acometem tecidos de rápida proliferação celular, como a medula óssea, resultando em um efeito citotóxico sobre as células hematopoiéticas (NUMAZAWA *et al.*, 2010)..

Neste sentido, foi realizada a lavagem do canal medular dos animais em estudo, para recuperação e contagem de leucócitos totais para investigação do desenvolvimento de mielossupressão. Também foram coletadas amostras de sangue por punção cardíaca e procedida a contagem diferencial de leucócitos circulantes para avaliar a ocorrência de leucopenia nos camundongos com mucosite induzida.

Os dados mostram que a indução de mucosite com 5-FU resulta em redução significativa de leucócitos totais presentes na medula óssea, em comparação com animais saudáveis ($p < 0,0001$) (Figura 16-A). O tratamento com *A. muciniphila* não afetou a contagem de leucócitos; portanto, não desempenhou papel algum na prevenção da mielossupressão desencadeada pelo uso de quimioterapia. Apesar disso, a contagem diferencial de leucócitos circulantes revela diferenças

estatisticamente significativas na diminuição de neutrófilos ($p=0,0012$), aumento de linfócitos ($p=0,0002$) e redução da relação neutrófilo-linfócito ($p<0,0001$) nos animais do grupo BAA-835 + 5-FU, comparados ao grupo 5-FU (FIGURA 16-A,B,C). A contagem de monócitos e eosinófilos circulantes não apresentaram diferença significativa entre grupos (dados não mostrados).

Em geral, o desenvolvimento de mielossupressão é frequentemente observado após a administração de antineoplásicos, sendo esta condição relatada em diferentes trabalhos (ATIQU *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2015). Estudos têm sugerido que além do efeito inibidor de crescimento celular mediado pelo gene supressor p53, a ação do quimioterápico 5-FU resulta em estresse oxidativo nas células da medula óssea, sendo este fenômeno uma das principais causas de mielossupressão (ABBAS *et al.*, 2010; NUMAZAWA *et al.*, 2010). Contudo, apesar da gravidade da ocorrência desta condição em pacientes oncológicos, e da ineficácia do tratamento probiótico sobre sua atenuação, é importante ressaltar que a mielotoxicidade é reversível após a suspensão do tratamento quimioterápico, sendo o período médio de regeneração das células hematopoiéticas entre 10 a 14 dias (SONG *et al.*, 2016). Neste sentido, o fato do probiótico não apresentar efeito sob este parâmetro pode ser benéfico, sugerindo ausência de interferência sobre o efeito citotóxico do quimioterápico, de modo a não comprometer a ação do antineoplásico no tratamento do câncer.

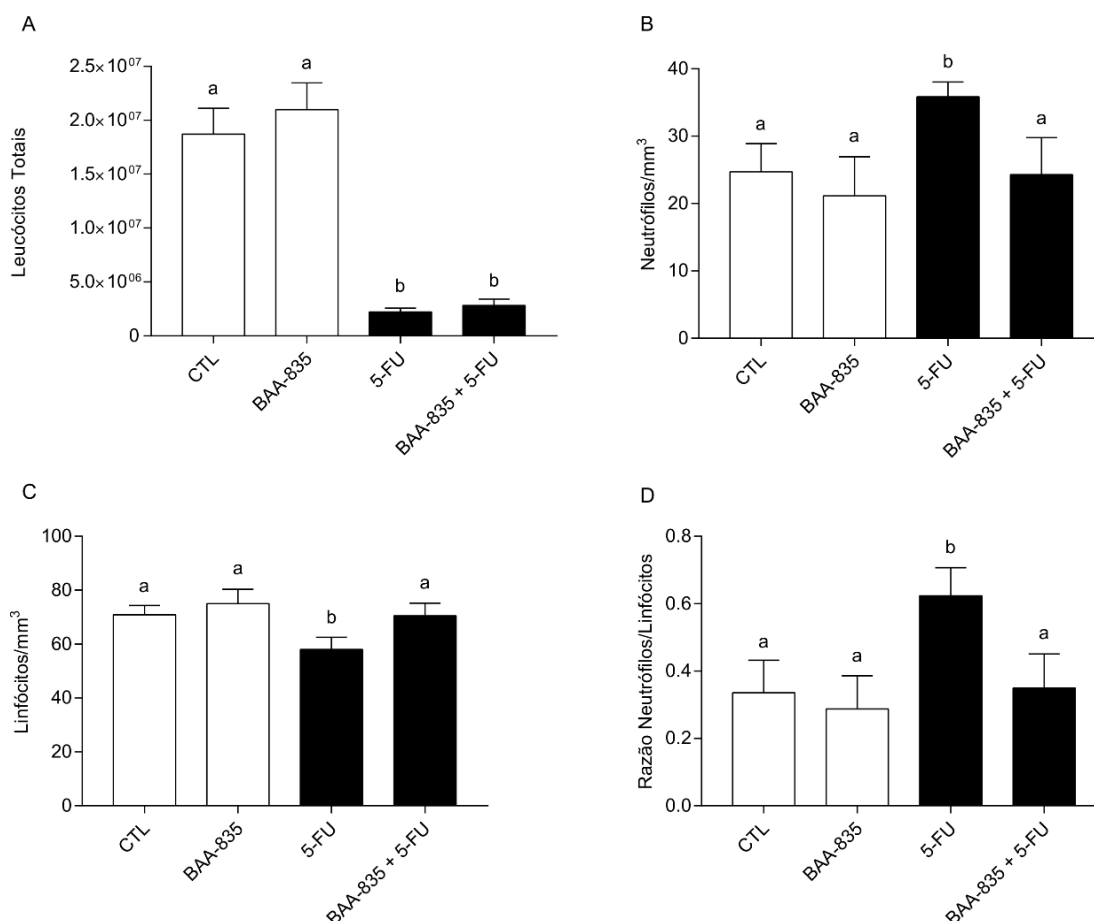
Por outro lado, *A. muciniphila* foi capaz de prevenir a linfopenia nos animais com mucosite induzida por 5-FU. Esta observação assemelha-se aos dados encontrados por SALVA e colaboradores (2014). Neste trabalho, utilizando modelo murino de imunossupressão, em um protocolo de tratamento similar ao nosso, com linhagens probióticas de *L. casei* ou *L. rhamnosus*, foi demonstrado aumento dos níveis de leucócitos circulantes após o terceiro dia de indução do quimioterápico. Interessantemente, este aumento foi observado mesmo com a confirmação da redução significativa de células hematopoiéticas mitóticas e pós-mitóticas. Além disso, os autores concluíram que células já maduras não foram afetadas pela ação do quimioterápico, justificando tal resultado (SALVA *et al.*, 2014). Dentre a contagem de linfócitos circulantes, há uma quantidade expressiva de linfócitos T, sendo 5 a 10% correspondente a linfócitos T_{reg} (MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2010). No que diz respeito a este tipo celular, inúmeros trabalhos têm apontado o papel destas células em modelos de DII, como na retocolite ulcerativa (RCU) e DC (HARTOG *et al.*, 2015; UENO, 2015). Entretanto, o papel dos linfócitos T na mucosite intestinal ainda é pouco

compreendido, porém FERNANDES et al., (2018), sugerem que a depleção destas células acarreta aumento dos danos intestinais, como por exemplo, presença de diarreia, aumento do infiltrado inflamatório neutrofílico no tecido, bem como no aumento da taxa de mortalidade de animais com mucosite induzida. Deste modo, sugere-se que níveis expressivos de células T_{reg} são importantes no controle dos efeitos deletérios desencadeados pela mucosite intestinal

Com relação à redução dos níveis de neutrófilos circulantes no grupo tratado com o probiótico, os dados estão em consonância com nossos achados referentes à diminuição dos níveis de neutrófilos no tecido, medido indiretamente pela atividade da enzima MPO. Ao propor o modelo sobre o desenvolvimento da mucosite intestinal, SONIS (2004) descreve que na fase ulcerativa da doença, a presença do infiltrado inflamatório no tecido é intenso, e este evento resulta em migração dos neutrófilos circulantes para o tecido lesado, podendo culminar em quadros de neutropenia. Nossos dados sugerem que o aumento do número de neutrófilos circulantes ocorre de forma a compensar o extravasamento de neutrófilos para o tecido, confirmados pelas dosagens de MPO. Entretanto, o tratamento probiótico parece auxiliar de forma a manter os níveis basais de neutrófilos circulantes, não sendo observado nenhum quadro de neutropenia.

Por último, a relação neutrófilo-linfócito (NLR) pode ser usada como um indicador da gravidade da mucosite, uma vez que a NLR mais alto é indicativa de um quadro de mucosite mais grave (HOMA-MLAK *et al.*, 2021). Essa relação corroborou nossos resultados, pois a NLR foi maior no grupo inflamado e menor no grupo tratado com *A. muciniphila*.

Figura 16 - Avaliação do efeito probiótico de *A. muciniphila* sobre a mielossupressão e leucopenia ocasionada pelo tratamento com 5-FU. CTL: Controle; BAA-835: *A. muciniphila*; 5-FU: Mucosite; BAA-835 + 5-FU: *A. muciniphila* e mucosite induzida. (A) Contagem total de leucócitos totais na medula óssea. (B) Neutrófilos. (C) Linfócitos. (D) Razão neutrófilos/linfócitos. Letras diferentes indicam (a, b) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) por ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Tukey.



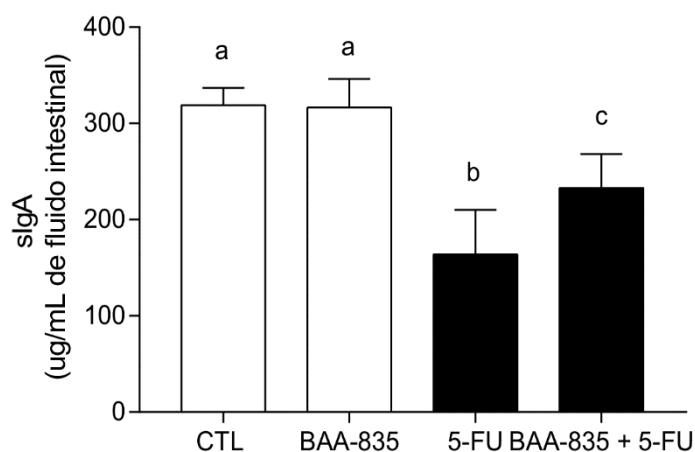
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5. Influência do tratamento de *A. muciniphila* sob os níveis de sIgA intestinal de animais com mucosite induzida

Considerada a imunoglobulina mais abundante no lúmen intestinal, a sIgA é reconhecida como a primeira linha de defesa imunológica na proteção do epitélio intestinal contra patógenos e toxinas entéricas. Produzida em grande quantidade pelos plasmócitos, a sIgA atua neutralizando microrganismos aderidos à superfície da mucosa, sendo incapaz de ativar o sistema completo, preservando o tecido e contribuindo para a homeostase intestinal. Tal característica torna a sIgA ideal para desempenhar sua função de defesa, uma vez que a integridade da mucosa é mantida, principalmente no TGI, que é continuamente exposto a uma grande variedade de antígenos (MANTIS; ROL; CORTHÉSY, 2011).

No presente trabalho, em relação à produção de sIgA no fluido intestinal, foi observada a redução estatisticamente significativa nos animais pertencentes ao grupo doente (5-FU), quando comparado ao controle. No entanto, o tratamento com o probiótico em questão (BAA-835 + 5-FU) foi capaz de reverter este quadro, elevando os níveis de sIgA. Este aumento foi considerado estatisticamente significativo ($p < 0,05$), e os dados são apresentados na Figura 17.

Figura 17 - Avaliação dos níveis de sIgA no fluido intestinal. CTL: Controle; BAA-835: *A. muciniphila*; 5-FU: Mucosite; BAA-835 + 5-FU: tratamento com *A. muciniphila* e mucosite induzida. Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$), determinado por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelo autor.

De fato, a redução dos níveis de sIgA nos grupos com mucosite induzida era esperado, sendo este efeito uma consequência da administração do 5-FU. É reportado na literatura que o uso de quimioterápicos afeta a morfologia da mucosa intestinal, e que o antineoplásico em questão promove uma diminuição do número de células presentes no tecido linfoide associado ao intestino (GALT), com consequente redução na produção de sIgA (NAGAYOSHI *et al.*, 2005). No entanto, o efeito da administração de *A. muciniphila* no aumento da produção de sIgA em animais com mucosite, pode estar relacionado à preservação no número de linfócitos presentes no GALT. Esta hipótese é sugerida por BARROS e colaboradores (2018), que ao estudar os efeitos de ácido linoleico sintético na mucosite induzida, constatou resultados semelhantes aos nossos (DE BARROS *et al.*, 2018).

Além disso, KAWASHIMA e colaboradores (2018), demonstraram a capacidade de *Pediococcus acidilactici* K15 em estimular a produção de sIgA. Neste

trabalho, foi constatado que tal resposta foi induzida pela expressão da citocina IL10, tão eficiente quanto a citocina IL6 na indução da produção de sIgA (KAWASHIMA *et al.*, 2018). Neste contexto, é bem descrito que a bactéria *A. muciniphila* tem como um de seus principais mecanismo de ação, a estimulação da produção de IL10, sendo esta outra justificativa plausível para o aumento dos níveis de IgA no intestino. Além destes, outros estudos têm apontado o aumento de sIgA na mucosa intestinal devido a modulação do sistema imunológico por diferentes probióticos (KIKUCHI *et al.*, 2014; QUINTANILHA *et al.*, 2022; SANTOS ROCHA *et al.*, 2014); portanto, os dados aqui apresentados corroboram os trabalhos descritos na literatura.

5.6. Influência do tratamento com *A. muciniphila* no estresse oxidativo tecidual e na expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias

Durante o desenvolvimento da mucosite intestinal, a ocorrência de espécies reativas de oxigênio (ROS) é uma das primeiras causas que levam à inflamação intestinal, ocorrendo na fase de iniciação. Após o tratamento radio e/ou quimioterápico, danos nas moléculas de DNA são gerados, e estes eventos contribuem para ocorrência de lesões celulares que atingem células na submucosa e mucosa. Simultaneamente, ROS são geradas, e a presença destas moléculas estão relacionadas com a ativação do fator de transcrição nuclear NFκB (SONIS, 2004).

Por sua vez, NFκB induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, que na fase de amplificação de sinais, atua via um mecanismo de auto-regulação exacerbando a produção destas citocinas, de forma a contribuir para a evolução da doença. Dentre estas, a citocina pró-inflamatória TNF induz a ativação de caspases que auxiliam na ocorrência de apoptose, e juntamente com as citocinas IL6 e IL1β exercem um efeito sinérgico, estimulando a ativação de metaloproteinases que contribuem para a degradação do epitélio intestinal, favorecendo o desenvolvimento de lesões (BLIJLEVENS; LOGAN; NETEA, 2009; SONIS, 2004). Em contraste, citocinas anti-inflamatórias, como a IL10, exercem um efeito inibitório capaz de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, favorecendo a atenuação dos danos teciduais desencadeadas no processo inflamatório (BOSHTAM *et al.*, 2017). Neste sentido, foi avaliado o papel de *A. muciniphila* no estresse oxidativo tecidual, bem como na regulação da expressão das principais citocinas que estão envolvidas na patogênese da mucosite.

Curiosamente, nossos resultados demonstram que a injeção de 5-FU aumentou significativamente a atividade de SOD e os níveis de hidroperóxidos no grupo inflamado, em comparação com o grupo CTL ($p < 0,0001$; $p = 0,04$) (Figuras 18-A e 18-B, respectivamente), enquanto que a administração preventiva de *A. muciniphila* diminuiu significativamente esses parâmetros no grupo BAA-835 + 5-FU ($p < 0,0001$; $p = 0,01$).

Por outro lado, os resultados da qPCR revelaram que a expressão relativa de genes que codificam moléculas pró-inflamatórias, como TNF (Figura 18-C), IL1 β (Figura 18-D) e IL6 (Figura 18-E), foram regulados positivamente em animais com mucosite induzida, em comparação com animais do grupo CTL (TNF: $p = 0,02$; IL6: $p = 0,0002$ e IL1 β : $p = 0,005$). Como esperado, o tratamento probiótico suprimiu a expressão de todas as citocinas pró-inflamatórias, quando comparado com o grupo 5-FU (TNF: $p = 0,06$; IL6: $p = 0,01$; IL1 β : $p = 0,04$). Por fim, os níveis de IL10 (Figura 18-F) foram significativamente reduzidos ($p = 0,01$) após a administração de 5-FU, em comparação com o CTL, no entanto, foram significativamente aumentados ($p = 0,04$) quando camundongos com mucosite induzida foram tratados preventivamente com o probiótico.

A partir destes resultados, e sabendo que SOD é uma enzima antioxidante que desempenha um papel na via de degradação do superóxido por dismutação do superóxido em oxigênio e hidroperóxidos (YOUNUS, 2018), pode-se inferir que a alta atividade da SOD no grupo inflamado indica uma tentativa de minimizar o estresse oxidativo, possivelmente devido aos altos níveis de superóxido gerados pelo tratamento quimioterápico. Ao que tudo indica, o pré-tratamento com *A. muciniphila* impediu a geração de superóxido e, conseqüentemente, a atividade de SOD diminuiu.

De forma semelhante, sabendo que os hidroperóxidos são um dos produtos da dismutação do ânion superóxido, e que este produto também se encontra aumentado no grupo 5-FU, sugere-se que há a ocorrência de estresse oxidativo local, e que a administração preventiva de *A. muciniphila* atuou na proteção celular, inibindo a formação excessiva de ROS e conseqüentemente a superatividade da SOD e a formação adicional de hidroperóxidos no grupo BAA-835 + 5-FU.

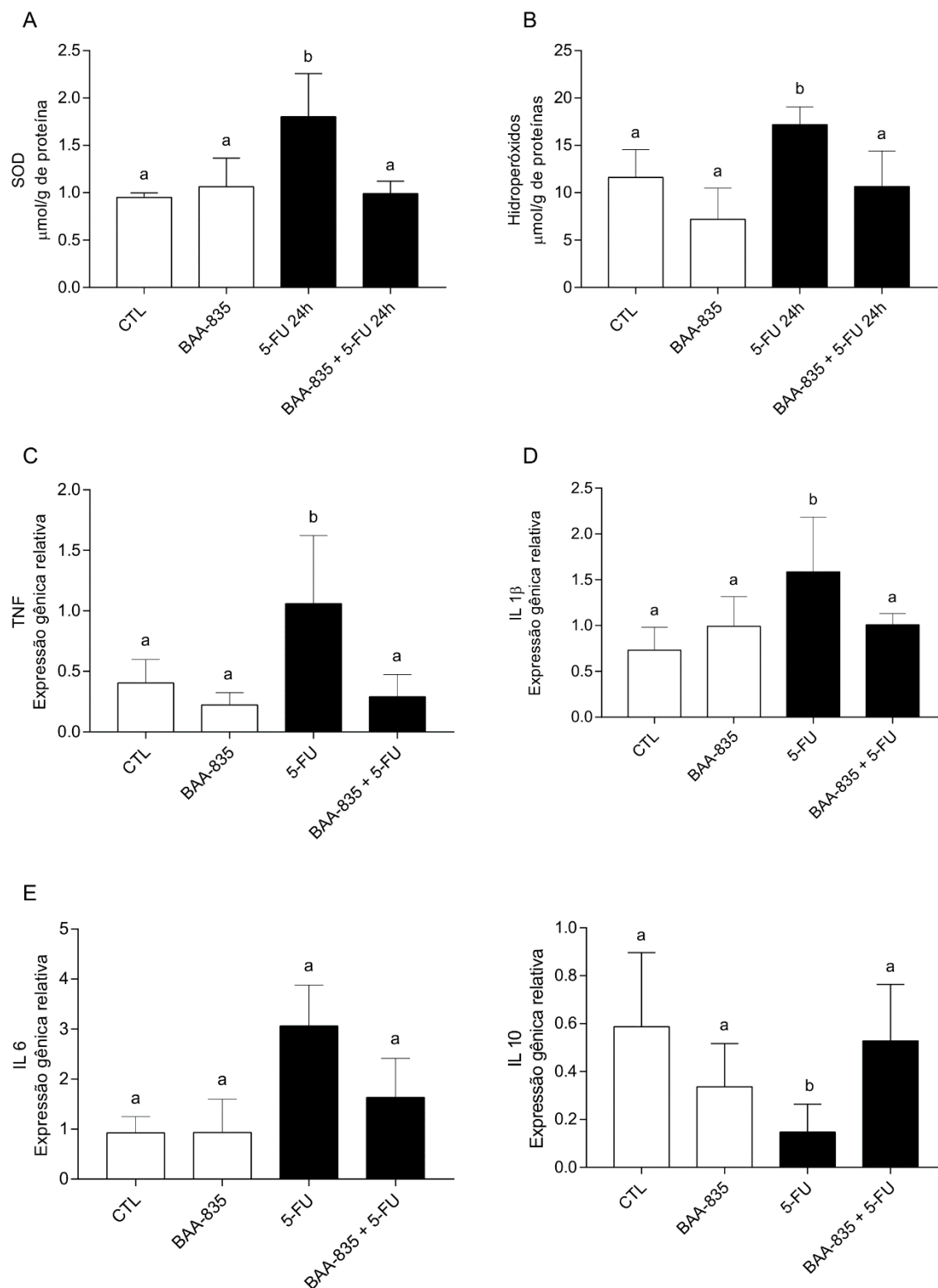
Resultados semelhantes foram observados por QUINTANILHA e colaboradores (2022), ao administrar *B. longum* 5^{1A} preventivamente para camundongos com mucosite induzida por irinotecano. Corroborando nossa hipótese, neste trabalho os autores supõem que os probióticos auxiliam na manutenção dos

níveis normais da enzima SOD, que por sua vez, estabiliza as ROS e, portanto, reduz o dano oxidativo.

Com relação a quantificação de citocinas em amostras de íleo, é reportado na literatura que a bactéria *A. muciniphila* está envolvida na modulação da resposta imune, especificamente na estimulação da produção de IL10, sendo esta induzida pela proteína de membrana Amuc_1100 (NAITO; UCHIYAMA; TAKAGI, 2018). Devido ao seu caráter anti-inflamatório, o acúmulo de IL10 pode ter contribuído para supressão da síntese de citocinas pró-inflamatórias analisadas, uma vez que já é descrito o papel supressor de IL10 sobre IL1 β , IL6, IL8, IL12 e TNF. Esta ação provavelmente ocorre por meio da degradação do mRNA destas citocinas, impedindo a síntese proteica. Além disso, IL10 parece ter efeito sobre a inibição da ativação do fator de transcrição NF κ B, contribuindo para a supressão da síntese destas citocinas (BOSHTAM *et al.*, 2017), e sobre a atenuação do desenvolvimento da mucosite intestinal (KEEFE, 2007).

A atividade anti-inflamatória de *A. muciniphila* tem sido observada em diferentes estudos, como o de HUCK e colaboradores (2020), que avaliaram o efeito deste probiótico na inflamação periodontal causada por *Porphyromonas gingivalis*. Neste trabalho, resultados *in vitro* e *in vivo* revelaram que a administração probiótica resultou no aumento da citocina IL10, contribuindo diretamente para a atenuação dos efeitos inflamatórios induzidos pelo patógeno (HUCK *et al.*, 2020). Mais especificamente na mucosite intestinal, diferentes probióticos têm demonstrado resultados semelhantes, induzindo a expressão de IL10, ao mesmo tempo que suprime a expressão de citocinas pró-inflamatórias (CHEN *et al.*, 2022; COUTINHO *et al.*, 2022; QUINTANILHA *et al.*, 2022). Além disso, outros trabalhos têm demonstrado a ação imunomoduladora dos probióticos na supressão das citocinas IL1 β , IL6 e TNF, corroborando o efeito benéfico destes probióticos no tratamento da mucosite intestinal (HU *et al.*, 2020; JUSTINO *et al.*, 2020)

Figura 18 - Avaliação do estresse oxidativo tecidual e expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias em amostras de íleo de camundongos. (A) Superóxido dismutase (SOD), (B) Hidroperóxidos, (C) TNF, (D) IL 1 β , (E) IL 6 e (F) IL 10. As barras representam os grupos analisados, sendo CTL: Controle; BAA-835: *A. muciniphila*; 5-FU: Mucosite e BAA-835 + 5-FU: tratamento com *A. muciniphila* e mucosite induzida. Letras diferentes (a, b) significam diferença estatística entre grupos ($p \leq 0,05$), determinado por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.7. Avaliação da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana

A barreira intestinal é constituída por células epiteliais, muco, células imunes e *tight junctions* – proteínas que tem como função interconectar as células, vedando o espaço intracelular, e assim, evitando a passagem de agentes nocivos do lúmen para dentro da mucosa intestinal. Quando a barreira intestinal é danificada, o aumento da permeabilidade intestinal (PI) favorece a translocação de bactérias, ou de seus subprodutos, do conteúdo luminal para a mucosa, favorecendo a ocorrência de doenças intestinais (MENTA *et al.*, 2022).

Sabendo que os quimioterápicos estão envolvidos no aumento da permeabilidade da barreira intestinal, e que diferentes trabalhos têm demonstrado que alguns probióticos estão relacionados no aumento da expressão gênica de proteínas de junção (BARROSO *et al.*, 2021; ROSE *et al.*, 2021), torna-se necessário investigar se a administração preventiva de *A. muciniphila* foi capaz de atenuar o aumento PI e a translocação bacteriana.

Os dados apresentados na Figura 19-A demonstram que a PI aumentou significativamente no grupo 5-FU ($p < 0,0001$) em comparação ao CTL, enquanto que a administração de *A. muciniphila* promoveu a redução significativa deste parâmetro ($p < 0,0001$) no grupo BAA-835 + 5-FU, atingindo níveis semelhantes ao grupo CTL. Com relação a translocação bacteriana, foi observado que a indução da mucosite aumentou significativamente a translocação de $^{99m}\text{TC-E. coli}$, para todos os órgãos e sangue quando comparada ao grupo CTL (sangue: $p = 0,004$; pulmão: $p = 0,002$; baço: $p = 0,03$; coração: $p = 0,008$; fígado: $p = 0,01$; MLN: $p < 0,0001$ e rim: $p = 0,04$) (Figuras 19-B-H). Contudo, o pré-tratamento com *A. muciniphila* diminuiu significativamente os níveis de translocação bacteriana para o sangue e todos os órgãos, exceto para o baço, quando comparado ao grupo 5-FU (sangue: $p = 0,006$; pulmão: $p = 0,008$; baço: $p > 0,05$; coração: $p = 0,03$; fígado: $p = 0,0004$; MLN: $p = 0,0002$ e rim: $p = 0,0053$). Juntos estes resultados indicam que o probiótico em questão é capaz de atenuar o aumento da PI em camundongos submetidos a mucosite induzida, e conseqüentemente reduzir a translocação bacteriana.

Em nosso estudo, a redução da PI observada no grupo tratado com o probiótico pode ser justificada pela capacidade de *A. muciniphila* em estimular a expressão gênica de proteínas de junção. Essa hipótese tem sido sustentada, uma vez que evidências recentes sugerem que a estimulação mediada por bactérias a receptores

Toll-like-2, modula positivamente a expressão de constituintes proteicos específicos de *tight junctions* (ROSE *et al.*, 2021).

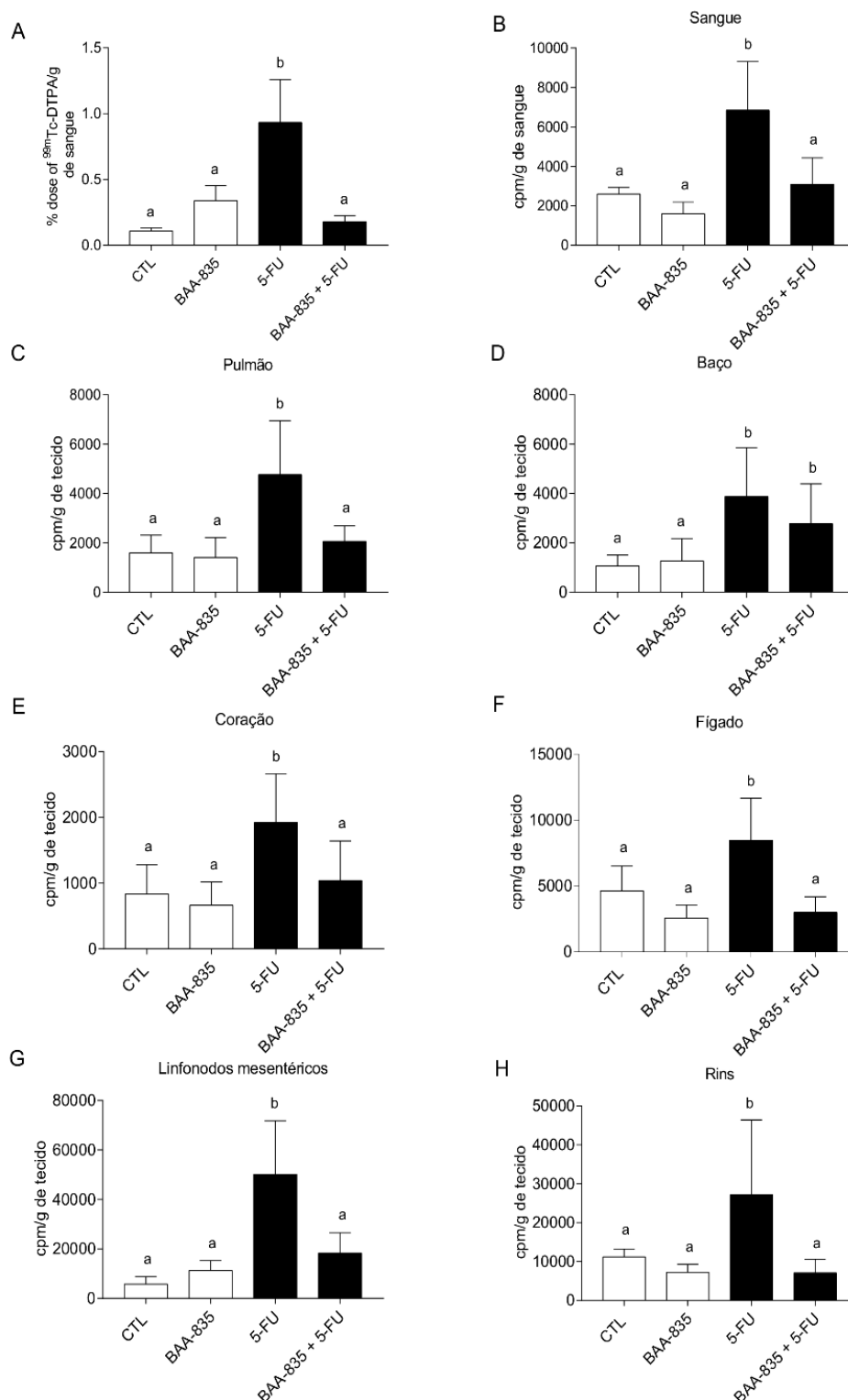
Resultados semelhantes foram observados por CRUZ-LEBRÓN *et al.* (2021), que demonstraram que vesículas extracelulares de *A. muciniphila* BAA-853, contribuíram para um aumento da expressão da proteína de junção ocludina, e redução da permeabilidade intestinal. Mais recentemente, outro trabalho revelou que *A. muciniphila* BAA-835 e sua proteína de parede Amuc_1100, regularam positivamente a expressão gênica de três proteínas de junção (zonulina, ocludina e claudina-1), em camundongos C57bl/6 (CHEN *et al.*, 2022). Juntos, estes dados sugerem que tanto os produtos do metabolismo da bactéria, bem como sua proteína de parede Amuc_1100, apresentam um papel funcional na regulação da integridade da barreira intestinal.

Além disso, é importante mencionar que *A. muciniphila* é uma bactéria degradadora de muco. Esta característica faz com que a bactéria promova um aumento da espessura da camada de muco que reveste o epitélio por um processo de compensação, uma vez que promove a expansão do número de células caliciformes (SHIN *et al.*, 2014). De um modo geral, a espessura da camada de muco está relacionada a saúde intestinal, uma vez que é observada menor permeabilidade devido a maior integridade da barreira intestinal. Portanto, além de atuar na expressão gênica das proteínas de junção, sugere-se que a bactéria também estimula a produção e espessamento da camada de muco que reveste o epitélio, corroborando para redução da PI.

Outro fator advindo da perda da integridade da barreira intestinal, por meio do aumento da PI é a translocação de bactérias presente no lúmen para o sangue e órgãos extra-intestinais. Este evento pode ser estratificado em três níveis: local, quando as bactérias atingem os linfonodos mesentéricos; regional, quando a bactéria se localiza no sistema venoso portal e no fígado; e sistêmico, quando é observada a presença de bactérias no sangue periférico e baço (WONG *et al.*, 2015). Inicialmente nossos resultados demonstram um nível de translocação fisiológico em animais saudáveis, cuja função é manter e amadurecer as defesas imunológicas do hospedeiro (BARROSO *et al.*, 2021), o que justifica os níveis basais de radioatividade detectado nos grupos CTL e BAA-835. Por outro lado, 5-FU induziu uma translocação bacteriana sistêmica associada à gravidade da mucosite. Esta condição simula um quadro de sepse que os pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico podem

desenvolver, sendo este um efeito colateral grave, com potencial risco de vida. Em nosso estudo, apesar do tratamento com *A. muciniphila* não demonstrar redução significativa de ^{99m}TC -*E. coli* no baço, a quantificação da radioatividade em amostras de sangue periférico e nos demais órgãos, incluindo os linfonodos mesentéricos, foram significativamente iguais em animais saudáveis (CTL). Este resultado sugere, pelo menos em parte, que o probiótico impediu a bacteremia local, regional e sistêmica, reforçando o benefício da bactéria na integridade da barreira intestinal.

Figura 19 - Avaliação da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana. (A) Permeabilidade intestinal por ^{99m}Tc -DTPA em amostras de sangue. Quantificação da translocação bacteriana em amostras de (B) Sangue, (C) Pulmão (D) Baço (E) Coração (F) Fígado, (G) Linfonodos mesentéricos e (H) Rins. As barras representam os grupos analisados: CTL: Controle, BAA-835: *A. muciniphila*, 5-FU: Mucosite, BAA-835 + 5-FU: tratamento com *A. muciniphila* e mucosite induzida. Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) por one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.8. Avaliação dos parâmetros histológicos, morfométricos e quantificação de células caliciformes

A perda da arquitetura intestinal é justificada pelas alterações inflamatórias induzidas pelos quimioterápicos durante a fase de amplificação de sinais, onde é observada a paralisação da divisão celular e apoptose das células. Assim, há uma perda significativa de células na cripta intestinal, encurtamento das vilosidades e depleção de células caliciformes, além de um intenso infiltrado inflamatório local.

Em relação as avaliações das alterações macroscópicas no tecido (Figura 20-A), foi utilizado um escore de dano à mucosa para quantificação dos resultados. Os achados histológicos revelaram que camundongos sem indução de mucosite (grupos CTL e BAA-835) apresentaram aspecto regular da mucosa intestinal, confirmando que a administração do probiótico não alterou a morfologia da mucosa, tendo sido observado apenas um leve infiltrado de células inflamatórias em animais do grupo BAA-835. Em contraste, a integridade da mucosa foi perdida nos animais submetidos à mucosite experimental (5-FU). Essas lesões caracterizavam-se por encurtamento das vilosidades, necrose das criptas e intenso infiltrado de células inflamatórias nas vilosidades, lâmina própria e submucosa, além de ulceração, edema e vacuolização. Por outro lado, o pré-tratamento com *A. muciniphila* em animais com mucosite induzida (BAA-835 + 5-FU) resultou em menor grau de lesão, apresentando redução moderada das vilosidades e aprofundamentos das criptas associado a um moderado infiltrado inflamatório em relação ao grupo 5-FU. Esses resultados indicam um escore significativamente reduzido após tratamento com o probiótico (Figura 20-B).

Além disso, as análises morfométricas confirmaram que os animais submetidos a mucosite experimental (5-FU) sofreram encurtamento significativo das vilosidades ($p < 0,0001$) (Figura 20-C) e um aumento da profundidade das criptas ($p = 0,02$) (Figura 20-D) quando comparados aos animais CTL. Estes efeitos foram significativamente atenuados no grupo BAA-835 + 5-FU ($p = 0,0008$; $p = 0,0007$, respectivamente). Além disso, a diminuição da relação vilosidade/cripta observada no grupo 5-FU (Figura 20-F) também foi revertida quando o probiótico foi administrado preventivamente ($p < 0,0001$).

Por último, as lâminas coradas em PAS evidenciaram que os animais com mucosite induzida apresentaram depleção visível do número de células caliciformes, enquanto que a administração do probiótico promoveu uma preservação destas

células (Figura 21-A). Utilizando o *software* ImageJ, foi possível obter a quantificação absoluta destas células. Assim, foi observado que a redução destas células no grupo 5-FU foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) quando comparados ao CTL, enquanto que o tratamento com *A. muciniphila* foi capaz de prevenir significativamente a perda de células caliciformes ($p = 0,04$) em comparação aos animais com mucosite induzida e não tratados (Figura 21-B).

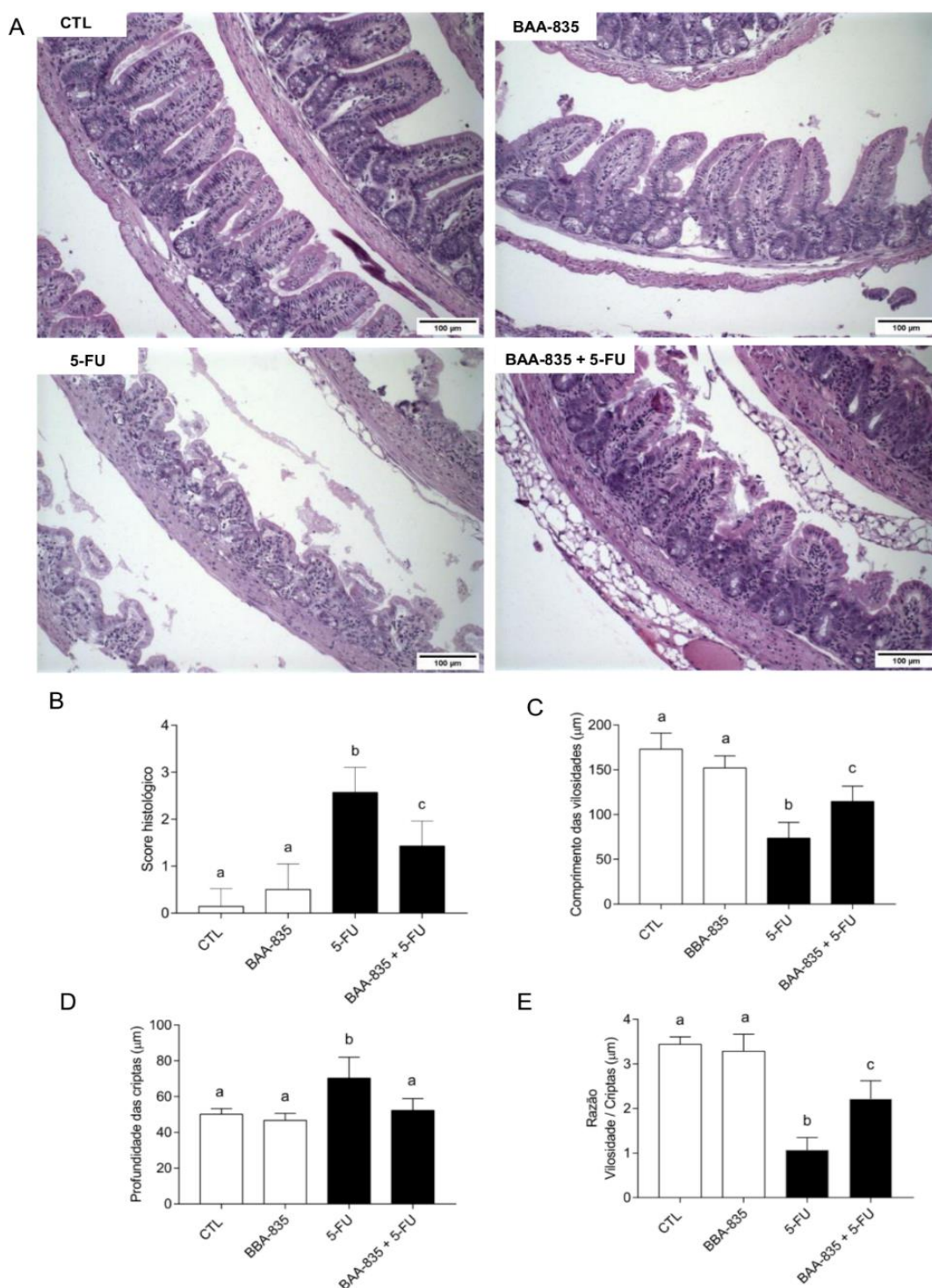
Nossos dados corroboram com os disponíveis na literatura, uma vez que o dano no epitélio intestinal ocasionado pelo uso de quimioterápicos contribui para redução das vilosidades, necrose das criptas, intenso infiltrado de células polimorfonucleares com considerável perda da arquitetura tecidual e de células caliciformes (STRINGER *et al.*, 2009). *Akkermansia muciniphila* foi capaz de atenuar todos estes efeitos ocasionados por 5-FU, especialmente garantindo a arquitetura tecidual e preservando as células caliciformes. Estes achados tem sido fortemente relacionado com as propriedades benéficas de *A. muciniphila* na atenuação de doenças intestinais (CHEN *et al.*, 2022; LIU *et al.*, 2022).

Um estudo utilizando aves demonstrou que um dos processos de reparo ativado por *A. muciniphila* capaz de restaurar o dano na mucosa intestinal, está relacionado ao fato do probiótico aumentar o número de células caliciformes devido a uma regulação positiva na expressão gênica de Mucina-2 (MUC-2) e fator trevo 2 (Tff-2). A expressão de Muc-2 resulta na secreção de mucina no intestino delgado, cólon e células epiteliais das vias aéreas. A proteína forma uma camada de muco na superfície do epitélio capaz de lubrificar e impedir a invasão e adesão de bactérias patogênicas. Por sua vez, o gene Tff-2 ainda não tem suas funções completamente elucidadas, mas a princípio sua indução leva a produção de proteínas que estão relacionadas a proteção contra danos na camada mucosa, e principalmente na cicatrização do epitélio intestinal (ZHU *et al.*, 2020).

Somado a isso, acredita-se que *A. muciniphila* também seja capaz de restaurar o dano intestinal por meio da produção de AGCC. Estes metabólitos, especialmente o butirato é considerado o principal nutriente para as células epiteliais intestinais (IECs). A obtenção de butirato a partir dos alimentos é extremamente baixa; contudo, *A. muciniphila* é capaz de produzir propionato, que é fermentado por bactérias da microbiota intestinal, que por sua vez secretam uma quantidade significativa de butirato capaz de nutrir as IECs (LIU *et al.*, 2022). Ainda assim, é importante salientar que, a estimulação de citocinas anti-inflamatórias, como IL10, supressão de citocinas

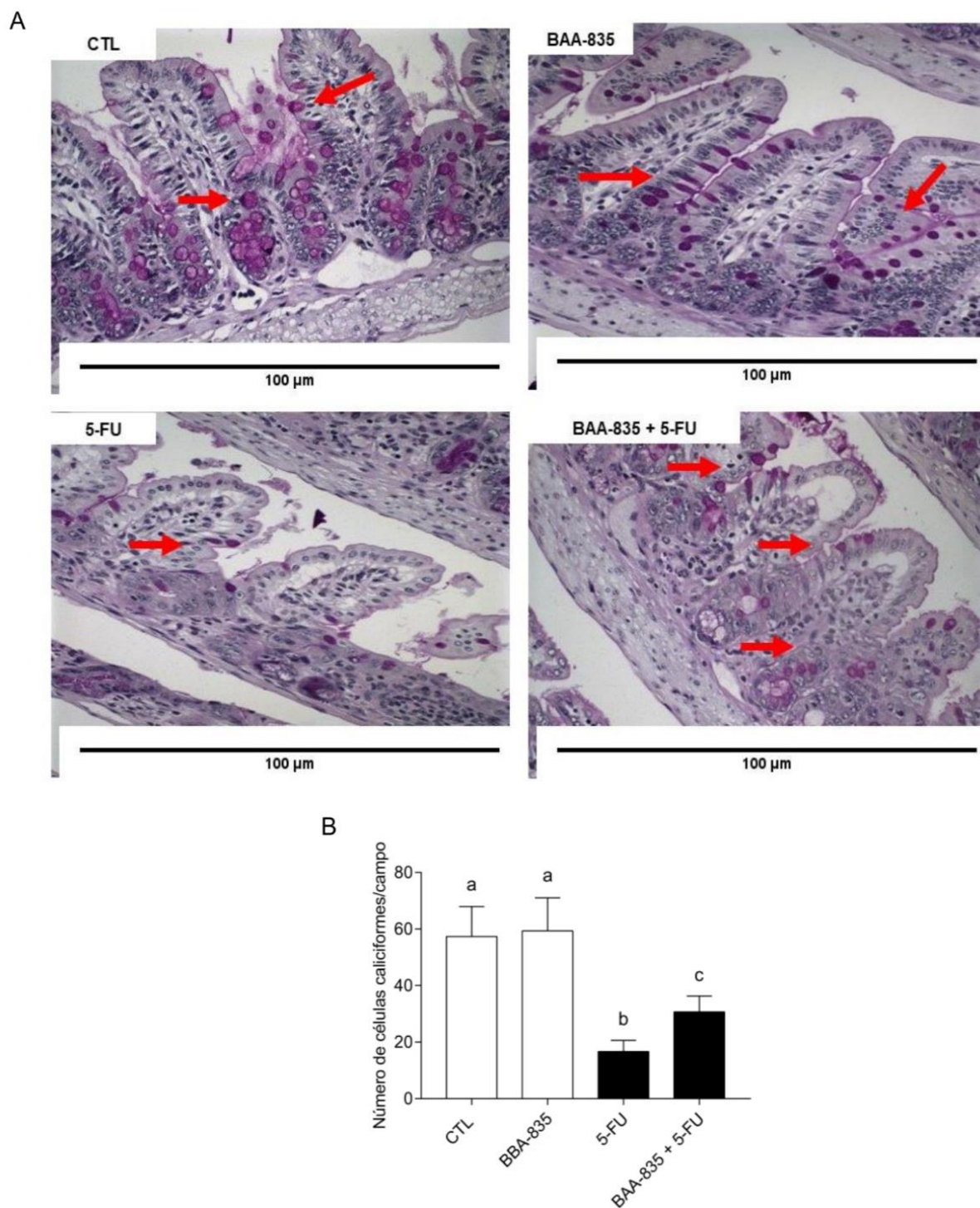
pró-inflamatórias e redução do estresse oxidativo tecidual também contribuem fortemente para manutenção do epitélio intestinal.

Figura 20 - Análise histológica e morfométrica do íleo de camundongos submetidos ao modelo murino de mucosite intestinal. (A) Fotodocumentação de lâminas de seções de íleo coradas em hematoxilina e eosina, representando todos os grupos experimentais. Demais figuras indicam a mensuração do (B) escore histológico (C) comprimento das vilosidades, (D) profundidade das criptas e (E) razão vilosidade/cripta. As barras indicam os grupos analisados, sendo CTL: controle, BAA-835: *A. muciniphila*, 5-FU: mucosite e BAA-835 + 5-FU: tratamento com *A. muciniphila* e mucosite induzida. Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) determinado por one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 - Quantificação de células caliciformes em seções de íleo de animais submetidos ao modelo de mucosite intestinal. (A) Fotodocumentação de lâminas de seções de íleo coradas em Alcian Blue, representando todos os grupos experimentais. (B) Quantificação do número de células caliciformes. Setas vermelhas evidenciam as células caliciformes. As barras indicam os grupos analisados, sendo CTL: controle, BAA-835: *A. muciniphila*, 5-FU: mucosite e BAA-835 + 5-FU: tratamento com *A. muciniphila* e mucosite induzida. Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) determinado por one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.9. Avaliação da população de enterobactérias e bactérias do ácido láctico

Em indivíduos saudáveis, a microbiota intestinal é composta por bactérias anaeróbias obrigatórias (*Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*) e anaeróbias facultativas (Lactobacilli, Enterococci, Streptococci e Enterobacteriaceae), que, juntas, desempenham um papel importante na manutenção da homeostase e integridade intestinal (AZAD *et al.*, 2018). Dados da literatura têm evidenciado que pacientes que realizam tratamento quimioterápico ou radioterápico apresentam mudanças marcantes na microbiota intestinal, como por exemplo, a diminuição de *Bifidobacterium*, Verrucomicrobia e Ruminococcaceae, bem como, o aumento de Enterobacteriaceae (TOUCHEFEU *et al.*, 2014).

A disbiose da microbiota intestinal é considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento da mucosite, por alterar a função de barreira intestinal, da imunidade inata e dos mecanismos de reparo intestinal (TOUCHEFEU *et al.*, 2014). Desta forma, com o objetivo de investigar a relação entre enterobactérias e bactérias do ácido láctico (BAL), amostras fecais foram processadas usando um método dependente de cultura.

Como esperado, nossos resultados demonstram que a indução da mucosite no grupo 5-FU resultou em um aumento significativo na população de enterobactérias ($p=0,01$) e uma redução no número de BAL ($p<0,0001$) em relação ao CTL. Entretanto, a administração preventiva de *A. muciniphila* em animais doentes demonstrou uma redução significativa de bactérias da família enterobactérias ($p=0,0009$) enquanto restaurou os níveis de BAL ($p=0,04$), quando comparados ao grupo 5-FU. Assim, estes dados sugerem que o probiótico é capaz de atenuar a disbiose da microbiota intestinal induzida por quimioterapia (Figura 22-A e B).

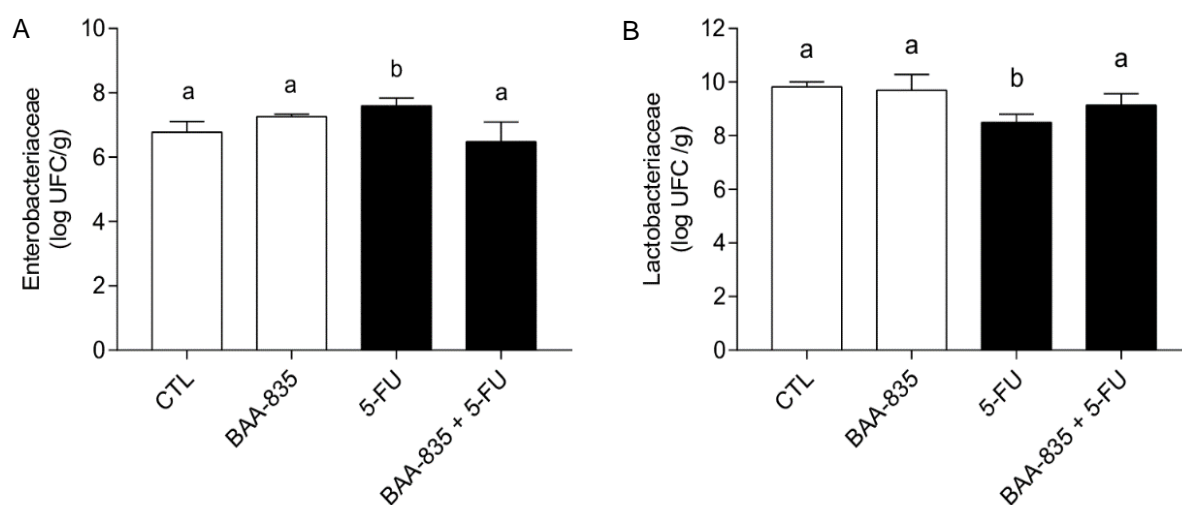
A disbiose observada na mucosite é frequentemente associada à diminuição da concentração de Lactobacillaceae e ao aumento das populações de Enterobacteriaceae, uma família bacteriana potencialmente prejudicial que contribui para a inflamação da mucosa intestinal quando encontrada em níveis elevados (SOUGIANNIS *et al.*, 2019; TANG *et al.*, 2017). No estudo de Menezes-Garcia *et al.* (2020), a ausência de microbiota em camundongos germ-free (GF) levou a um fenótipo protetor após a indução de mucosite. Esse resultado foi revertido quando camundongos GF foram monocolonizados com *E. coli*, um membro da família Enterobacteriaceae. Portanto, controlar a expansão de Enterobacteriaceae e, assim,

prevenir a disbiose é crucial para atenuar a gravidade da mucosite induzida por quimioterapia.

Um estudo conduzido por ATIQ e colaboradores (2019), sugerem que a redução do espessamento da camada de muco em animais com mucosite induzida, afeta a ecologia microbiana, reduzindo os locais de fixação para bactérias e a disponibilidade de nutrientes, o que resulta na diminuição de microrganismos comensais, como os *Lactobacillus* spp., enquanto permite que microrganismos patogênicos, como *E. coli* possam proliferar abundantemente. A expansão de enterobactérias também pode ser justificada pelo aumento no pH tecidual, uma vez que a população de *Lactobacillus* contribui para produção de ácido lático.

Resultados semelhantes foram observados por QUINTANILHA *et al.*, (2022), onde a administração preventiva de *B. longum* 5^{1A} para camundongos submetidos à mucosite intestinal por irinotecano, promoveu a recuperação de BAL enquanto reduziu significativamente a população de enterobactérias. Neste trabalho os autores ressaltam que muitos membros da família Enterobacteriaceae são patobiontes, uma vez que são frequentemente associados à ativação de uma série de mecanismos pró-inflamatórios. Portanto, a redução desta população bacteriana em animais tratados com o probiótico e com mucosite induzida, pode corroborar para redução da inflamação intestinal.

Figura 22 - Quantificação de enterobactérias e bactérias ácido-lática em amostras de fezes de camundongos submetidos ao modelo de mucosite intestinal. As barras representam os grupos analisados, sendo CTL: controle, BAA-835: *A. muciniphila*, 5-FU: mucosite e BAA-835 + 5-FU: tratamento com *A. muciniphila* e mucosite induzida. Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$), determinada por one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, observamos que células viáveis de *A. muciniphila* BAA-835 administradas preventivamente na concentração de 10^9 UFC apresentaram os melhores resultados para o manejo da mucosite induzida por quimioterapia em nosso modelo. Apesar da administração do probiótico não ter promovido o aumento no consumo de ração dos animais com mucosite induzida, os parâmetros clínicos mensurados pelo DAI indicaram uma redução da gravidade da doença. Além disso, as análises microbiológicas demonstram reversão da disbiose intestinal e atenuação da translocação bacteriana do lúmen intestinal para sangue e outros órgãos. Este fator pode ter sido influenciado pela redução da permeabilidade intestinal, bem como pela preservação da barreira e arquitetura do intestino. Nossos dados ainda demonstraram que *A. muciniphila* foi capaz de atenuar a perda de células caliciformes, preservar os níveis de sIgA, SOD e hidróperóxidos, enquanto promove uma regulação positiva de IL10 e suprime os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a ausência de interferência do probiótico nos níveis de leucócitos totais sugere que o microrganismo não apresenta impacto no efeito citotóxico do quimioterápico, mas é capaz de regular para níveis basais os leucócitos circulantes. Portanto, a administração probiótica de *A. muciniphila* é considerado um tratamento promissor para mucosite intestinal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H. A. *et al.* Mdm2 Is Required for Survival of Hematopoietic Stem Cells/Progenitors via Dampening of ROS-Induced p53 Activity. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 5, p. 606–617, 2010.

ALLAIRE, J. M. *et al.* The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 9, p. 677–696, 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Global Cancer Facts & Figures 4th Edition**. Atlanta, 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **How Chemotherapy Drugs Work.**, 2020. Disponível em: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work.html>. Acesso em: 4 mar. 2020.

ANDRADE, M. E. R. *et al.* Pretreatment and treatment With L-arginine attenuate weight loss and bacterial translocation in dextran sulfate sodium colitis. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 40, n. 8, p. 1131–1139, 2016.

ANVISA, A. N. D. V. S. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. 2008.

ARANTES, R. M. E.; NOGUEIRA, A. M. M. F. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. **Cell & Tissue Research**, v. 290, n. 1, p. 61, 1997.

ATIQ, A. *et al.* Diadzein ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppressing oxidative stress and inflammatory mediators in rodents. **European Journal of Pharmacology** v. 843, n. November 2018, p. 292–306, 2019.

AZAD, M. A. K. *et al.* Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–8, 2018.

BAE, J.-M. Prophylactic efficacy of probiotics on travelers' diarrhea: an adaptive meta-analysis of randomized controlled trials. **Epidemiology and Health**, v. 40, p. e2018043, 2018.

BAJIC, J. E. *et al.* Rhubarb extract partially improves mucosal integrity in chemotherapy-induced intestinal mucositis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 37, p. 8322, 2016.

BARROSO, F. A. L. *et al.* Intake of *Lactobacillus delbrueckii* (pExu:hsp65) Prevents the Inflammation and the Disorganization of the Intestinal Mucosa in a Mouse Model of Mucositis. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 107, 2021.

BAUTISTA-GALLEGO, J. *et al.* Probiotic potential of a *Lactobacillus rhamnosus* cheese isolate and its effect on the fecal microbiota of healthy volunteers. **Food Research International**, v. 119, n. January, p. 305–314, 2019.

BEUTHEU, S. *et al.* Glutamine supplementation, but not combined glutamine and arginine supplementation, improves gut barrier function during chemotherapy-induced intestinal mucositis in rats. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 4, p. 694–701, 2014.

BLIJLEVENS, N. M. A.; LOGAN, R. M.; NETEA, M. G. Mucositis: from febrile neutropenia to febrile mucositis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n.1, p. i36–i40, 2009.

BOSHTAM, M. *et al.* Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. **Inflammation**, v. 40, n. 1, p. 340–349, 2017.

BOWEN, J. *et al.* The pathogenesis of mucositis: updated perspectives and emerging targets. **Supportive Care in Cancer**, v. 27, n. 10, p. 4023–4033, 2019.

BRAHE, L. K. *et al.* Specific gut microbiota features and metabolic markers in postmenopausal women with obesity. **Nutrition & Diabetes**, v. 5, n. 6, p. e159–e159, 2015.

BRANDI, G. Intestinal Microflora and Digestive Toxicity of Irinotecan in Mice. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 1299–1307, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Câncer: sintomas, causas, tipos e tratamentos**. 2020. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer>. Acesso em: 23 jan. 2020.

BRASIL. **Lei nº 11.794 de 9 de outubro de 2008. Estabelecimento de procedimentos para uso científico de animais**. 2008. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm. Acesso em: 20 maio 2020.

CAI, X. *et al.* The probiotic effects, dose, and duration of lactic acid bacteria on disease resistance in *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Reports**, v. 26, n. January, p. 101299, 2022.

CAMILLERI, M. *et al.* Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 24, n. 6, p. 503–512, 2012.

CANI, P. D.; DE VOS, W. M. Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of *Akkermansia muciniphila*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–8, 2017.

CHARTIER, L. C.; HOWARTH, G. S.; MASHTOUB, S. Chemotherapy-induced mucositis development in a murine model of colitis-associated colorectal cancer. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 55, n. 1, p. 47–54, 2020.

CHEN, S. *et al.* *Akkermansia muciniphila* and its outer membrane protein Amuc_1100 prophylactically attenuate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 614, p. 34–40, 2022.

CHENG, L. K. *et al.* Gastrointestinal system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 65–79, 2010.

CINAUSERO, M. *et al.* New Frontiers in the Pathobiology and Treatment of Cancer

Regimen-Related Mucosal Injury. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JUN, p. 1–16, 2017.

iniphila, a Mucin-Degrading Member of the Intestinal Microbiota Present in Infants, Adults, and the Elderly. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 23, p. 7767–7770, 2007.

COUTINHO, J. O. P. A. *et al.* Antarctic strain of *Rhodotorula mucilaginosa* UFMGCB 18,377 attenuates mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 14, n. 3, p. 486–500, 2022.

CRUZ-LEBRÓN, A. *et al.* Chronic opioid use modulates human enteric microbiota and intestinal barrier integrity. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, 2021.

DE BARROS, P. A. V. *et al.* Conjugated linoleic acid prevents damage caused by intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in an experimental model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, n. January, p. 1567–1576, 2018.

DE JESUS, L. C. L. *et al.* Protective effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* CIDCA 133 in a model of 5 Fluorouracil-Induced intestinal mucositis. **Journal of Functional Foods**, v. 53, n. October 2018, p. 197–207, 2019.

DERRIEN, M. *et al.* *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1469–1476, 2004.

DERRIEN, M.; BELZER, C.; DE VOS, W. M. . *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. **Microbial Pathogenesis**, v. 106, p. 171–181, 2017.

DINAN, T. G.; QUIGLEY, E. M. Probiotics in the Treatment of Depression: Science or Science Fiction?. **Australian & New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 45, n. 12, p. 1023–1025, 2011.

DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 20–32, 2016.

EDUARDO, F. de P. *et al.* Impact of Oral and Gastrointestinal Mucositis on Body Weight Alterations during Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Nutrition and Cancer**, v. 70, n. 2, p. 241–248, 2018.

EVERARD, A. *et al.* Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 22, p. 9066–9071, 2013.

FAO/WHO, F. and A. O. of the U. N. W. H. O. **Organization Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food.**, 2002.

FASANO, A. Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 151–175, 2011.

FERNANDES, C. *et al.* Role of regulatory T cells in irinotecan-induced intestinal

mucositis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 115, n. May 2017, p. 158–166, 2018.

FERREIRA, T. M. *et al.* Oral Supplementation of Butyrate Reduces Mucositis and Intestinal Permeability Associated with 5-Fluorouracil Administration. **Lipids**, v. 47, n. 7, p. 669–678, 2012.

FIJLSTRA, M. *et al.* Lactose maldigestion during methotrexate-induced gastrointestinal mucositis in a rat model. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 300, n. 2, p. G283–G291, 2011.

FORSSTEN, S.; OUWEHAND, A. C. Dose-Response Recovery of Probiotic Strains in Simulated Gastro-Intestinal Passage. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 112, 2020.

GEHART, H.; CLEVERS, H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 1, p. 19–34, 2019.

GEORGE, R. P. *et al.* A Judgement Bias Test to Assess Affective State and Potential Therapeutics in a Rat Model of Chemotherapy-Induced Mucositis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8193, 2018.

GERALDO, B. M. C. *et al.* Heat-killed *Lactobacillus reuteri* and cell-free culture supernatant have similar effects to viable probiotics during interaction with *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Periodontal Research**, v. 55, n. 2, p. 215–220, 2020.

GIORGIO, V. *et al.* Intestinal permeability is increased in children with non-alcoholic fatty liver disease, and correlates with liver disease severity. **Digestive and Liver Disease**, v. 46, n. 6, p. 556–560, 2014.

GLOBAL MARKET INSIGHTS INC. **Probiotics Market Size to Exceed USD 64 Billion by 2023: Global Market Insights Inc.** 2016. Disponível em: <https://www.prnewswire.com/news-releases/probiotics-market-size-to-exceed-usd-64-billion-by-2023-global-market-insights-inc-578769201.html>. Acesso em: 22 maio 2019.

GOTOH, Y. *et al.* A dose-finding study for a supplement containing *Lactococcus lactis* subsp. cremoris FC in healthy adults with mild constipation. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 39, n. 1, p. 19–22, 2020.

HAMILTON, M. K. *et al.* Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 308, n. 10, p. G840–G851, 2015.

HARTOG, A. *et al.* A potential role for regulatory T-cells in the amelioration of DSS induced colitis by dietary non-digestible polysaccharides. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 3, p. 227–233, 2015.

HEIDELBERGER, C. *et al.* Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. **Nature**, v. 179, n. 4561, p. 663–666, 1957.

HEMARAJATA, P.; VERSALOVIC, J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 39–51, 2013.

HILL, C. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HOMA-MLAK, I. *et al.* Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio as a Factor Predicting Radiotherapy Induced Oral Mucositis in Head Neck Cancer Patients Treated with Radiotherapy. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 19, p. 4444, 2021.

HOOPER, L. Bacterial contributions to mammalian gut development. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 129–134, 2004.

HU, C. A. *et al.* Autophagy and tight junction proteins in the intestine and intestinal diseases. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 123–127, 2015.

HU, M. *et al.* Lactobacillus rhamnosus FLRH93 protects against intestinal damage in mice induced by 5-fluorouracil. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 6, p. 5003–5018, 2020.

HUCK, O. *et al.* *Akkermansia muciniphila* reduces *Porphyromonas gingivalis* -induced inflammation and periodontal bone destruction. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 47, n. 2, p. 202–212, 2020.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O que é câncer**. 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 9 jan. 2020.

JUSTINO, P. F. C. *et al.* Modulation of 5-fluorouracil activation of toll-like/MyD88/NF- κ B/MAPK pathway by *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 probiotic. **Cytokine**, v. 125, n. February 2019, p. 154791, 2020.

JUSTINO, P. F. C. *et al.* Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 9, p. 1611–1621, 2014.

KARLSSON, C. L. J. *et al.* The Microbiota of the Gut in Preschool Children With Normal and Excessive Body Weight. **Obesity**, v. 20, n. 11, p. 2257–2261, 2012.

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.

KAWASHIMA, T. *et al.* The molecular mechanism for activating IgA production by *Pediococcus acidilactici*K15 and the clinical impact in a randomized trial. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5065, 2018.

KEEFE, D. M. Intestinal mucositis: mechanisms and management. **Current Opinion in Oncology**, v. 19, n. 4, p. 323–327, 2007.

KIKUCHI, Y. *et al.* Oral Administration of *Lactobacillus plantarum* Strain AYA Enhances IgA Secretion and Provides Survival Protection against Influenza Virus Infection in Mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86416, 2014.

KÖNIG, J. *et al.* Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 7, n. 10, p. e196, 2016.

KORPELA, K. *et al.* Selective maternal seeding and environment shape the human gut microbiome. **Genome Research**, v. 28, n. 4, p. 561–568, 2018.

KUNDU, P. *et al.* Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self. **Cell**, v. 171, n. 7, p. 1481–1493, 2017.

LARSON, S. C. TRAVELER'S DIARRHEA. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 15, n. 1, p. 179–189, 1997.

LI, H.-L. *et al.* Alteration of Gut Microbiota and Inflammatory Cytokine/Chemokine Profiles in 5-Fluorouracil Induced Intestinal Mucositis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. October, p. 455, 2017.

LI, X.-Q. *et al.* Risks Associated with High-Dose *Lactobacillus rhamnosus* in an *Escherichia coli* Model of Piglet Diarrhoea: Intestinal Microbiota and Immune Imbalances. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40666, 2012.

LIU, M.-J. *et al.* Recent findings in *Akkermansia muciniphila*-regulated metabolism and its role in intestinal diseases. **Clinical Nutrition**, v. 41, n. 10, p. 2333–2344, 2022.

LOGAN, R. M. *et al.* The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: Pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, n. 5, p. 448–460, 2007.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, 2003.

LOWRY, O. *et al.* PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUKOVAC, S. *et al.* Differential Modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of Host Peripheral Lipid Metabolism and Histone Acetylation in Mouse Gut Organoids. **mBio**, v. 5, n. 4, p. 1–10, 2014.

MA, J. *et al.* Oral administration of a mixture of probiotics protects against food allergy via induction of CD103+ dendritic cells and modulates the intestinal microbiota. **Journal of Functional Foods**, v. 55, n. October 2018, p. 65–75, 2019.

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. 6, 2014.

MANTIS, N. J.; ROL, N.; CORTHÉSY, B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 6, p. 603–611, 2011.

MARTINS, F. S. *et al.* Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. **Archives of Microbiology**, v. 191, n. 8, p. 623–630, 2009.

MASHTOUB, S. *et al.* Oral Nucleotides Only Minimally Improve 5-Fluorouracil-Induced Mucositis in Rats. **Nutrition and Cancer**, v. 67, n. 6, p. 994–1000, 2015..

MCFARLAND, L. V.; DUBLIN, S. Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 17, p. 2650, 2008.

MENTA, P. L. R. *et al.* Interesterified palm oil increases intestinal permeability, promotes bacterial translocation, alters inflammatory parameters and tight-junction protein gene expression in Swiss mice. **Food Research International**, v. 151, n. March 2021, p. 110897, 2022.

of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. **Revista Brasileira De Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552–580, 2010.

MILANI, T. M. S. *et al.* Dose–Response Effect of *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 on the Prevention of Asthma in an Animal Model. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, n. 0123456789, p. 5660, 2022.

MIRANDA, V. C. *et al.* Effect of *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 in a murine model of food allergy. **Beneficial Microbes**, v. 11, n. 3, p. 255–268, 2020.

MIURA, K. *et al.* 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administerable 5-FU Drugs. **Cancers**, v. 2, n. 3, p. 1717–1730, 2010.

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667–685, 2014.

MURESAN-POP, M. *et al.* Structural characterization of 5-fluorouracil & piperazine new solid forms and evaluation of their antitumor activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1207, p. 127842, 2020.

NAGAYOSHI, H. *et al.* 5-Fluorouracil Infusion Reduces Gut-Associated Lymphoid Tissue Cell Number and Mucosal Immunoglobulin A Levels. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 29, n. 6, p. 395–400, 2005.

NAITO, Y.; UCHIYAMA, K.; TAKAGI, T. A next-generation beneficial microbe: *Akkermansia muciniphila*. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 63, n. 1, p. 33–35, 2018.

NELSON, K. A.; WALSH, D.; SHEEHAN, F. A. The cancer anorexia-cachexia syndrome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 12, n. 1, p. 213–225, 1994.

NUMAZAWA, S. *et al.* Possible Involvement of Oxidative Stress in 5-Fluorouracil-Mediated Myelosuppression in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 108, n. 1, p. 40–45, 2010.

OGGIONI, M. R. *et al.* Recurrent Septicemia in an Immunocompromised Patient Due

to Probiotic Strains of *Bacillus subtilis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 325–326, 1998.

OTTMAN, N. *et al.* Pili-like proteins of *Akkermansia muciniphila* modulate host immune responses and gut barrier function. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0173004, 2017.

OUWEHAND, A. C. A review of dose-responses of probiotics in human studies. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 2, p. 143–151, 2017.

PEDROSO, S. H. S. P. *et al.* Evaluation of mucositis induced by irinotecan after microbial colonization in germ-free mice. **Microbiology**, v. 161, n. 10, p. 1950–1960, 2015.

PELASEYED, T. *et al.* The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. **Immunological Reviews**, v. 260, n. 1, p. 8–20, 2014.

PLOVIER, H. *et al.* A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. **Nature Medicine**, v. 23, n. 1, p. 107–113, 2017.

PNG, C. W. *et al.* Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. **American Journal of Gastroenterology**, v. 105, n. 11, p. 2420–2428, 2010.

PRAKASH, S. *et al.* Probiotics for the Prevention and Treatment of Allergies, with an Emphasis on Mode of Delivery and Mechanism of Action. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 6, p. 1025–1037, 2014.

QUINTANILHA, M. F. *et al.* Bifidobacterium longum subsp. longum 51A attenuates intestinal injury against irinotecan-induced mucositis in mice. **Life Sciences**, v. 289, n. July 2021, p. 120243, 2022.

REED, K. K.; WICKHAM, R. Review of the Gastrointestinal Tract: From Macro to Micro. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 25, n. 1, p. 3–14, 2009.

REID, G.; GADIR, A. A.; DHIR, R. Probiotics: Reiterating What They Are and What They Are Not. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. March, p. 1–6, 2019.

REINKE, D. *et al.* Herbal Substance, Acteoside, Alleviates Intestinal Mucositis in Mice. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

RODRIGUES, R. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in goat milk matrix modulates intestinal inflammation involving NF- κ B p65 and SOCs-1 in an acid-induced colitis model. **Journal of Functional Foods**, v. 50, n. July, p. 78–92, 2018.

ROSE, E. C. *et al.* Probiotics, prebiotics and epithelial tight junctions: A promising approach to modulate intestinal barrier function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, 2021.

ROŠKAR, I. *et al.* Effects of a probiotic product containing Bifidobacterium animalis subsp. animalis IM386 and *Lactobacillus plantarum* MP2026 in lactose intolerant

individuals: Randomized, placebo-controlled clinical trial. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 1–8, 2017.

RUTMAN, R. J.; CANTAROW, A.; PASCHKIS, K. E. Studies in 2-Acetylaminofluorene Carcinogenesis: III. The Utilization of Uracil-2-C14 by Preneoplastic Rat Liver and Rat Hepatoma. **Cancer Research**, v. 14, n. 2, p. 119–123, 1954.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1–16, 2006.

SALMINEN, S. *et al.* The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 9, p. 649–667, 2021.

SALVA, S. *et al.* Probiotic *Lactobacillus* strains protect against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. **International Immunopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 209–221, 2014.

SALVO ROMERO, E. *et al.* The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 108, p. 686–695, 2015.

SANTOS ROCHA, C. *et al.* Local and Systemic Immune Mechanisms Underlying the Anti-Colitis Effects of the Dairy *Bacterium Lactobacillus delbrueckii*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85923, 2014.

SARA, J. D. *et al.* 5-fluorouracil and cardiotoxicity: a review. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 10, n. 6, p. 18, 2018.

SAWADA, D. *et al.* Effect of continuous ingestion of a beverage prepared with *Lactobacillus gasseri* CP2305 inactivated by heat treatment on the regulation of intestinal function. **Food Research International**, v. 79, p. 33–39, 2016.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLOS Biology**, v. 14, n. 8, p. e1002533, 2016.

SHIELDS, M. Chemotherapeutics. *In*: PHARMACOGNOSY. Elsevier, 2017. p. 295–313.

SHIN, N. R. *et al.* An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. **Gut**, v. 63, n. 5, p. 727–735, 2014.

SHINDE, T. *et al.* Probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 spores exhibit excellent in-vitro functional efficacy in simulated gastric survival, mucosal adhesion and immunomodulation. **Journal of Functional Foods**, v. 52, n. October 2018, p. 100–108, 2019.

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

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.

SONG, M. *et al.* Wheat bran arabinoxylan supplementation alleviates 5-fluorouracil induced mucositis and myelosuppression in BALB/c mice. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 312–320, 2016.

SONG, M.-K.; PARK, M.-Y.; SUNG, M.-K. 5-Fluorouracil-Induced Changes of Intestinal Integrity Biomarkers in BALB/C Mice. **Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 4, p. 322–329, 2013.

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

SOUGIANNIS, A. T. *et al.* Impact of 5 fluorouracil chemotherapy on gut inflammation, functional parameters, and gut microbiota. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 80, n. 1, p. 44–55, 2019.

SOUZA, D. G. *et al.* Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, n. 8, p. 1800–1808, 2000.

SOUZA, É. L. *et al.* Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis by modulating intestinal permeability, the inflammatory response and clinical signs in a faecal transplantation model. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 201–210, 2016.

SPROCKETT, D.; FUKAMI, T.; RELMAN, D. A. Role of priority effects in the early-life assembly of the gut microbiota. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 4, p. 197–205, 2018.

STRINGER, A. M. **Chemotherapy-induced mucositis: The role of gastrointestinal microflora and mucins in the luminal environment**. 2008. - The University of Adelaide, 2008.

STRINGER, A. M. *et al.* Gastrointestinal Microflora and Mucins May Play a Critical Role in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Gastrointestinal Mucositis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 4, p. 430–441, 2009.

SUGAWARA, T. *et al.* Daily Intake of Paraprobiotic *Lactobacillus amylovorus* CP1563 Improves Pre-Obese Conditions and Affects the Gut Microbial Community in Healthy Pre-Obese Subjects: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 304, 2020.

SUKHOTNIK, I. *et al.* Glutamine attenuates the inhibitory effect of methotrexate on TLR signaling during intestinal chemotherapy-induced mucositis in a rat. **Nutrition & Metabolism**, v. 11, n. 1, p. 17, 2014.

TANG, Y. *et al.* Administration of probiotic mixture DM#1 ameliorated 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis and dysbiosis in rats. **Nutrition**, v. 33, p. 96–104, 2017.

TAP, J. *et al.* Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 2574–2584, 2009. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-2920.2009.01982.x>.

THOMAS, S. A. *et al.* Adverse Effects of 5-fluorouracil: Focus on Rare Side Effects. **Cancer Cell & Microenvironment**, p. 3–6, 2016.

THOMAS, S. *et al.* The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. **Cancer Research**, v. 77, n. 8, p. 1783–1812, 2017.

THOMAS, C. M.; VERSALOVIC, J. Probiotics-host communication. **Gut Microbes**, v. 1, n. 3, p. 148–163, 2010.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. **Gut**, v. 63, n. 9, p. 1513–1521, 2014.

TOOLEY, K. L. *et al.* Oral ingestion of *Streptococcus thermophilus* does not affect mucositis severity or tumor progression in the tumor-bearing rat. **Cancer Biology & Therapy**, v. 12, n. 2, p. 131–138, 2011.

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 & Therapeutics**, v. 40, n. 5, p. n/a-n/a, 2014.

UENO, A. Th17 plasticity and its changes associated with inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 43, p. 12283, 2015.

VANCAMELBEKE, M.; VERMEIRE, S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 9, p. 821–834, 2017.

VARAVALLO, M. A.; THOMÉ, J. N.; TESHIMA, E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 83, 2008.

VIEIRA, L. Q. *et al.* Uso de probióticos na prevenção e tratamento de infecções e inflamações gastrintestinais. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 17, n. 1/2, p. 45–53, 2007.

WANG, L. *et al.* A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurised bacterium blunts colitis associated tumourigenesis by modulation of CD8 + T cells in mice. **Gut**, v. 69, n. 11, p. 1988–1997, 2020.

WANG, S. *et al.* Echinacoside improves hematopoietic function in 5-FU-induced myelosuppression mice. **Life Sciences**, v. 123, p. 86–92, 2015.

WANG, Y.; HAN, Q.; ZHANG, H. Evaluation of the toxicity of 5-fluorouracil on three digestive enzymes from the view of side effects. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 220, p. 117105, 2019.

WELLS, J. M.; SPENCE, J. R. How to make an intestine. **Development**, v. 141, n. 4, p. 752–760, 2014.

WHORWELL, P. J. *et al.* Efficacy of an Encapsulated Probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 in Women with Irritable Bowel Syndrome. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 101, n. 7, p. 1581–1590, 2006.

WIRTZ, S. *et al.* Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nature Protocols**, v. 2, n. 3, p. 541–546, 2007.

WONG, D. V. T. *et al.* The Adaptor Protein Myd88 Is a Key Signaling Molecule in the Pathogenesis of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139985, 2015.

XING, J. *et al.* Comparative genomic and functional analysis of *Akkermansia muciniphila* and closely related species. **Genes & Genomics**, v. 41, n. 11, p. 1253–1264, 2019.

YOUNUS, H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. **International journal of health sciences**, v. 12, n. 3, p. 88–93, 2018.

ZHANG, N. *et al.* 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1551–1569, 2008.

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

ZHOU, K. Strategies to promote abundance of *Akkermansia muciniphila*, an emerging probiotics in the gut, evidence from dietary intervention studies. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 194–201, 2017.

ZHU, L. *et al.* *Akkermansia muciniphila* protects intestinal mucosa from damage caused by *S. pullorum* by initiating proliferation of intestinal epithelium. **Veterinary Research**, v. 51, n. 1, p. 34, 2020.

ANEXO A – CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Universidade Federal de Minas Gerais

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CERTIFICADO/CERTIFICATE

Certificamos que o Protocolo nº. 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 Flávio 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 nº. 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 Flávio 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

Fonte: Comissão de ética no uso de animais (CEUA)

ANEXO B – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1. Artigos submetidos para publicação

MIRANDA, V.C., ASSIS, H.C., **SOUZA, R.O.**, QUINTANILHA, M.F., GALLOTTI, B., FARIA, A.M.C., NICOLI, J.R., CARA, D.C., MARTINS, F.S. “A next-generation microorganism (*Akkermansia muciniphila* BAA-835) presents probiotic and paraprobiotic potential against ovalbumin food allergy” **Beneficial Microbes**

LAGUNA, J.G., FREITAS, A. S., BARROSO, F. A. L., DE JESUS, L. C. L., VASCONCELOS, O. A. G. G., QUARESMA, L. S., AMERICO, M. F., CAMPOS, G. M., GLORIA, R. A., DUTRA, J. C. F., SILVA, T. F., VITAL, K. D., FERNANDES, S. O., **SOUZA, R. O.**, MARTINS, F. S., FERREIRA, E., SANTOS, T. M., BIRBRAIR, A., OLIVEIRA, M. F.A., FARIA, A. M.C., VENANZI, F. A., AZEVEDO, V. A. C. “P62 Protein-Based Gene Therapy Alleviates DSS-induced Colitis in Mice” for possible publication in Applied Microbiology and Biotechnology, and you are listed as one of the co-authors.” **Applied Microbiology and Biotechnology**

2. Artigo aceito para publicação

SOUZA, RAMON O *et al.* Evaluation of the dose-response, viability, and treatment protocol of the next-generation probiotic *Akkermansia muciniphila* BAA-835 in the attenuation of intestinal mucositis in mice **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2023

3. Artigos publicados

OLIVEIRA, Samantha RM *et al.* Evaluation of a Functional Craft Wheat Beer Fermented with *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 to treat *Salmonella Typhimurium* infection in mice. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-13, 2022.

QUINTANILHA, Mônica F. *et al.* *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 51A attenuates intestinal injury against irinotecan-induced mucositis in mice. **Life Sciences**, v. 289, p. 120243, 2022.

GALLOTTI, B. *et al.* Effects of dietary fibre intake in chemotherapy-induced mucositis in murine model. **British Journal of Nutrition**, v. 126, n. 6, p. 853-864, 2021.