

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Genética, Ecologia e Evolução
Programa de Pós-graduação em Genética

Rafael de Assis Glória

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROBIÓTICOS E POSBIÓTICOS DAS LINHAGENS
***Escherichia coli* CEC15 E Nissle 1917 EM MODELO MURINO DE MUCOSITE**
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL

Belo Horizonte

2023

Rafael de Assis Glória

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROBIÓTICOS E POSBIÓTICOS DAS LINHAGENS
Escherichia coli CEC15 E Nissle 1917 EM MODELO MURINO DE MUCOSITE
INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Belo Horizonte

2023

043

Glória, Rafael de Assis.

Avaliação dos efeitos probióticos e posbióticos das linhagens *Escherichia coli* CEC15 e Nissle 1917 em modelo murino de mucosite induzida por 5-fluorouracil [manuscrito] / Rafael de Assis Glória. – 2023.

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

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Probióticos. 3. *Escherichia coli*. 4. Mucosite. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575



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

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO	353/2023 entrada 2º/2021 CPF: 114.661.076-93
Rafael de Assis Glória	

Às nove horas e trinta minutos do dia **12 de dezembro de 2023**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Avaliação dos efeitos probióticos e posbióticos das linhagens Escherichia coli CEC15 e Nissle 1917 em modelo murino de mucosite induzida por 5-fluorouracil**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para 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. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Vasco Ariston de Carvalho Azevedo	UFMG	283.171.225-49	APROVADO
Ana Lúcia Brunialti Godard	UFMG	107.961.538-50	APROVADO
Flaviano dos Santos Martins	UFMG	043.684.029-00	APROVADO
Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho	UFBA	080.173.536-00	APROVADO

Pelas indicações, 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.

Belo Horizonte, 12 de dezembro de 2023.

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador (UFMG)

Ana Lúcia Brunialti Godard (UFMG)

Flaviano dos Santos Martins (UFMG)

Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho (UFBA)

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho, Usuário Externo**, em 12/12/2023, às 11:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Lucia Brunialti Godard, Professora do Magistério Superior**, em 12/12/2023, às 14:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flaviano dos Santos Martins, Professor do Magistério Superior**, em 12/12/2023, às 14:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 18/12/2023, às 22:15, 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 **2888878** e o código CRC **318472C3**.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço aos integrantes do LGCM, atuais e passados que, de alguma forma, fizeram parte do desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pela oportunidade, não somente de produzir essa dissertação, mas de me desenvolver e progredir como pessoa e profissional.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais que me acolheu desde a graduação, ao Instituto de Ciências Biológicas que se tornou minha segunda casa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética por meio do qual encontrei a minha paixão por genética e biotecnologia. Obrigado a cada servidor técnico e administrativo e aos profissionais terceirizados, que trabalham pra tornar possíveis os sonhos de muitos que, assim como eu, vislumbraram a possibilidade de alcançar seus objetivos por meio de um ensino de qualidade, gratuito e transformador em todos os possíveis sentidos. Aqui agradeço especialmente à técnica Renata Peixoto, responsável pelo Núcleo de Análise de Genoma (NAGe) que foi de grande ajuda nas análises de RT-*q*PCR.

Agradeço a todos aqueles que colaboraram de algum modo para o desenvolvimento dessa dissertação. Ao Prof. Dr. Ênio Ferreira, agradeço a colaboração nas análises histológicas e pelas boas conversas e à equipe do Laboratório de Radioisótopos, em especial à M^a. Katia Vital, agradeço a colaboração na análise de permeabilidade intestinal.

Aos membros convidados à banca examinadora, Prof^a. Dr^a Ana Lúcia Brunialti Godard, Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins e Prof. Dr. Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho agradeço por aceitarem o convite para avaliar este trabalho e por todas as contribuições que lapidaram esta dissertação.

Agradeço à minha família que sempre me apoiou e incentivou, independente das adversidades ou limitações. Minha mãe, Fátima, meu pai, Avairdo, meu irmão Marcelo, minha irmã Tamires e meu filho, Luis Miguel. Obrigado por acreditarem que seria possível. Agradeço aos meus amigos, Tales da Silva, Andreza dos Santos e Paloma Silva. Vocês foram meu sustento e minha força ao longo deste processo.

Por fim, agradeço às agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG que deram o aporte financeiro necessário para a realização deste trabalho.

RESUMO

Probióticos são microrganismos vivos administrados em quantidades adequadas que promovem benefícios à saúde do hospedeiro. Por outro lado, os posbióticos são preparações de microrganismos inativados, lizados ou com sua estrutura celular preservada, contendo ou não seus produtos metabólicos secretados, e que proporcionam benefícios ao hospedeiro quando administrados em quantidades apropriadas.

Dentre os probióticos, linhagens de bactérias Gram-negativas da espécie *Escherichia coli* se destacam, como as linhagens *E. coli* Nissle 1917 (EcN) que compõe o probiótico Mutaflor, *E. coli* A0 34/86 presente no Colinfant newborn e as linhagens *E. coli* G1/2, G3/10, G4/9, G5, G6/7 e G8 que compõem o probiótico Symbioflor2. Ambos são comercializados como suplementos para melhora da saúde intestinal. Estudos com a linhagem *E. coli* CEC15 demonstraram seus efeitos benéficos em modelos de colite induzida por TNBS. Essa linhagem foi isolada de fezes de ratos lactentes e demonstrou capacidade de colonizar o TGI de ratos axênicos desencadeando uma resposta adaptativa no epitélio colônico, promovendo uma remodelação do tecido epitelial e causando melhora em aspectos associados à barreira intestinal.

Observando estes resultados, este trabalho busca avaliar os efeitos posbióticos na forma de bactérias inativadas pelo calor e sobrenadante livre de células, em comparação com o efeito probiótico de EcN e CEC15 na atenuação da mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil (5-FU) em camundongos. Os tratamentos com CEC15 viva e inativado pelo calor atenuaram a perda de peso, preservaram o comprimento intestinal, reduziram os danos histológicos, reduziram a perda de células caliciformes, diminuíram a infiltração de neutrófilos e modularam a expressão de genes inflamatórios e de barreira em comparação com os controles de 5-FU. EcN mostrou efeitos mais limitados. CEC15 aumentou a expressão do gene de muco (*MUC2*) e da proteína de junções firmes TJP1.

Em geral, CEC15 demonstrou efeitos protetores contra a mucosite induzida por 5-FU quando administrado como viva, inativado pelo calor ou como sobrenadante. Isso sugere que CEC15 proporciona benefícios por meio de metabólitos secretados e não requer viabilidade. Este estudo sugere que os efeitos anti-inflamatórios e protetores de barreira observados em um contexto de mucosite intestinal estão associados à ação da CEC15.

Palavras-chave: Probiótico. Posbiótico. *Escherichia coli*. EcN. CEC15. Mucosite intestinal.

ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms that promote health benefits to the host. On the other hand, postbiotics are preparations of inactivated, lysed microorganisms, or their cellular structure maintained, containing or not their secreted metabolic products, and that promote benefits to the host when administered in appropriate quantities.

Among probiotics, strains of Gram-negative bacteria of the *Escherichia coli* species stand out, such as the *E. coli* Nissle 1917 (EcN) strains that make up the Mutaflor probiotic, *E. coli* A0 34/86 present in Colinfant newborn, and the strains *E. coli* G1/2, G3/10, G4/9, G5, G6/7, and G8 that compose the Symbioflor2 probiotic. Both are marketed as supplements for improving intestinal health. Studies with the *E. coli* CEC15 strain have demonstrated its beneficial effects in TNBS-induced colitis models. This strain was isolated from the feces of suckling rats and demonstrated the ability to colonize the gastrointestinal tract of germ-free rats, triggering an adaptive response in the colonic epithelium, promoting remodeling of the epithelial tissue, and causing improvement in aspects associated with the intestinal barrier.

Observing these results, the present work aims to evaluate the postbiotic effects in the form of heat-inactivated bacteria and cell-free supernatant, compared to the probiotic effect of EcN and CEC15 in attenuating 5-fluorouracil (5-FU)-induced intestinal mucositis in mice. Treatments with live and heat-inactivated CEC15 attenuated weight loss, preserved intestinal length, reduced histological damage, decreased loss of goblet cells, reduced neutrophil infiltration, and modulated the expression of inflammatory and barrier genes compared to 5-FU controls. EcN showed more limited effects. CEC15 increased the expression of mucin gene (MUC2) and tight junction protein TJP1.

In general, CEC15 demonstrated protective effects against 5-FU-induced mucositis when administered as live, heat-inactivated, or as a supernatant. This suggests that CEC15 provides benefits through secreted metabolites and does not require viability. This study suggests that the anti-inflammatory and barrier-protective effects observed in the context of intestinal mucositis are associated with the action of CEC15.

Keywords: Probiotic. Postbiotic. *Escherichia coli*. EcN. CEC15. Intestinal mucositis.

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob orientação do Professor Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo. Contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Este manuscrito inicia-se com uma breve introdução seguida da justificativa do trabalho, motivada pelo impacto significativo da mucosite intestinal na clínica médica e a escassez de tratamentos eficazes contra este efeito colateral à terapia do câncer e dos objetivos dos quais destaca-se avaliar os efeitos da linhagem *Escherichia coli* CEC15 (CEC15) inativada pelo calor e de seus metabólitos secretados em modelo murino de mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU), fazendo um comparativo com os efeitos obtidos com a linhagem de referência, *E. coli* Nissle 1917 (EcN) e seus derivados e com as formas probióticas de ambas as linhagens.

Para tanto é realizada inicialmente uma revisão bibliográfica acerca do uso de linhagens bacterianas probióticas e preparações posbióticas como alternativas terapêuticas para amenizar os danos à mucosa intestinal induzidos pelo quimioterápico 5-FU com enfoque em linhagens de *E. coli*. Também são discutidos os mecanismos de ação desses compostos no trato gastrointestinal (TGI), bem como sua relação com a microbiota. O capítulo I dessa dissertação apresenta um artigo original no qual são avaliados os resultados do teste das linhagens CEC15 e EcN vivas, inativadas por calor e seus metabólitos secretados em modelo murino de mucosite induzida por 5-FU. Por fim, seguem a discussão, considerações finais e perspectivas do trabalho de dissertação, conclusões atingidas, referências e anexos, nos quais encontram-se as produções científicas desenvolvidas durante o mestrado.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismos de ação de probióticos	19
Figura 2 – Composição de posbióticos.....	30
Figura 3 – Representação esquemática das cinco fases de desenvolvimento da mucosite intestinal.....	34
Capítulo 1 – “Postbiotic effect of <i>Escherichia coli</i> CEC15 and <i>E. coli</i> Nissle 1917 on a murine model of 5-FU-induced intestinal mucositis”	
Figura 1 – Experimental design.....	61
Figura 2 – Treatment and 5-FU-induced weight modulation.....	62
Figura 3 – Modulation of macro and microscopic aspects of 5-FU-induced intestinal mucositis.....	63
Figura 4 – Goblet cell counting.....	64
Figura 5 – Intestinal permeability.....	65
Figura 6 – Modulation of inflammation by regulation of MPO activity and pro-inflammatory gene expression by CEC15, EcN, and their derivatives.....	66
Figura 7 – Modulation of barrier gene expression by CEC15, EcN and their derivatives...	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequence of primers used in this study.....	49
Tabela 2 – Produção científica e participações em eventos.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®	Marca registrada
5-FU	5-fluorouracil
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
BAC	Bactéria
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
Cldn1	Claudina-1
cpm	Contagem por minuto
Ct-	Controle
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
g	Grama
Gapdh	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
i.p.	Injeção intraperitoneal
Il	Interleucina
kDa	Kilodalton
Kg	Kilograma
M	Molar
MBq	Megabecquerel
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Muc2	Mucina 2
Nfkb	Fator nuclear-kappa B
Ocln	Ocludina
PBS	Solução de tampão fosfato
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico

rpm	Rotação por minuto
RT	Transcriptase reversa
TGI	Trato gastrointestinal
Tjp1	Proteína de junção estreita-1
Tlr	Receptores Toll-like
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
U	Unidade
UV	Ultravioleta
UFC	Unidade Formadora de colônia
μL	Microlitro
ZO-1	Zonulina-1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Justificativa	16
1.2. Objetivo geral	17
1.3. Objetivos específicos	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. Probióticos	18
2.2. Linhagens de <i>E. coli</i> com efeito probiótico	20
2.2.1. <i>E. coli</i> Nissle 1917 (Mutaflor).....	20
2.2.2. <i>E. coli</i> G1/2, G3/10, G4/9, G5, G6/7 e G8 (Symbioflor2).....	23
2.2.3. <i>E. coli</i> A0 34/86 (Colinfant New Born)	24
2.2.4. Outras <i>E. coli</i> com propriedades probióticas	26
2.2.5 <i>E. coli</i> CEC15.....	26
2.3. Posbióticos	28
2.4. Mucosite Intestinal.....	32
2.5. Efeitos de probióticos, posbióticos e sobrenadante livre de células em modelo de mucosite intestinal	35
3. ARTIGO ORIGINAL.....	40
4. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS	68
REFERÊNCIAS	73
APÊNDICE A – Produção científica.....	83
ANEXO A – Ficha de aprovação no CEUA	85

1. INTRODUÇÃO

Diversos microrganismos são conhecidos por desempenharem funções benéficas ao hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas. Os chamados probióticos são, em sua maioria, bactérias lácticas, entretanto, algumas linhagens de bactérias Gram-negativas são conhecidas por promoverem a saúde humana e animal. A *Escherichia coli* Nissle 1917, uma linhagem bacteriana bacilar Gram-negativa, foi pioneira nos estudos sobre probióticos tendo a sua estrutura celular bem caracterizada e sendo um dos primeiros microrganismos cuja função probiótica foi conhecida (WASSENAAR, 2016). A partir de então, outras linhagens de *E. coli* vêm sendo estudadas e caracterizadas quanto aos seus possíveis efeitos benéficos ao hospedeiro, reforçando a eficácia dos probióticos na melhoria do trânsito intestinal, equilíbrio da microbiota e, até mesmo, no tratamento de doenças intestinais (ESCRIBANO-VAZQUEZ et al., 2019; MÖNDEL et al., 2009; WANG et al., 2022).

Um dos modelos de estudo utilizado para caracterizar a ação de probióticos sobre condições patológicas intestinais é o modelo de mucosite intestinal. A mucosite é definida por uma lesão inflamatória ulcerativa que acomete todo o trato gastrointestinal (TGI) levando assim ao desenvolvimento de sintomas como diarreia, dor abdominal, sangramento, fadiga, entre outros (KIM et al., 2018; SONIS, 2004; TOUCHEFEU et al., 2014). A principal causa desta inflamação é a ação de drogas antimetabólitas utilizadas no tratamento de câncer. Devido a sua estrutura química, geralmente, semelhante a estrutura de ácidos nucleicos, estas drogas alteram o metabolismo de DNA e RNA culminando na destruição das células ou inibição do seu crescimento (GUICHARD et al., 2017; SHIELDS, 2017). Todavia, esta terapia não é alvo específica e os antimetabólitos alteram também o metabolismo de células saudáveis. No epitélio intestinal esta ação causa um dano mais acentuado devido à alta taxa de proliferação celular neste tecido, o que promove a inflamação em toda a extensão do TGI (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; MIURA et al., 2010; SONIS, 2004).

Muitos microrganismos são testados em modelo de mucosite a fim de avaliar a sua função probiótica em um processo inflamatório agudo. Porém, apesar de serem geralmente reconhecidos como seguros, alguns probióticos podem apresentar efeitos adversos, especialmente em condições inflamatórias intestinais, visto que estes microrganismos podem, por exemplo, atravessar a barreira intestinal causando outras doenças infecciosas (VAISHNAVI, 2013). Para suplantarmos esta limitação no uso de probióticos, outras preparações com estes microrganismos vêm sendo estudadas. Os posbóticos são preparações de microrganismos inativados, sejam lisados ou mantida a sua estrutura celular contendo ou não

seus produtos metabólicos secretados e que promovem benefício ao hospedeiro quando administrado em quantidades adequadas (SALMINEN et al., 2021). Diversos trabalhos publicados utilizam termos como probióticos não vivos, paraprobióticos, probióticos-fantasmas (*ghost biotics*) ou probióticos inativados pelo calor para se referirem a microrganismos inanimados e/ou seus componentes que conferem benefícios à saúde. Entretanto, em 2021 a Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) propôs um consenso sobre a utilização do termo posbióticos para se referir a estas manipulações (VINDEROLA; SANDERS; SALMINEN, 2022). Os posbióticos apresentam a vantagem de serem preparações metabolicamente inativas, reduzindo o risco associado ao seu consumo quando comparado aos probióticos. Alguns trabalhos com preparados posbióticos de EcN demonstram seu potencial benéfico em modelo de mucosite murina (PRISCIANDARO et al., 2011, 2012; WANG et al., 2014, 2017a), entretanto os mesmos resultados não foram observados no modelo de mucosite utilizando a linhagem em sua forma probiótica (DA SILVA et al., 2023).

Há aproximadamente uma década uma nova linhagem de *E. coli* (*E. coli* CEC15) foi isolada de amostras fecais de ratos lactentes e demonstrou um potencial probiótico ao promover o remodelamento da arquitetura epitelial intestinal quando colonizaram ratos axênicos, levando a homeostasia do epitélio e, também, promovendo melhoras significativas quando administrada em modelo murino de colite. (ESCRIBANO-VAZQUEZ et al., 2019; TOMAS et al., 2015). CEC15, cujo potencial probiótico tem sido explorado pelo nosso grupo em diferentes modelos animais em comparação com a linhagem de referência EcN, foi isolada pelo Instituto Nacional de Pesquisa pela Agricultura, Alimentação e Meio Ambiente (INRAe), e vem demonstrando ser uma promissora candidata a um produto probiótico. Neste trabalho é avaliado o potencial benéfico de preparações inativadas e de metabólitos secretados por esta linhagem em um modelo murino de inflamação intestinal aguda.

1.1. Justificativa

Muitas evidências comprovam os benefícios que o uso de probióticos promovem a saúde humana e animal. Estudos têm demonstrado que certas linhagens de bactérias probióticas podem ajudar a reduzir a inflamação intestinal, proteger a integridade da barreira epitelial e evitar a colonização da mucosa por microrganismos patogênicos, melhorando, portanto, a saúde intestinal do hospedeiro (AZAD et al., 2018; CRISTOFORI et al., 2021; PARASSOL et al., 2005). Além disso, muitos produtos do metabolismo microbiano são conhecidos por melhorarem a saúde do TGI aumentando a motilidade do intestino, regulando a microbiota e mantendo a integridade da barreira intestinal, entre outros (LIU et al., 2022). Há evidências de que os posbióticos, podem ter um efeito benéfico semelhante aos probióticos na promoção da saúde do hospedeiro (PIQUÉ; BERLANGA; MIÑANA-GALBIS, 2019). Deste modo, testar a linhagem *E. coli* CEC15 em um modelo de inflamação intestinal aguda é importante para a compreensão do efeito benéfico da linhagem e para o desenvolvimento de novas terapias probióticas e posbióticas que melhorem a saúde intestinal do hospedeiro.

1.2. Objetivo geral

Caracterizar o efeito das preparações posbióticas de *E. coli* CEC15 e *E. coli* Nissle 1917 inativadas pelo calor e de seu sobrenadante livre de células, em um modelo animal de mucosite intestinal induzida pela administração do quimioterápico 5-Fluorouracil, fazendo um comparativo com o efeito probiótico dessas mesmas linhagens.

1.3. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da linhagem CEC15 inativada por calor e de seus metabólitos secretados na barreira intestinal e em marcadores inflamatórios em comparação com as mesmas preparações da linhagem padrão Nissle 1917;
- Investigar os parâmetros relacionados com a integridade da mucosa intestinal, considerando a permeabilidade intestinal e aspectos histológicos e morfométricos após administração da linhagem CEC15 inativada por calor e de seus metabólitos secretados e da linhagem EcN inativada por calor e de seus metabólitos secretados nos camundongos inflamados;
- Avaliar fatores envolvidos na resposta inflamatória como após administração das preparações posbióticas das linhagens CEC15 e EcN nos camundongos inflamados;
- Identificar similaridades e diferenças no efeito produzido pelas preparações posbióticas da linhagem CEC15 com a linhagem de referência EcN nas mesmas condições.
- Comparar os efeitos produzidos pelas preparações posbióticas de CEC15 e EcN com os efeitos obtidos na administração das mesmas linhagens vivas (Probióticos vs. Posbióticos)

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O mercado de probióticos têm apresentado crescimento acentuado ao longo dos últimos anos e a expectativa é de que este mercado continue em expansão (LIM et al., 2015). Diversas linhagens têm seu uso probiótico reconhecido devido aos seus efeitos benéficos comprovados e ao status GRAS (do inglês: Generally Recognized As Safe; geralmente reconhecidas como seguras) reconhecido. Entretanto, o uso de bactérias, mesmo linhagens consideradas seguras, pode trazer risco a certos grupos de indivíduos que as consome, em especial crianças e pacientes imunocomprometidos ou imunossuprimidos (DORON; SNYDMAN, 2015). Os posbióticos têm se apresentado como uma alternativa a esse problema ao exercerem efeitos positivos ao hospedeiro tal como os exercidos pelas linhagens vivas com a vantagem de apresentarem um menor risco associado ao seu consumo, visto que estes tratam-se de preparações de microrganismos inativados, sejam lisados ou seja mantida a sua estrutura celular (MA; TU; CHEN, 2023). Deste modo, torna-se cada vez mais necessário compreender como os posbióticos podem beneficiar um hospedeiro consumidor e explorar esse potencial. O objetivo dessa revisão é apresentar os conceitos de probióticos e posbióticos, demonstrar os principais resultados de estudos em animais e testes clínicos utilizando linhagens de *E. coli* probióticas, expor os principais resultados obtidos com posbióticos em modelos de inflamação intestinal, retratar o modelo de mucosite intestinal induzida por quimioterápicos e, finalmente, apresentar a linhagem *E. coli* CEC15 que é o foco deste estudo.

2.1. Probióticos

Os probióticos, conforme definido por Hill e colaboradores (2014), são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, promovem benefícios para a saúde do hospedeiro (HILL et al., 2014). Estudos têm demonstrado benefícios à saúde humana atribuídos ao consumo de probióticos, principalmente em doenças do TGI (ACURCIO et al., 2017), bem como em outras doenças relacionadas, como infecções entéricas (ACURCIO et al., 2017; FEDORAK et al., 2015), câncer (ZAHARUDDIN et al., 2019), obesidade e diabetes tipo 2 (HSIEH et al., 2018; SÁEZ-LARA et al., 2016; WANG et al., 2017b), depressão (WALLACE et al., 2020), dermatite atópica (RATHER et al., 2016), entre outras.

Os microrganismos probióticos demonstraram uma variedade de mecanismos de ação benéficos ao hospedeiro, incluindo: i) regulação da microbiota intestinal (SHI et al., 2017); ii) proteção da barreira epitelial e manutenção da integridade das junções estreitas (BLACKWOOD et al., 2017); iii) indução da produção de mucina pelas células caliciformes (ALIAKBARPOUR et al., 2012) e de IgA secretada (sIgA), (RAMANAN; CADWELL, 2016);

iv) aumento da aderência à mucosa intestinal, resultando na exclusão competitiva de microrganismos patogênicos como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (COLLADO et al., 2009; HALDER et al., 2017; MONTEAGUDO-MERA et al., 2019; PLAZA-DÍAZ et al., 2017); v) produção de substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, ácidos acético e láctico, que exercem efeitos inibitórios contra bactérias Gram-negativas (ALAKOMI et al., 2000; CASTILHO et al., 2019; DE KEERSMAECKER et al., 2006); vi) produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) (PARADA VENEGAS et al., 2019); vii) inibição da via de sinalização do NFκB responsável pela produção de mediadores pró-inflamatórios (GAO et al., 2017; KACI et al., 2011); viii) interação com o eixo intestino-cérebro por meio da produção de metabólitos, como o ácido γ -aminobutírico (GABA) (DURANTI et al., 2020); ix) modulação das respostas imunológicas inatas e/ou adaptativas do hospedeiro por meio da interação com células epiteliais, células dendríticas, monócitos, macrófagos e linfócitos (AZAD et al., 2018; BATISTA et al., 2020) (Figura 1).

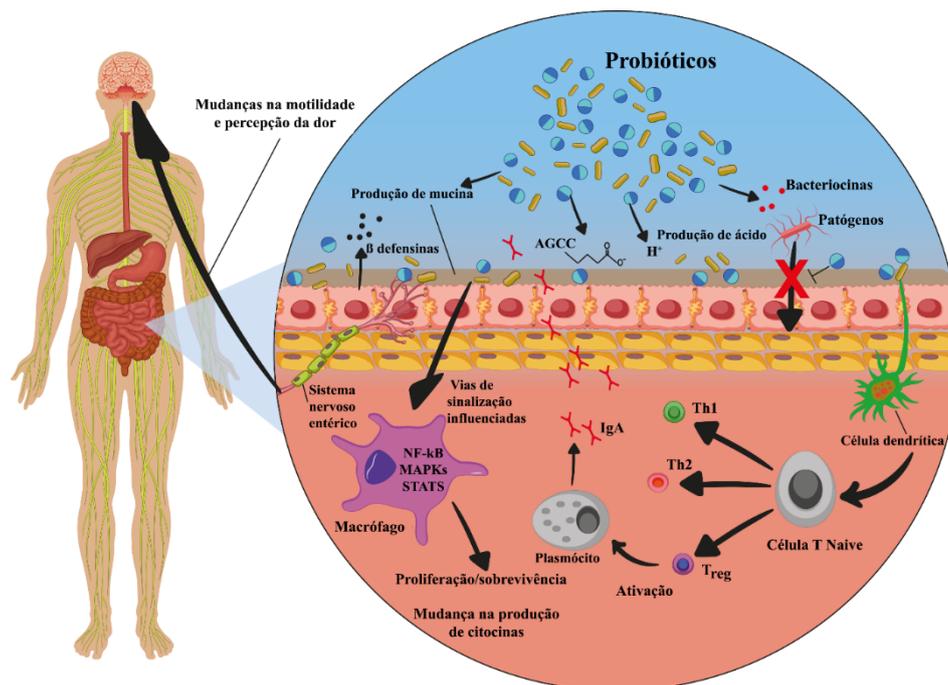


Figura 1. Principais mecanismos de ação propostos para bactérias probióticas no TGI humano. Os principais mecanismos de ação dos probióticos incluem aumento da barreira epitelial por meio da manutenção das proteínas de junções oclusivas e produção de mucinas pelas células caliciformes, adesão à mucosa intestinal e inibição concomitante da adesão de patógenos, exclusão competitiva de microrganismos patogênicos através da produção de substâncias antimicrobianas e modulação do sistema imunológico. Adaptado de (BATISTA et al., 2020).

Dentre os probióticos, as bactérias lácticas (BLs), como membros da família *Lactobacillaceae* e dos gêneros *Lactococcus* e *Streptococcus*, são mais bem estudadas e

caracterizadas. No entanto, outros grupos de microrganismos também apresentam propriedades probióticas importantes, como espécies dos gêneros *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Enterococcus* e *Bacillus*, além de leveduras do gênero *Saccharomyces* e algumas linhagens de bactérias Gram-negativas (BASTOS et al., 2016; CHANG et al., 2019; FOLIGNÉ; DANIEL; POT, 2013). Algumas *E. coli* têm se destacado dentre os probióticos Gram-negativos devido a sua presença natural e adaptabilidade ao TGI, além de sua capacidade de colonização do intestino (SCHOLTENS et al., 2012). Entre elas, a linhagem *E. coli* Nissle 1917 se sobressai como a principal representante dentre os probióticos comerciais e que teve seus efeitos demonstrados em diversos modelos de inflamação, alergias, infecções e doenças metabólicas (ADAM et al., 2010; CHIANG et al., 2021; SUN et al., 2022; ZHAO et al., 2022).

2.2. Linhagens de *E. coli* com efeito probiótico

E. coli é um bacilo Gram-negativo, anaeróbico facultativo, comumente encontrado no trato digestivo de animais endotérmicos. A maioria das linhagens de *E. coli* podem ser classificadas como comensais, colonizando o intestino de animais sem lhes causar prejuízos, ou patogênicas, associadas a doenças diarreicas (MUELLER; TAINTER, 2023). Entretanto, algumas linhagens de *E. coli* podem desempenhar um papel benéfico para o hospedeiro, sendo assim consideradas probióticas. Alguns produtos probióticos, cuja composição é exclusivamente à base de *E. coli*, estão disponíveis comercialmente: Mutaflor[®], Symbioflor2[®] e Colinfant[®] New Born. Esses produtos foram usados em várias investigações científicas para desvendar seus efeitos positivos na saúde humana. Mutaflor, produzido por Ardeypharm GmbH (Herdecke, Alemanha, uma empresa farmacêutica fundada em 1970), contém células vivas de uma única linhagem, a *E. coli* Nissle 1917. Já o Symbioflor2 (DSM 17252), produzido por SymbioPharm GmbH (Herborn, Alemanha, fundada em 1954), contém uma suspensão de seis genótipos de *E. coli* (*E. coli* G1/2, G3/10, G4/9, G5, G6/7 e G8). Por fim, Colinfant New Born é comercializado pela Dyntec (Terezín, República Tcheca) e contém uma única linhagem de *E. coli* (*E. coli* A 034/86) e é especificamente comercializado para uso em recém-nascidos e lactentes (WASSENAAR, 2016).

2.2.1. *E. coli* Nissle 1917 (Mutaflor)

Uma das bactérias probióticas Gram-negativas mais estudadas é *E. coli* Nissle 1917 (EcN). Esta linhagem de *E. coli* foi uma das primeiras linhagens bacterianas usadas como probiótico e tem sido amplamente utilizada como um produto nutracêutico para tratar várias condições gastrointestinais (SONNENBORN, 2016). O médico alemão Alfred Nissle isolou a

linhagem no ano de 1915, a partir de fezes de um soldado durante a Primeira Guerra Mundial (NISSLE, 1916). Nissle descreveu que o soldado estava localizado em um hospital de campanha próximo a Freiburg e havia participado da campanha militar nos Bálcãs anteriormente. Ele foi designado para a região de Dobrudja, que naquela época estava altamente contaminada por *Shigella*. Em contraste com os demais soldados, ele não apresentou sintomas de diarreia ou qualquer outra doença intestinal (NISSLE, 1925). Posteriormente, em 1917 Nissle obteve uma patente para a marca registrada Mutaflor junto ao então existente Escritório de Patentes Imperial em Berlim (SONNENBORN, 2016).

A EcN é amplamente empregada para prevenir e tratar vários distúrbios intestinais, como constipação e diarreias, inclusive sendo recomendada, no seu país de origem, no tratamento da colite ulcerativa na fase remissiva da doença. Sua eficácia em aliviar os sintomas dessa condição é comparável à do medicamento mesalazine, principal agente terapêutico utilizado no tratamento da colite (KRUIS, 2004). De acordo com os relatos de Souza e colaboradores, a administração prévia de EcN apresentou um efeito protetor, aliviando os sintomas clínicos e a inflamação intestinal durante a fase aguda da inflamação induzida pelo dextran sulfato de sódio (DDS) em camundongos (SOUZA et al., 2020).

No contexto da regulação da microbiota intestinal, EcN exerce efeitos positivos ao competir com patógenos por nutrientes e sítios de adesão, além de produzir substâncias antimicrobianas que inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis. Essas ações contribuem para o equilíbrio da microbiota e para a manutenção de uma comunidade microbiana saudável no intestino (HENKER et al., 2007). Uma das características distintivas da EcN é apresentar o antígeno O6 do LPS encurtado, que é diferente de outras linhagens de *E. coli*. Essa diferença estrutural no LPS acentua a sua capacidade de adesão às células do hospedeiro, causando efeitos imunomoduladores (KLETA et al., 2014; YU et al., 2020). EcN apresenta três tipos de fimbrias - F1A, F1C e fimbrias curli - que desempenham um papel importante na formação de biofilmes, estruturas complexas formadas por comunidades de microrganismos aderidos a superfícies do hospedeiro, e na colonização do trato gastrointestinal conferindo-lhe vantagem competitiva por espaço e nutrientes sobre outros microrganismos no TGI (LASARO et al., 2009). Além do LPS, flagelos H1 também estão associados à capacidade adesiva à mucosa gastrointestinal e promoção de alta mobilidade de EcN. Esses flagelos têm a capacidade de induzir a produção do peptídeo antimicrobiano defensina humana 2 (hBD-2), que exerce um efeito antibacteriano e contribui para a colonização eficiente da EcN no trato gastrointestinal (SCHLEE et al., 2007). A presença da cápsula K5 na EcN está associada a uma resposta imunomoduladora, ativando a via de receptor Toll-like 5 (TLR-5) e aumentando a

produção de quimiocinas como IL8, RANTES e MCP-1, que são importantes na atração de células do sistema imune (BEHNSEN et al., 2013; HAFEZ et al., 2009).

EcN produz sideróforos, moléculas que se ligam e transportam ferro, nutriente importante para o crescimento e a reprodução deste organismo tornando-o superior na competição por ferro contra outras bactérias. Isso é importante, pois a disponibilidade de ferro é um fator limitante para o crescimento de muitas bactérias, e a capacidade da EcN de adquirir ferro confere-lhe uma vantagem competitiva no ambiente intestinal (DERIU et al., 2013). Outro mecanismo pelo qual EcN exerce efeitos benéficos é a produção de fatores de necrose citotóxicos, também conhecidos como microcinas, que são capazes de inibir o crescimento de patógenos Gram-negativos, em especial, linhagens patogênicas de *E. coli*. O cluster de genes de microcinas da EcN reside na ilha genômica I e codifica microcina M (mcmA), microcina H47 (mchB) e seus genes de imunidade cognatos (mcmI e mchI, respectivamente). Estas microcinas são expressas em ambiente com limitação de ferro e contribuem para a manutenção de um ambiente intestinal saudável (SASSONE-CORSI et al., 2016). Além disso, EcN demonstrou ser capaz de modular a função de barreira epitelial do intestino em modelo de sepse murina com camundongos C57BL/6J, aumentando a expressão de proteínas de junção oclusivas-1 e claudina-1, melhorando a integridade da barreira intestinal. Essa regulação da função de barreira ajuda a prevenir a translocação de microrganismos patogênicos ou produtos bacterianos para os tecidos adjacentes, mantendo a homeostase intestinal (GUO et al., 2019). EcN tem sido administrada a pacientes por mais de um século e há escassos relatos de eventos adversos na literatura (SONNENBORN, 2016) sendo considerada segura e eficaz, tendo sido aprovada pelo FDA como um medicamento para o tratamento da diarreia aguda em crianças. No entanto, EcN possui uma ilha genômica denominada *pks*, que codifica proteínas responsáveis pela síntese da colibactina, uma genotoxina com capacidade de alquilar o DNA e induzir quebras de dupla fita (NOUGAYRÈDE et al., 2021). Essa descoberta é motivo de preocupação, pois estudos em diversos modelos de camundongos têm observado a ação de outras linhagens de *E. coli* produtoras de colibactina no desenvolvimento de câncer colorretal (CCR) (ARTHUR et al., 2012; COUGNOUX et al., 2014; DALMASSO et al., 2014; IFTEKHAR et al., 2021). Além disso, a exposição de organoides humanos a linhagens de *E. coli pks+* tem revelado assinaturas mutacionais dependentes de colibactina também encontradas em CRCs humanos (PLEGUEZUELOS-MANZANO et al., 2020). Até o momento, não se sabe se EcN possui propriedades pró-tumorigênicas. Inicialmente, acreditava-se que EcN não produzia colibactina (DUBBERT et al., 2020), contudo, essa genotoxina foi detectada nos sobrenadantes de células epiteliais humanas HeLa expostas à EcN em um modelo *in vitro* de

infecção. As células expostas à linhagem durante 4 horas apresentaram evidências de danos no DNA, como ligações cruzadas e mutações dependentes de colibactina (NOUGAYRÈDE et al., 2021). De maneira similar, células epiteliais intestinais de camundongos axênicos e camundongos livres de patógenos específicos (SPF), com oito dias de idade, que receberam EcN por via oral, também mostraram evidências de danos no DNA dependentes dos genes *clbA* e *clbP*, presentes na ilha *pks*. (MARTIN et al., 2013; MASSIP et al., 2019; NOUGAYRÈDE et al., 2021). É importante ressaltar que foi relatado que o contato direto entre a colibactina e as células hospedeiras é necessário para a formação das quebras do DNA, e até mesmo uma fina camada de muco pode inibir esse processo (REUTER et al., 2018). Até onde se sabe, EcN nunca demonstrou potencial tumorigênico em modelos murinos e não existem evidências correlacionais ou de qualquer outra natureza que associem o EcN a tumores colorretais em humanos.

2.2.2. *E. coli* G1/2, G3/10, G4/9, G5, G6/7 e G8 (Symbioflor2)

O Symbioflor2 é um probiótico que usa bactérias intestinais para tratar a síndrome do intestino irritável, tendo sua eficácia comprovada, apresenta poucos efeitos colaterais e seu uso é considerado seguro. A preparação atua estabilizando a mucosa do TGI e promovendo um equilíbrio saudável de bactérias no intestino. O Symbioflor2 contém 6 linhagens de bactérias da espécie *E. coli* que influenciam na produção de componentes específicos do sistema imunológico associado ao intestino. O produto tem sido eficaz em estudos clínicos para tratar a síndrome do intestino irritável ao reduzir seus sintomas como dor abdominal, inchaço, flatulência e diarreia. (SYMBIOPHARM, 2023).

Alguns trabalhos demonstraram o efeito destas linhagens de *E. coli* em ensaios clínicos, modelos animais e modelos *in vitro*. Möndel e colaboradores avaliaram a expressão de β -defensinas em amostras fecais de pacientes tratados com symbioflor-2. β -defensinas humanas estão associadas à função de barreira intestinal, ajudando a proteger contra a invasão de microrganismos patogênicos e desempenhando um papel na regulação da resposta imune (MÖNDEL et al., 2009). O artigo relata que a administração oral de Symbioflor-2 induz a secreção de peptídeo β -defensina humana, detectada nas fezes de indivíduos saudáveis. O estudo constatou que, após três semanas de tratamento probiótico, o aumento geral do nível fecal do peptídeo antimicrobiano β -defensina humana 2 (hBD-2) foi 3,7 vezes maior em comparação com o período antes do tratamento. O peptídeo presente em amostras fecais ainda estava elevado 9 semanas após o tratamento. O estudo também identificou a linhagem G2 que faz parte da mistura comercial como um agente estimulante de produção de hBD-2 *in vitro*. A

administração de Symbioflor2 foi bem tolerada por todos os participantes do estudo, e não foram observados eventos adversos (MÖNDEL et al., 2009).

Um ensaio clínico de tratamento randomizado e controlado da síndrome do intestino irritável (SII) com a preparação probiótica Symbioflor2 também verificou efeito positivo nos pacientes. O estudo envolveu 298 pacientes com sintomas abdominais brandos diagnosticados como SII, de acordo com a escala para a síndrome do intestino irritável proposta por Kruis e colaboradores em 1984 (KRUIS et al., 1984). Os pacientes foram tratados por 8 semanas com o probiótico ou um placebo e seus sintomas foram avaliados nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 de tratamento e categorizados em duas escalas, uma pontuação de dor abdominal (APS) e uma pontuação geral de sintomas (GSS). A taxa de resposta na GSS ao probiótico foi de 18,2% em comparação com 4,67% para o placebo, e a melhora na APS foi de 18,9% em comparação com 6,67% para o placebo. A resposta foi observada a partir da 3ª avaliação médica (21º dia). O estudo concluiu que o tratamento da SII com o probiótico Symbioflor2 é eficaz e superior ao placebo na redução dos sintomas típicos dos pacientes com SII, conforme observado por médicos clínicos gerais e gastroenterologistas (ENCK et al., 2009).

O probiótico também se mostrou potencialmente eficiente e seguro como sistema de entrega de moléculas terapêuticas no tratamento de tumores sólidos. Symbioflor2 possui uma capacidade altamente específica de direcionamento a tumores nos modelos murinos de carcinoma colorretal usando a linhagem celular CT26 e adenocarcinoma renal usando a linhagem RenCa. Para ambos os modelos as linhagens tumorais foram injetadas por via subcutânea em camundongos BALB/c e o volume dos tumores foram mensurados antes da colonização pelas linhagens probióticas. O probiótico foi capaz de induzir a eliminação do tumor CT26 como resultado de um efeito adjuvante nas células T CD8+ específicas do tumor, no entanto, a eficácia terapêutica contra os tumores RenCa foi reduzida. Os autores destacam o papel das células efectoras inatas na restrição dos efeitos antitumorais do Symbioflor-2 e argumentam a favor de uma estratégia de aplicação de linhagens seguras e uso mais sustentável de bactérias como sistema de entrega para moléculas terapêuticas (KOCIJANCIC et al., 2016).

2.2.3. *E. coli* A0 34/86 (Colinfant New Born)

Colinfant New Born é um probiótico indicado para recém-nascidos, lactentes até 1 ano de idade e bebês prematuros. Ajuda a prevenir infecções hospitalares, doenças gastrointestinais e distúrbios da microbiota intestinal. Também ajuda a regular a microbiota intestinal em pacientes com doenças intestinais e em portadores de linhagens enteropatogênicas. A linhagem de *E. coli* presente, pertencente à microbiota intestinal normal, coloniza de forma eficaz o trato

intestinal, estimulando a produção de anticorpos locais e sistêmicos, melhorando a composição da microbiota, expulsando linhagens patogênicas e regulando a microbiota intestinal em disbiose (DYNTEC, 2023).

Os trabalhos com a linhagem A0 34/86, presente no Colinfant investigam o efeito desta linhagem em neonatos. Um trabalho de 2007 demonstrou que a administração oral de Colinfant em filhos de mães alérgicas durante o primeiro ano de vida resultou na menor incidência de patógenos bacterianos nas fezes e sintomas alérgicos significativamente menores quando comparado a filhos de mães alérgicas não colonizados pelo probiótico. A incidência de alergias também foi menor em crianças submetidas ao tratamento em comparação com crianças não tratadas (KOCOURKOVÁ et al., 2007). Posteriormente os efeitos da linhagem sobre processos alérgicos foram melhor estudados. Durante dez anos foi avaliado o efeito da colonização por *E. coli* A0 34/86 em recém-nascidos. Após o parto, o valor de IgE sérico foi mensurado a partir de amostras de cordão umbilical dos recém-nascidos. Crianças que apresentaram alteração nos valores de concentração de IgE foram submetidas à suplementação com Colinfant de acordo com as especificações do fabricante e, posteriormente, a concentração de IgE foi novamente medida após 15 meses e três anos do início do tratamento. O estudo observou uma diminuição na incidência de alergias em crianças que receberam A0 34/86 em comparação com crianças não suplementadas. A suplementação pós-natal precoce com A0 34/86 pareceu limitar a alergia no grupo de alto risco (filhos de mães alérgicas) em comparação com o grupo de baixo risco (filhos de mães saudáveis) (LIŠKA et al., 2019). Este efeito pode estar associado à capacidade de colonização do TGI pela linhagem quando administrada nos primeiros meses de vida. Após administradas oito doses do probiótico durante os segundo e terceiro meses de vida de um bebê, a linhagem A0 34/86 foi capaz de colonizar com sucesso o trato intestinal e se tornar residente durante o primeiro ano de vida da criança. Para a detecção da linhagem foram avaliadas a presença de pelo menos sete genes determinantes da espécie em 177 amostras fezes da criança tratada, coletadas ao longo do seu primeiro ano de vida. Entre eles estão os genes de virulência *fimA*, *α-hly*, *cnfI*, *sfa*, *pap*, *fyuA* e *fepC* e os genes codificantes de microcinas H47, M e V. Os genes comuns à linhagem probiótica *E. coli* A0 34/86 foram detectados nas fezes do bebê no primeiro dia após a aplicação de Colinfant e persistiram durante o período de um ano avaliado. A aplicação de *E. coli* A0 34/86 resultou em uma diminuição significativa de *Klebsiella oxytoca*, prevalente no período anterior à administração do probiótico, e a população de *Escherichia* se tornou o gênero predominante de Enterobacteriaceae (MICENKOVÁ et al., 2020).

2.2.4. Outras *E. coli* com propriedades probióticas

Além destas, algumas linhagens de *E. coli* probióticas não testadas em humanos demonstram seu potencial benéfico em outras espécies animais. Um estudo constatou que a *E. coli* Y18J, isolada das fezes de leitões saudáveis, apresentou forte atividade antimicrobiana contra o agente patogênico causador da diarreia suína *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) W25K em ensaios *in vitro*. O mecanismo antagônico da *E. coli* Y18J contra a ETEC pode estar relacionado com a produção de dois metabólitos antibacterianos secundários, colicina B e colicina M. O estudo verificou que a linhagem *E. coli* Y18J knockout para as colicinas citadas perderam sua ação antagônica contra a ETEC W25K (WANG et al., 2022). Os autores também avaliaram a segurança da linhagem *E. coli* Y18J *in vivo* em modelo murino. Os animais foram gavados com as linhagens *E. coli* Y18J e *E. coli* W25K e a taxa de diarreia nos camundongos foi avaliada seis dias após o procedimento. Nos animais tratados com W25K foi verificada uma taxa de ocorrência de diarreia de 44,67%, porém, não houve diarreia nos animais gavados com *E. coli* Y18J, o que sugere a linhagem é não patogênica (WANG et al., 2022).

Outra linhagem estudada, a *E. coli* H22 demonstrou os seus efeitos inibidores contra bactérias entéricas *in vitro* e *in vivo*. Foi verificado que a linhagem produz vários compostos antimicrobianos, incluindo partículas de bacteriófagos, aerobactina, colicinas E1 e Ib e microcina C7. Nos testes de inibição *in vitro* por meio de sobreposição de ágar, *E. coli* H22 inibiu o crescimento de linhagens bacterianas pertencentes a sete gêneros da família *Enterobacteriaceae*, incluindo *Shigella flexneri* 4 cuja inibição foi demonstrada ser mediada pela microcina C7. Ensaio *ex vivo* também sugerem o papel da microcina C7 na inibição em condições *in vivo*. Camundongos Swiss/NIH com três semanas de idade e estéreis foram submetidos à colonização pela linhagem *E. coli* H22 e *S. flexneri* 4 individualmente e simultaneamente. Amostras frescas de fezes foram coletadas, diluídas e semeadas em ágar MacConkey e foi verificado que a presença da *E. coli* H22 reduziu a população fecal de *S. flexneri* 4 a níveis indetectáveis (CURSINO et al., 2006).

2.2.5 *E. coli* CEC15

No ano de 2013 a linhagem *E. coli* CEC15 (CEC15) foi isolada no Instituto Nacional de Pesquisa pela Agricultura, Alimentação e Meio Ambiente (INRAe), a partir de fezes de ratos lactentes durante um estudo que buscava detectar microrganismos com potencial probiótico. Após a identificação da espécie por meio de sequenciamento da região genômica 16s, a linhagem foi inoculada em ratos gnotobióticos e seus efeitos sobre o epitélio colônico foram avaliados. Os ratos receberam doses da bactéria única ou em consórcio com outra linhagem de

Enterococcus faecalis CEF15 e, posteriormente, eutanasiados em períodos de 3, 7 ou 21 dias após a administração. Os cólons dos animais foram coletados e utilizados para o isolamento de células, procedimentos histológicos e medição de permeabilidade intestinal utilizando uma câmara de Ussing. Os resultados mostram que a colonização precoce com *E. coli* CEC15 desencadeou uma resposta adaptativa no epitélio colônico dos ratos, levando a uma remodelação do tecido epitelial. A expressão de marcadores de células proliferativas foi maior em ratos colonizados exclusivamente com *E. coli* CEC15 em comparação com ratos gnotobióticos em todos os momentos avaliados. Foi verificado também o espessamento da camada de muco. O conteúdo de muco das células caliciformes diminuiu logo após a administração de *E. coli* CEC15, enquanto a camada de muco duplicou em espessura. *E. coli* CEC15 foi encontrado residindo nesta camada de muco. Por fim, a presença da linhagem também afetou o transporte de íons e água. Marcadores de células diferenciadas do cólon envolvidas no transporte de íons e água, e respostas secretórias ao carbacol foram modulados após a inoculação de *E. coli* CEC15, sugerindo que a dinâmica de transporte de íons também foi afetada. A colonização com *E. coli* CEC15 teve um efeito positivo no epitélio colônico, levando a uma mudança na homeostase intestinal em direção a um estado de equilíbrio (TOMAS et al., 2015).

A partir de então, novos estudos buscam caracterizar esta linhagem de *E. coli* avaliando o seu potencial benéfico em modelos de inflamação intestinal. Um trabalho utilizando camundongos axênicos avaliou os efeitos da colonização com *E. coli* CEC15 no trato gastrointestinal em comparação com a linhagem comercial de EcN. Ambas as linhagens foram inoculadas separadamente e concomitantemente em camundongos C57BL/6 axênicos selvagens e nocaute para Il10. Os animais foram eutanasiados 21 dias após a administração das bactérias e segmentos do íleo e cólon foram coletados para análises. Os resultados indicaram que a colonização com *E. coli* CEC15 aumentou a expressão de genes relacionados à imunidade e defesa contra patógenos, além de aumentar a produção de mucina, proteína que reveste o epitélio intestinal e ajuda a prevenir a entrada de patógenos. (ESCRIBANO-VAZQUEZ et al., 2019). O estudo comparou os perfis de expressão gênica de camundongos gnotobióticos que foram colonizados somente com *E. coli* CEC15 e animais controle não colonizados. Os resultados mostraram que os perfis de expressão gênica dos camundongos colonizados com *E. coli* CEC15 eram diferentes dos camundongos controle, indicando que a presença dessa bactéria pode afetar os mecanismos de defesa intestinal (ESCRIBANO-VAZQUEZ et al., 2019). O estudo também investigou o efeito das linhagens em um modelo murino de colite crônica induzida por ácido dinitrobenzeno sulfônico (DNBS) em camundongos nocaute para Il10.

Embora *E. coli* CEC15 não tenha conseguido reverter a perda de peso associada ao DNBS, ela atenuou vários tipos de danos induzidos pelo DNBS e restaurou o perfil de expressão gênica para o do grupo controle, tanto no íleo quanto no cólon. O efeito benéfico dessa linhagem pareceu ser mais forte do que o de EcN no cólon, de acordo com o perfil de expressão gênica (ESCRIBANO-VAZQUEZ et al., 2019).

Com o objetivo de investigar ainda mais o potencial dessa linhagem como probiótico, nosso grupo realizou a análise probiogenômica da CEC15 (DA SILVA et al., 2023). O genoma foi sequenciado, revelando um cromossomo de 4,7 Mb e um plasmídeo de 200 Kb. A análise de elementos genômicos móveis mostrou um número reduzido de ilhas genômicas, ausência de genes relacionados a patogenicidade significativa, poucos genes de resistência a antibióticos, a falta de genes conduzindo a um fenótipo de resistência próximo a elementos móveis, e a ausência de profagos viáveis. De modo interessante, diferente da linhagem de referência EcN, CEC15 não apresenta ilha genômica *pks* com genes associados à produção de colibactina. A ausência desses genes é uma característica vantajosa exibida por este promissor probiótico. Avaliação genômica e *in vitro* demonstraram que o CEC15 não possui atividade hemolítica e é altamente resistente à passagem pelo trato gastrointestinal. Também foi demonstrado que a linhagem apresenta altas taxas de aderência às células intestinais, com estudos proteômicos sugerindo que isso pode estar relacionado a um maior número de proteínas de fímbria (DA SILVA et al., 2023).

Apesar das diversas evidências da segurança no uso de probióticos, alguns efeitos colaterais podem estar associados a esta suplementação. Estes produtos podem desencadear reações alérgicas e também podem causar desconforto estomacal leve, diarreia, flatulência e inchaço nos primeiros dias após o início do uso. Há certas condições que requerem maior cautela durante a suplementação com probióticos devido a um risco de infecção em pessoas com quadros de imunossupressão, (como aquelas em tratamento de quimioterapia, por exemplo), doenças intestinais graves (como condições inflamatórias agudas), pós-operatórios e até mesmo recém-nascidos (DORON; SNYDMAN, 2015; KOTHARI; PATEL; KIM, 2019). Para tentar suplantar os possíveis efeitos adversos dos probióticos, uma alternativa eficaz seria o uso de posbióticos.

2.3. Posbióticos

Os posbióticos são preparações de microrganismos inativados, seja mantida a sua estrutura celular ou realizado lisados celulares contendo ou não seus produtos metabólicos

secretados e que promovem benefício ao hospedeiro quando administrado em quantidades adequadas (SALMINEN et al., 2021). Ao longo dos anos, diversos termos têm sido utilizados na literatura científica para descrever estas estruturas inativadas tais como probióticos inativados, probióticos inativados pelo calor, probióticos tindalizados, paraprobióticos, probióticos-fantasmas (*ghost biotics*) entre outros. Essa falta de terminologia padronizada torna-se um desafio para a pesquisa, revisões sistemáticas e estruturas regulatórias. Para lidar com isso, a Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (ISAPP), definiu o termo posbiótico como preparações de microrganismos inanimados e/ou seus componentes que proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro. O termo posbiótico foi escolhido porque implica um microrganismo que perdeu sua capacidade metabólica e reprodutiva. Essa definição exclui a necessidade de um posbiótico ser derivado de um probiótico englobando tanto microrganismos não vivos inteiros quanto fragmentos celulares e lisados de qualquer microrganismo (VINDEROLA et al., 2023). Todavia, antes de definição do termo pela ISAPP, a palavra posbiótico vinha sendo utilizada para se referir a fatores derivados de microrganismos como metabólitos, AGCCs, frações celulares microbianas, proteínas funcionais, polissacarídeos extracelulares, lisados celulares, ácido teicóico, muropeptídeos derivados de peptidoglicano e estruturas tipo pili (WEGH et al., 2019). Apesar de ainda serem encontrados outros termos associados à definição de posbióticos na literatura científica recente, a definição atual não considera produtos secretados purificados ou filtrados sem fração celulares como posbióticos. Desta maneira, tais produtos são tratados aqui como sobrenadante livre de células.

Os processos de inativação de microrganismos para obtenção dos posbióticos são diversos e incluem exposição ao calor, à radiação, a solventes, a alta pressão, sonicação, entre outros. De forma geral, a perda de viabilidade dos microrganismos vivos decorre de alterações na estrutura celular microbiana como a quebra de DNA ou danos à membrana celular e/ou alterações em funções fisiológicas por meio de inativação de enzimas chave ou desativação da seletividade das membranas (DE ALMADA et al., 2016).

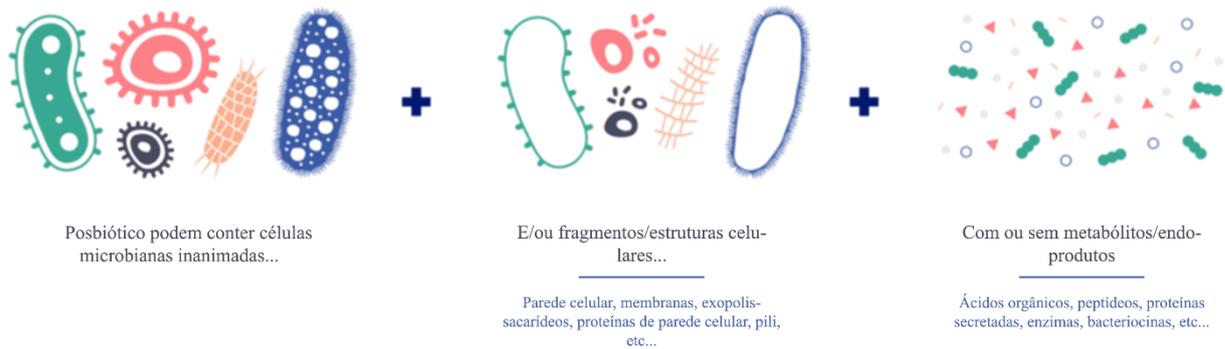


Figura 2. Composição de posbióticos. Os posbióticos podem tratar-se de microrganismos inativados ou suas estruturas celulares lisadas podendo ou não conter metabólitos na preparação. Adaptado de (ADARE BIOME, 2023)

Por se tratar de organismos inativados os posbióticos são considerados uma opção mais segura que probióticos tendo em vista as preocupações quanto ao uso de linhagens vivas em certas populações de pacientes, incluindo indivíduos imunossuprimidos e crianças (DORON; SNYDMAN, 2015; MA; TU; CHEN, 2023). Estas preparações podem reduzir significativamente o risco de translocação microbiana e infecções, são mais seguros que probióticos, havendo também um menor risco de resistência antimicrobiana associado (AGUILAR-TOALÁ et al., 2018; PIQUÉ; BERLANGA; MIÑANA-GALBIS, 2019).

A maior parte dos estudos realizados com posbióticos, *in vivo* e *in vitro*, focam nas preparações obtidas a partir de diferentes linhagens da família *Lactobacillaceae* e do gênero *Bifidobacterium*, e em menor escala, de espécies de *Saccharomyces* (MEHTA; AYAKAR; SINGHAL, 2023). Embora ainda não se compreenda completamente os mecanismos envolvidos na maioria das propriedades bioativas dos posbióticos, as evidências científicas apoiam a ideia de que essas substâncias possuem uma variedade de propriedades funcionais e bioativas, tais como atividades antimicrobianas, antioxidantes e imunomoduladoras, atuando por meio de vias diretas ou indiretas (CUEVAS-GONZÁLEZ; LICEAGA; AGUILAR-TOALÁ, 2020). Estima-se que os mecanismos diretos ocorram a partir das interações entre posbióticos com diversas moléculas ou receptores por meio de ações inibitórias, como por exemplo, antioxidantes, imunomoduladores e antimicrobianos (AGUILAR-TOALÁ et al., 2018; DE ALMADA et al., 2016) Já os mecanismos indiretos podem envolver a homeostase da microbiota e/ou as vias metabólicas e de sinalização do hospedeiro, afetando assim reações fisiológicas específicas (SHARMA; SHUKLA, 2016; SHENDEROV, 2013). Um trabalho de Shin e colaboradores demonstrou o potencial de um lisado de *Bifidobacterium longum* SPM1207 isolado de amostras fecais de indivíduos Coreanos adultos em reduzir a

colesterolemia em ratos (SHIN et al., 2010). Apesar dos mecanismos de ação do posbiótico não estarem completamente claros, os autores especulam que a degradação do β -glucano da parede celular das células mortas devido à sonicação pode afetar a redução dos níveis de colesterol sérico. Vetvicka e colaboradores demonstraram que o β -glucano derivado de levedura e cogumelo desempenha um papel na redução do colesterol no soro de ratos (VETVICKA et al., 2008). Além disso, os autores supõem que produtos metabólicos das células mortas podem inibir a enzima de síntese de colesterol reduzindo a produção de colesterol, inibir a absorção do colesterol de volta ao corpo, ligando-se ao colesterol ou interferir com a reciclagem do sal biliar como produto metabólico do colesterol e facilitar a sua eliminação (SHIN et al., 2010).

Alguns dos efeitos associados à eficácia dos posbióticos incluem a melhora da barreira epitelial, efeitos imunomoduladores e efeitos antimicrobianos (IZUDDIN et al., 2019; JENSEN et al., 2010; NOCERINO et al., 2017). Um estudo examinou os efeitos do tratamento oral com células vivas ou inativas por calor de *S. boulardii* na translocação bacteriana, permeabilidade intestinal, aspecto histológico do íleo e alguns parâmetros imunológicos em um modelo de obstrução intestinal murino. Os resultados indicaram que a obstrução intestinal aumentou a translocação bacteriana e a permeabilidade intestinal, mas o tratamento com *S. boulardii* viva ou inativada por calor reduziu a translocação bacteriana e fortificou a barreira intestinal mostrando, portanto, uma eficácia semelhante entre a forma posbiótica e probiótica das leveduras (GENEROSO et al., 2011). Entretanto, não somente em modelos animais, mas em ensaios clínicos os efeitos benéficos de posbióticos também vem sendo explorados. Um trabalho realizado no Japão por Sawada e colaboradores avaliou os efeitos da ingestão de uma bebida à base de leite fermentado pelo *Lactobacillus gasseri* CP2305 posteriormente inativado por calor, na função gastrointestinal de indivíduos saudáveis com propensão à constipação ou movimentos intestinais frequentes (SAWADA et al., 2016). Foram selecionados 39 participantes que foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo que um grupo consumiu uma bebida placebo à base de leite fermentado artificialmente, enquanto o outro grupo consumiu, durante 3 semanas, uma bebida à base de leite fermentado contendo *L. gasseri* CP2305 inativado. Os resultados revelaram que a bebida fermentada contendo *L. gasseri* CP2305 inativada por calor teve um efeito benéfico na regulação da função intestinal, especialmente em indivíduos com propensão à constipação. Houve melhora nas características das fezes, incluindo escores subjetivos e objetivos na escala de fezes de Bristol, como quantidade de fezes e tonalidade da cor (LEWIS; HEATON, 1997). As análises das amostras fecais demonstraram um aumento significativo nas concentrações de AGCCs no grupo CP2305. A avaliação da composição da microbiota intestinal nas amostras fecais dos pacientes

demonstrou um aumento da população do cluster IV de *Clostridium* no grupo CP2305. Este “cluster” é conhecido por conter espécies sabidamente produtoras de AGCCs (SAWADA et al., 2016). Atualmente, os posbióticos são aplicados não apenas na indústria de alimentos fermentados, mas também como uma estratégia promissora de tratamento para condições de saúde, especialmente em distúrbios gastrointestinais (VANDENPLAS et al., 2020). Sua aplicação seria um complemento eficiente aos probióticos e uma força motriz para o desenvolvimento de uma indústria de saúde abrangente.

A maior parte dos estudos envolvendo tanto probióticos como posbióticos está focada em doenças inflamatórias e infecciosas do trato digestivo como IBD, mucosite intestinal e diarreia infecciosa. Esses estudos envolvem tanto modelos animais quanto testes clínicos com pacientes acometidos. Um dos modelos animais mais utilizado para caracterizar a ação de microrganismos no hospedeiro é o modelo murino de mucosite intestinal, um modelo de inflamação aguda baseada na ação de fármacos antimetabólitos que promovem lesões ulcerativas no TGI.

2.4. Mucosite Intestinal

A mucosite é uma condição inflamatória que afeta o TGI e se manifesta por meio de sintomas como diarreia, dor abdominal, sangramento, fadiga, desnutrição, desequilíbrio eletrolítico e infecções com possíveis complicações fatais (KIM et al., 2018; SONIS, 2004; TOUCHEFEU et al., 2014; VILLA; SONIS, 2015). A principal causa da mucosite está associada à terapia do câncer que utiliza medicamentos antimetabólitos, como azacitidina, 5-fluorouracil (5-FU), 6-mercaptopurina, metotrexato, fludarabina, entre outros. Estes medicamentos são fármacos com estrutura bioquímica similar a um metabólito necessário para reações normais, e ao integrarem o material genético, interferem no DNA e no RNA, substituindo seus blocos de construção normais, provocando danos às células durante a fase em que seus cromossomos são copiados (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; MIURA et al., 2010). Células com maior frequência regenerativa são mais afetadas por quimioterápicos devido à sua alta taxa de proliferação e, portanto, maior frequência de dano associado às alterações decorrentes do uso destes medicamentos. De modo geral, células da mucosa intestinal apresentam esta característica e são frequentemente afetadas pela quimioterapia (SONIS, 2004; VILLA; SONIS, 2015).

Um dos principais antimetabólitos utilizados como quimioterápico, o 5-FU foi desenvolvido na década de 1950 e introduzido na terapia do câncer para inibir a divisão e a proliferação celular de células cancerígenas, sendo aplicado principalmente no tratamento câncer

colorretal, câncer de mama e de estômago (CASSIDY; SYED, 2017; GUICHARD et al., 2017; LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; MARTINS; WAGNER; LINDEN, 2013). No entanto, o 5-FU possui um mecanismo de ação não específico que não apenas afeta as células cancerígenas, mas também afeta várias células saudáveis localizadas em diferentes tecidos do corpo humano, especialmente em tecidos com alta taxa de proliferação, como as células do TGI (DUNCAN; GRANT, 2003). Como resultado de seus efeitos citotóxicos, os pacientes frequentemente experimentam efeitos colaterais, como náuseas, cardiotoxicidade, leucopenia, alopecia, mielossupressão, diarreia e mucosite oral e intestinal, sendo os últimos alguns dos principais efeitos. Esses efeitos colaterais não apenas causam má absorção intestinal e redução da qualidade de vida dos pacientes, mas também podem levar à interrupção do tratamento e aumentar o risco de infecções (CINAUSERO et al., 2017; DUNCAN; GRANT, 2003; SONIS, 2004).

A fisiopatologia da mucosite pode ser dividida em cinco fases distintas: iniciação, resposta a danos primários, amplificação do sinal, ulceração e cicatrização. Essas fases resultam em uma rápida deterioração da estrutura e função intestinal (KIM et al., 2018; SONIS, 2004; TOUCHEFEU et al., 2014). Após a administração do quimioterápico, a fase de iniciação, na qual o 5-FU é incorporado às moléculas de DNA/RNA é desencadeada, resultando em alterações estruturais dessas moléculas. Isso leva à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam danos celulares ao epitélio (SONIS, 2004).

Na fase de resposta a danos primários, devido aos danos causados ao DNA e à produção de EROs, ocorre a ativação de vias de sinalização, como a via do fator nuclear-kappa B (NF- κ B), que estimula a produção e liberação de mediadores inflamatórios, incluindo a ciclooxigenase-2 (Cox2), a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL1 β , IL8 e IL6. Essas citocinas desempenham um papel importante na toxicidade da mucosa, amplificando os danos, resultando em lesão tecidual e induzindo a morte celular (CHANG et al., 2018; SONIS, 2002).

Na terceira fase, ocorre um mecanismo de feedback positivo em que as citocinas pró-inflamatórias produzidas não apenas causam danos nos tecidos, mas também ativam outras vias de sinalização, desencadeando uma amplificação do sinal inflamatório. Essa amplificação envolve a ativação de fatores de transcrição, como as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), o fator p21 e a protease caspase 3, que estão relacionados ao processo inflamatório e à apoptose celular tecidual. Esse processo exacerbado contribui para a progressão da lesão (SONIS, 2004).

Na fase subsequente, conhecida como fase ulcerativa, ocorre a ruptura da integridade da barreira epitelial devido ao desenvolvimento de úlceras profundas. Isso resulta em um aumento na permeabilidade intestinal, permitindo a translocação bacteriana para o tecido circundante. Além disso, observam-se alterações como o encurtamento das vilosidades intestinais, aumento da profundidade das criptas intestinais e aumento do número de células inflamatórias, como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Essas mudanças contribuem para a diminuição da área de absorção intestinal e causam alterações na composição da microbiota intestinal (SONIS, 2004). Na fase final, ocorre a cicatrização natural das úlceras, geralmente cerca de duas semanas após a interrupção do tratamento. Esse processo de recuperação ocorre espontaneamente, envolvendo a proliferação e diferenciação de tecidos e células estimuladas pelos sinais da matriz extracelular presente na submucosa. Essa regeneração é responsável pela restauração do epitélio lesionado (DUNCAN; GRANT, 2003; YEUNG et al., 2015)

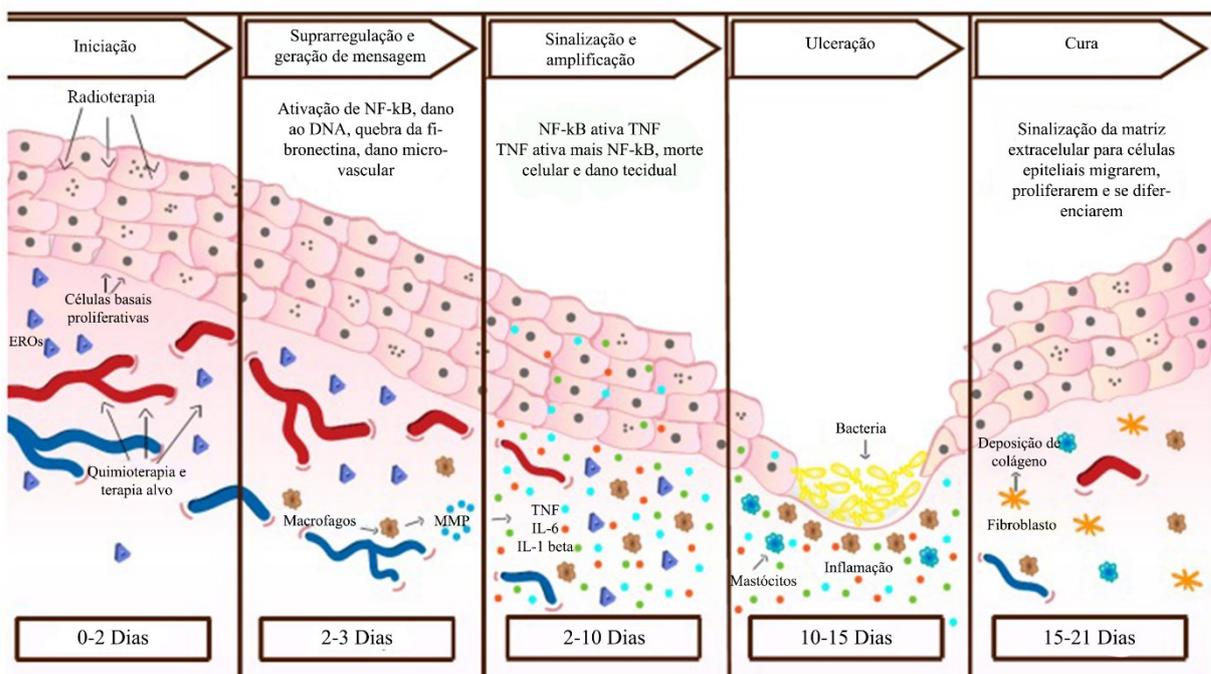


Figura 3. Representação esquemática das cinco fases de desenvolvimento da mucosite intestinal: Iniciação, resposta a danos primários, amplificação de sinais, ulceração e cicatrização. Adaptado de (BASILE et al., 2019)

Atualmente, não há nenhum procedimento efetivo disponível para a prevenção ou tratamento da mucosite. As opções terapêuticas utilizadas, como anestésicos locais, analgésicos e antibióticos, proporcionam apenas um alívio temporário e de curta duração dos sintomas, reduzindo a intensidade e a duração dessa condição patológica (DUNCAN; GRANT, 2003; HERBERS et al., 2014)

Diante dessa situação, tem havido uma busca por alternativas terapêuticas eficazes para aliviar os sintomas clínicos, prevenir ou até mesmo tratar a mucosite intestinal. Dentre essas

alternativas, os probióticos têm se destacado como uma opção promissora (DE JESUS et al., 2019; KATO et al., 2017). Além disso, os posbióticos também têm sido amplamente retratados na literatura devido às suas propriedades anti-inflamatórias, que ajudam a mitigar os danos inflamatórios intestinais causados pelo uso de quimioterápicos. (BATISTA et al., 2022; NOBRE et al., 2022; TRINDADE et al., 2023). Muitos trabalhos utilizam os modelos animais de mucosite intestinal para avaliar o efeito de probióticos e posbióticos nesta condição inflamatória. A administração dos fármacos antineoplásicos causadores de mucosite nestes animais possibilita a fácil criação de diversos modelos que propiciam seu estudo de modo mais similar ao que ocorre no organismo humano e podem nos esclarecer sobre os possíveis efeitos das terapias na nossa espécie.

2.5. Efeitos de probióticos, posbióticos e sobrenadante livre de células em modelo de mucosite intestinal

Os efeitos de microrganismos probióticos vem sendo bastante explorados em modelos de mucosite intestinal induzida por quimioterápicos. Os probióticos podem promover imunomodulação de genes associados ao processo inflamatório e genes de barreira epitelial, além de remodelarem a microbiota intestinal promovendo um estado de homeostase. Estes efeitos promovidos por probióticos estão intimamente associados, entre outras coisas, a estruturas de membrana e parede celular presentes nestes organismos. Um trabalho com a linhagem *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 demonstrou a relação entre a proteína SlpB associada à adesão de *P. freudenreichii* às células epiteliais intestinais e atividade imunomoduladora desta linhagem em modelo murino de mucosite. Utilizando linhagens knockout para o gene *SlpB* foi possível verificar que a linhagem selvagem preveniu a perda de peso, reduziu a inflamação e melhorou parâmetros histopatológicos avaliados além de regular importantes genes como claudina-1, IL17a, IL12 e IL1 β ao passo que o mutante promoveu um efeito regulatório contrário na expressão de claudina-1 e IL12 (DO CARMO et al., 2017, 2019).

Fang e colaboradores (2014) compararam os efeitos imunomoduladores de *Lactococcus rhamnosus* GG vivas e inativadas por calor em um modelo *in vitro* de mucosite induzida por 5-FU utilizando células Caco-2 (FANG et al., 2014). Para inativação das bactérias por calor, uma cultura de *L. rhamnosus* GG foi submetida à tratamento em banho maria por 20 min a 85 °C. Imagens de micrografia eletrônica de varredura demonstraram que o aquecimento não afetou a integridade celular dessa linhagem, mantendo sua estrutura em forma de bastonete intacta. Após tratadas com 5-FU as células Caco-2 foram incubadas com meio MRS contendo *L. rhamnosus* GG vivas ou inativadas e a transcrição de genes associados a processos inflamatórios foi

posteriormente quantificada por meio de RT-*q*PCR. Ambas as formas probiótica e posbiótica de *L. rhamnosus GG* aumentaram a expressão de TNF e MCP-1, mas apenas a forma viva de *L. rhamnosus GG* regulou a expressão de IL12. Os resultados demonstram que essa espécie bacteriana conserva propriedades probióticas após a inativação pelo calor, tornando-a uma candidata promissora para novos estudos da ação posbiótica da linhagem (FANG et al., 2014).

Em um trabalho mais recente com a espécie de *L. rhamnosus* testada em modelo murino de mucosite foi verificado o efeito protetor da preparação posbiótica sobre a mucosa intestinal dos animais. A linhagem comercial *L. rhamnosus* CGMCC1.3724 foi isolada do probiótico Innéov Silhouette® (L'Oréal & Nestlé, Clichy, França) e após cultivo as bactérias foram inativadas por calor a 120 °C por 15 minutos. Camundongos BALB/c receberam a preparação por gavagem intragástrica durante 13 dias e a mucosite foi induzida no 10º dia experimental por injeção intraperitoneal de 5-FU. A administração do posbiótico reduziu a perda de peso dos animais, manteve a permeabilidade intestinal em níveis fisiológicos, preservou as vilosidades e criptas intestinais, reduziu o infiltrado inflamatório, aumentou a secreção de muco, a expressão do gene *Muc2* e a frequência das células Treg (TRINDADE et al., 2023).

Preparações com a linhagem *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 também demonstraram melhorar parâmetros associados à mucosite em modelo murino. A linhagem foi cultivada em meio MRS a uma concentração de 10⁹ UFC/mL e posteriormente as bactérias recuperadas do cultivo foram inativadas por exposição ao calor a 121 °C durante 15 minutos. O sobrenadante deste cultivo foi esterilizado em filtro 0,22 µm e concentrado com Vivaspin® 20. As preparações foram administradas por gavagem a camundongos BALB/c durante 13 dias e a mucosite foi induzida no 10º dia experimental por injeção intraperitoneal de 5-FU. Foi verificado que ambos os tratamentos posbiótico e com sobrenadante livre de células houve redução na atividade da enzima MPO além da imunomodulação de genes associados a citocinas inflamatórias. Ambos os tratamentos reduziram a expressão de genes pró-inflamatórios *Nfkb1*, *Il12*, *Il17a* e o tratamento com células inativadas também foi capaz de reduzir a expressão de *Tnf*. Além disso, os tratamentos melhoraram a expressão dos genes de barreira epitelial *Ocln*, *ZO-1* e *Cldn1, 2 e 5*. O tratamento com sobrenadante também aumentou consideravelmente a expressão de *Muc2*. Os resultados demonstram a eficácia das preparações posbióticas e de metabólitos secretados na proteção e imunomodulação da mucosa gastrointestinal (BATISTA et al., 2022).

Fatores derivados de EcN também demonstram potencial protetor sobre a mucosa intestinal. Prisciandaro e colaboradores (2011) demonstraram que o sobrenadante livre de células de EcN protege parcialmente o intestino de ratos contra os danos causados pela administração de 5-FU. Para isto, o sobrenadante da cultura de EcN foi resgatado e esterilizado em filtro 0,22 µm.

Ratos agouti fêmeas receberam o tratamento por gavagem intragástrica durante oito dias, e no quinto dia experimental a mucosite foi induzida por injeção intraperitoneal de 5-FU. Foi feita uma pontuação de dano histológico em que demonstrou uma redução do dano ocasionado pela mucosite nas porções jejunal e ílica do intestino delgado dos animais tratados com o sobrenadante. A preparação ajudou a evitar danos histológicos, mantendo a altura das vilosidades e profundidade das criptas a níveis normais e prevenindo a depleção das células caliciformes produtoras de muco (PRISCIANDARO et al., 2011). Estes dados demonstram o potencial, não somente de probióticos, mas de posbióticos e de metabólitos secretados por microrganismos em um contexto de inflamação aguda.

Em um trabalho recente realizado por nosso grupo de pesquisa com a linhagem CEC15, seu efeito sobre a mucosite induzida por 5-FU foi avaliada em modelo murino em comparação com a linhagem EcN (DA SILVA et al., 2023). Doses de 1010 UFCs de bactérias vivas foram administradas a camundongos Balb/c nos quais fora induzida a mucosite por meio de injeção intraperitoneal de 5-FU no 10º dia experimental. As bactérias também foram testadas em camundongos saudáveis a fim de verificar seus efeitos nestas condições. Os animais foram eutanasiados e a porção ílica do intestino foi coletada para análises histológicas e avaliação do processo inflamatório, sangue foi colhido para mensurar a permeabilidade intestinal e fezes foram coletadas para avaliação metagenômica da composição da microbiota intestinal dos animais. Nenhuma das linhagens testadas promoveu qualquer prejuízo aos animais saudáveis, o que denota a segurança de ambas em modelo murino. Todavia, no modelo de inflamação a linhagem CEC15 se mostrou superior à EcN ao abrandar os efeitos da mucosite. CEC15 foi capaz de atenuar o processo inflamatório, avaliado pela reatividade da enzima MPO na porção ílica do intestino delgado dos animais. Além disso, a linhagem preveniu o dano tecidual causado pelo quimioterápico, mantendo a arquitetura do epitélio intestinal, o que foi quantificado por meio de pontuação histológica analisando parâmetros como a presença de infiltrado inflamatório, perda das bordas em escova dos enterócitos, reatividade vascular, entre outros. Ambas as linhagens preveniram o aumento da permeabilidade intestinal, entretanto, somente CEC15 foi eficaz ao prevenir a perda de peso dos animais inflamados. O trabalho avaliou também a capacidade de modulação da microbiota intestinal pelas linhagens. Análises metagenômicas revelaram que a administração de 5-FU promoveu um desbalanço na microbiota reduzindo a abundância de Firmicutes e aumentando as populações de Bacteroidota e Proteobacteria. A administração de CEC15 promoveu uma grande redução de Proteobacteria, restaurando as proporções entre Firmicutes e Bacteroidota. Já EcN promoveu apenas uma ligeira restauração, sendo observado até mesmo um aumento em Bacteroidota. Os filos

Firmicutes e Bacteroidota estão negativamente correlacionados com a mortalidade e o escore de índice de atividade de doença (DAI) (ALGIERI et al., 2021), sugerindo que restaurar sua abundância pode ter desempenhado um papel importante na proteção da arquitetura intestinal. Os resultados sugerem que, assim como EcN, CEC15 também é uma linhagem segura para ser administrada em condições saudáveis e promissora como probiótico, capaz de modular a microbiota intestinal, propiciando efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios e reforçando a barreira intestinal (DA SILVA et al., 2023).

Com o uso crescente de probióticos na sociedade, a descoberta de novas linhagens com propriedades benéficas tem se tornado uma necessidade constante. Baseado nos dados expostos, avaliamos que linhagens Gram-negativas de *E. coli* podem desempenhar atividades probióticas com aplicabilidade à saúde humana e animal. Entretanto, não somente as formas probióticas, mas também as preparações posbióticas podem desempenhar funções positivas aos consumidores, reduzindo o risco associada à administração de microrganismos vivos. Considerando os resultados promissores que vem apresentando, testamos a linhagem CEC15 em sua forma posbiótica em modelo murino de mucosite induzida por 5-FU em comparação com a linhagem de referência EcN (DA SILVA et al., 2023; ESCRIBANO-VAZQUEZ et al., 2019; TOMAS et al., 2015).

Capítulo 1

“Postbiotic effect of *Escherichia coli* CEC15 and *Escherichia coli* Nissle 1917 on a murine model of 5-FU-induced intestinal mucositis”

3. ARTIGO ORIGINAL

“Postbiotic effect of *Escherichia coli* CEC15 and *Escherichia coli* Nissle 1917 on a murine model of 5-FU-induced intestinal mucositis”

Esse capítulo apresenta resultados inéditos do efeito da linhagem probiótica *E coli* CEC15 e suas preparações posbióticas que incluem bactérias inativadas por calor e sobrenadante estéril, em modelo murino de mucosite induzida por 5-FU comparando-os com o efeito da linhagem referência EcN. O trabalho avalia parâmetros clínicos, histológicos, moleculares e metabólicos das diferentes preparações sob as mesmas condições experimentais e discute os resultados com a literatura pertinente ao tema.



Preprints are preliminary reports that have not undergone peer review.
They should not be considered conclusive, used to inform clinical practice,
or referenced by the media as validated information.

Postbiotic effect of *Escherichia coli* CEC15 and *Escherichia coli* Nissle 1917 on amurine model of 5-FU-induced intestinal mucositis

Rafael de Assis Glória

Institute of Biological Sciences, Department of Genetics, Ecology, and Evolution, Federal University of Minas Gerais

Tales Fernando da Silva

Institute of Biological Sciences, Department of Genetics, Ecology, and Evolution, Federal University of Minas Gerais

Tomás Andrade Magalhães Gomes

Institute of Biological Sciences, Department of Genetics, Ecology, and Evolution, Federal University of Minas Gerais

Kátia Duarte Vital

Department of clinical and toxicological analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais

Simone Odília Antunes Fernandes

Department of clinical and toxicological analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais

Valbert Nascimento Cardoso

Department of clinical and toxicological analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais

Ênio Ferreira

Department of general pathology, Federal University of Minas Gerais

Jean-Marc Chatel

Université Paris Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR1319, MICALIS

Philippe Langella

Université Paris Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR1319, MICALIS

Claire Cherbuy

Université Paris Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR1319, MICALIS

Yves Le Loir

INRAE, Institut Agro, STLO, 35042

Gwénaél Jan

INRAE, Institut Agro, STLO, 35042

Éric Guédon

INRAE, Institut Agro, STLO, 35042

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo (✉ vascoariston@gmail.com)

Institute of Biological Sciences, Department of Genetics, Ecology, and Evolution, Federal University of Minas Gerais

Research Article

Keywords: Escherichia coli, Postbiotics, mucositis, 5-Fluorouracyl, CEC15, Nissle 1917

Posted Date: November 15th, 2023

DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3592871/v1>

License:  This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.
[Read Full License](#)

Additional Declarations: No competing interests reported.

Abstract

Postbiotics are preparations of inanimate microorganisms and/or their components that confers a health benefit on the host. The *Escherichia coli* strains Nissle 1917 (EcN) and CEC15 have shown beneficial effects, in their live form, in murine models of intestinal inflammation, such as colitis and mucositis. However, the use of live bacteria, in special by immunocompromised individuals, had raised concerns. Based on this, the present study evaluated the effects as postbiotic of heat-inactivated, and cell-free supernatant preparations of EcN and CEC15 in attenuating 5-fluorouracil (5-FU)-induced intestinal mucositis in mice and compared them with the probiotic effects of the live preparations. BALB/c mice were fed daily, by gavage, with 10^{10} CFU of live or inactivated bacteria, or with 300 μ L of cell-free supernatant for 12 days. On the 10th day, all animals, except for the control group, received an intraperitoneal injection of 5-FU (300 mg/kg). After 72 h of 5-FU administration, animals were euthanized, and the ileum and blood were collected for analysis. Treatments with live and heat-inactivated CEC15 mitigated weight loss, preserved intestinal length, reduced histological damage, maintained goblet cells, decreased neutrophil infiltration, and modulated expression of inflammatory and barrier genes, when compared to 5-FU mucositis controls. EcN showed more limited effects. CEC15 upregulated mRNA expression of the mucin *MUC2* and tight junction protein *TJP1*. Overall, CEC15 demonstrated protective effects against 5-FU-induced mucositis, whatever the way it was administered: live bacteria, heat-inactivated bacteria, or cell-free supernatant. This suggests CEC15 mediates a protective response via secreted metabolites and does not require viability.

1. INTRODUCTION

Probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, can potentially bring health benefits to the host [1]. Lactic acid bacteria (LAB), such as members of the *Lactobacillaceae* family, *Lactococcus* spp., and *Streptococcus* spp., represent most probiotics found on the market today, together with *Bifidobacterium* spp., *Propionibacterium* spp., and the yeast *Saccharomyces* spp. Most of these organisms are found naturally in the human gastrointestinal tract. Nonetheless, some Gram-negative bacteria have also been identified with beneficial effects on the host [2].

One of the most studied Gram-negative probiotic bacteria is *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). EcN is considered safe and effective and has been approved by the FDA for treating acute diarrhea in children. Studies have shown that EcN can produce various bioactive compounds that may have beneficial effects on human health. For example, EcN can produce bacteriocins, small peptides with antimicrobial activity against many pathogenic bacteria [3]. In addition, EcN can produce short-chain fatty acids, such as acetic acid, that promote a stimulatory effect on intestinal motility [4], through the modulation of the gut microbiota, by colonizing the human gastrointestinal tract (GIT), compete with other bacteria, and interact with host cells [5–7], and by modulating the diversity of the gut microbiota by reducing the number of pathogenic bacteria, which may lead to improved gut function and overall health [8–14].

Although EcN is generally considered safe, some concerns exist regarding its use in immunocompromised patients. These concerns relate to characteristics suggested by EcN genome sequence and which may negatively affect the health of these individuals, such as the toxin called colibactin, a potential genotoxic agent that can lead to DNA damage in intestinal cells and increase the risk of colorectal cancer [15, 16]. Finally, some studies have suggested that EcN may increase the production of pro-inflammatory cytokines in patients with inflammatory bowel disease (IBD). Although the production of pro-inflammatory cytokines is a normal immune system response to infection, this response can be exacerbated in IBD patients, leading to damage to intestinal tissue [17]. Therefore, there are concerns regarding the use of EcN in IBD patients.

In 2013, *E. coli* CEC15 (CEC15) was isolated from the feces of a newborn rat during a study that sought to identify bacteria with probiotic potential [18]. This study showed that early colonization by CEC15 triggered an adaptive response in the colonic epithelium of the mice, leading to the remodeling of the epithelial tissue, thickening of the mucus layer, and affecting ion and water transport. Colonization by *E. coli* CEC15 had a long-term effect on the colonic epithelium, leading to a shift in intestinal homeostasis toward a new equilibrium state [18].

Since then, new studies have sought to characterize this strain by evaluating its beneficial potential *in vivo* in murine models of intestinal inflammation. One work using gnotobiotic mice evaluated the effects of CEC15 colonization of the gastrointestinal tract, in comparison with the commercial EcN strain. CEC15 colonization increased expression of genes related to immunity and to defense against pathogens, mainly due to an increased production of mucin, a protein that coats the intestinal epithelium and helps preventing pathogen entry, evidencing the potential of this strain in modulating gut defense mechanisms [19]. More recently we evaluated and compared the protective effect of both strains, EcN and CEC15, in a model of intestinal mucositis induced by the drug 5-Fluorouracil (5-FU) in mice [20]. This model presents high severity in the inflammatory process and allows a better evaluation of probiotics' anti-inflammatory effects [21]. We demonstrated the preventive beneficial issue of CEC15 in this acute inflammatory model [20].

Recent research emphasizes the effect of various bacterial components, suggesting that live microorganisms are not required for beneficial action [22]. Furthermore, the use of killed microorganisms (also named paraprobiotics or ghost probiotics) and of their secreted products (also named metabiotics) may offer safety advantages, reducing the risk of infection and microbial translocation observed in immunocompromised individuals after probiotic administration [22, 23]. Therefore, an alternative to the possible unwanted effects caused by probiotics is the use of postbiotics [24]. A postbiotic is a preparation of inanimate microorganisms and/or their components that confers a health benefit on the host. [25]. Because they are inactivated or inert components, postbiotics are considered safer than probiotics given the concerns related to the use of live microorganisms in specific patient populations, including immunosuppressed individuals [26]. These preparations can significantly reduce the risk of microbial translocation and infections, are more stable than probiotics, and have a lower risk of associated antimicrobial resistance.

Some of the mechanisms associated with the efficacy of postbiotics include epithelial barrier enhancement, immunomodulatory effects, and antimicrobial effects [27–29]. Currently, postbiotics are applied as a promising treatment strategy for health conditions, especially in gastrointestinal disorders [30]. Therefore, their application would be an efficient complement to probiotics and a driving force for developing a comprehensive health industry. Here we evaluated the potential beneficial role of postbiotic preparations from *E. coli* CEC15 and Nissle 1917 strains in the context of an acute intestinal inflammation, an in vivo intestinal mucositis induced by the cancer chemotherapy drug 5-FU. For that, we compared the effect of live bacteria (as control), heat-inactivated bacteria, and cell-free supernatant of both strains on the intestinal barrier and on inflammatory markers.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

Male BALB/c mice aged 6 weeks (n = 8/group), acquired from the Central Animal Facility of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), were used. During the experiments, the mice were kept in mini-isolators in the animal house of the Department of Genetics, Ecology and Evolution of the Institute of Biological Sciences (ICB), UFMG, fed with standard mouse chow, water *ad libitum*, and a 12-hour light cycle. The experimental protocols used in this study were performed according to the guidelines approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) - UFMG (Protocol: 210/2022).

2.2. Bacterial cultures and sample preparation

For this experiment, both *E. coli* strains (Nissle 1917 and CEC15) were grown in LB medium with shaking (150 rpm) for 18 h at 37°C. To collect the supernatant, 30 mL of culture was centrifuged at 6000 x *g* for 15 min. The supernatant was subsequently filtered using a 0.22 µm syringe filter and aliquoted into 300 µL samples, kept at -80°C until use for the inactivated bacteria. The overnight culture was diluted to an optical density of 0.6 (λ = 600 nm) (OD₆₀₀), equivalent to 2 x 10⁸ CFU/mL, and centrifuged at 6000 x *g* for 15 minutes. The supernatant was discarded, the pellet was washed three times with sterile PBS, and finally resuspended in 3 mL of PBS. The wash was then incubated at 65°C for 1 hour to inactivate the bacteria, and after incubation, 300 µL samples were aliquoted. The inactivated bacteria and supernatant were seeded on LB agar and incubated for 48 hours at 37°C to confirm sterility. The live bacteria doses were prepared daily throughout the experiment. For that, overnight culture was diluted to an OD₆₀₀ of 0.2, to a final volume of 30 mL, and grown until reach an OD₆₀₀ of 0.6 and centrifuged at 6000 x *g* for 15 minutes. The supernatant was discarded, the pellet was washed three times with sterile PBS, and resuspended in 3 mL of PBS. The doses were aliquoted into microtubes in 300 µL volumes.

2.3. Experimental model and animal groups

The animals were randomly divided into eight experimental groups as described below: Ct- (negative control), MUC (induction of mucositis by 5-FU without treatment), EcN (treated with live EcN and induction of mucositis by 5-FU), EcNi (treated with heat-inactivated EcN and induction of mucositis by 5-

FU), EcNs (treated with supernatant of EcN culture and induction of mucositis by 5-FU), CEC (treated with live CEC15 and induction of mucositis by 5-FU), CECi (treated with heat-inactivated CEC15 and induction of mucositis by 5-FU), CECs (treated with culture supernatant of CEC15 and induction of mucositis by 5-FU). Over 12 days, all animals received daily by gavage 300 μ L of live, inactivated bacteria or supernatant according to the corresponding group, except for the Ct- and MUC-groups that received PBS. The experimental design is shown in Fig. 1.

The induction of intestinal mucositis in mice was based on the model previously described by Carvalho and colleagues (Carvalho et al., 2017). The animals received an intraperitoneal injection containing 300 mg/kg of 5-FU in a single dose for induction of inflammation 10 days after the beginning of the experimental period. Sterile PBS administered by the same route was used as a control. After 72 hours after the induction of mucositis, the animals were euthanized by deep anesthesia with ketamine + xylazine (270 and 90 mg/kg, respectively) to perform the analyses.

2.4. Food/water consumption and weight change

The feed was weighed on a semi-analytical scale during all the days of the experiment, and the water volume was measured daily with the aid of a volumetric measuring cylinder to evaluate the food and water consumption. The results were presented in two periods: before the induction of the disease (days 0–10) and after the induction of inflammation (days 11–13), to verify if the proposed treatments can improve the clinical picture of low food and water consumption caused by intestinal mucositis. The animals were weighed on semi-analytical scales every day of the experiment to assess weight variation in grams (weight gain or loss before and after the induction of mucositis) in the animals.

2.5. Evaluation of intestinal permeability

To evaluate the intestinal permeability of the animals, on the 13th experimental day, all the mice received by gavage 100 μ L of a solution containing 18.5 MBq of diethylenetriaminepentaacetic acid radiolabeled with technetium-99m ($^{99m}\text{Tc-DTPA}$) with a radiochemical purity of 99.4% performed by chromatography on Wattman paper. After 4 hours, all mice were euthanized, and blood was collected by axillary puncture, weighed, and placed in appropriate tubes for radioactivity determination. The levels of radioactivity in the blood were determined using an automated gamma counter (PerkinElmer Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter; PerkinElmer Inc.) The results are presented as the percentage of radiation dose, which was calculated using the following equation:

$$\%DTPA/g = \frac{cpmbloodtreatment}{cpmbloodcontrol} \times 100$$

Where cpm represents counts of radioactivity per minute.

2.6. Histological analysis

After the euthanasia procedure, samples of the ileum from the animals in each group were collected for histological analysis. The intestines were cut longitudinally, stretched with the serosal layer in contact

with the filter paper, and opened by the anti-mesenteric edge, removing all its contents without damage to the mucosa. The organs were then placed on a flat surface, and they were rolled in a spiral with the mucosa facing inward to form rolls from the distal to the proximal portion. Subsequently, the rolls were fixed by immersion in a 10% buffered formalin solution, where they were kept until processed. The material was processed for paraffin embedding, and 4 µm sections of each sample were stained with hematoxylin/eosin (HE), and periodic acid–Schiff (PAS). The pathologist examined microscopic slides, and a histopathological grading system evaluated mucosal and muscular lesions. Photographic images were obtained using an Olympus BX43 microscope and a Q-Color 5 digital camera captured with Q-Capture Pro 7 software (QImaging, BC, Canada).

2.6.1. Histological score

Histological score analyses were performed using the histological sections described above. The score proposed by Howarth and collaborators was used [31] to evaluate the association of mucositis with histological changes of the ileal mucosa so that the microscopic findings evaluated were villous atrophy, rupture of the surface enterocyte borders, depletion of calyceal cells, loss of crypt architecture, destruction of crypt cells, abscess formation in the crypts, infiltration of lymphocytes and polymorphonuclear cells, dilation of capillaries and lymphatic vessels, and thickening with edema formation in the submucosa and external muscle layers. Each histological variable was scored from 0 (average) to 3 (maximum damage), and based on the findings, the points were added for each animal. For morphometric evaluation of the intestinal epithelium structure, 20 villi and 20 crypts were measured per animal. The measurements were performed with the help of ImageJ software on images from random regions of the histological section.

2.6.2. Goblet cells counting

Additionally, the quantification of goblet cells per crypt was established using histology images. Five images were captured from random ileum sections for each animal. Goblet cell counting was conducted for the entire image and presented as the goblet cell count per field.

2.7. Myeloperoxidase (MPO) enzyme activity

Myeloperoxidase enzyme activity was measured to determine the rate of neutrophil recruitment into the small intestine. Fragments of the distal ileum of the animals were collected, weighed, and stored at -80°C. After thawing, the tissue was homogenized with ice-cold buffer (Buffer 1) (NaCl 0.1 M; Na₂EDTA 0.015 M, pH 4.7) (ratio: 1.9 mL/100 mg tissue) and centrifuged at 4°C for 15 min at 10,000 rpm. Immediately afterward, the supernatant was discarded, and the precipitate was submitted to hypotonic lysis by adding ice-cold 0.2% NaCl and 1.6% NaCl supplemented with 5% glucose (ratio: 1.5 mL/100 mg of tissue) to break up red blood cells. The samples were homogenized and centrifuged again at 4°C for 15 min at 10,000 rpm. The supernatant was discarded, and the precipitate resuspended with buffer (Buffer 2) (NaH₂PO₄ 0.05 M; Hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) 0.5%, pH 5.4) (ratio: 1.9 mL/100 mg tissue) and homogenized again at room temperature. Successively, 1 mL aliquots of the suspension were transferred to 1.5 mL microtubes, frozen in liquid nitrogen, and thawed in water at room temperature

alternately three times. Subsequently, the samples were centrifuged at 4°C for 15 minutes at 10,000 rpm, and the supernatant was collected for the enzymatic assay. In a 96-well plate (Nunc-Immuno, MaxiSorp), 25 µL of the collected supernatant was added along with 25 µL of the 1.6 mM TMB substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) (Sigma-Aldrich®), previously diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO). Subsequently, the samples were incubated at 37°C for 5 min, and then 100 µL of 0.002% hydrogen peroxide was added to each well and again incubated at 37°C for 5 min. Soon after, 100 µL of 1 M H₂SO₄, whose function is to stop the reaction, was added. After this step, the absorbance was measured by spectrophotometry at a wavelength of 450 nm using a microplate reader (Bio-Rad model 450, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and the results were plotted as enzyme units per milligram of tissue (U/mg).

2.8. Gene expression analysis of inflammatory and barrier markers

Quantitative PCR was carried out with the PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher) on the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems™) under the following steps: 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. The modulation of gene expression was performed for genes coding for the nuclear factor-kappa B (*NFKB1*), interleukin 1 beta (*IL1B*) and 17 alfa (*IL17A*), mucin 2 (*MUC2*), occludin (*OCLN*), tight junction protein 1 (*TJP1*), and claudin 1 (*CLDN1*). Gene expression results were analyzed following the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and eukaryotic elongation factor 2 (*EEF2*) genes as endogenous references (Table 1).

Table 1
Sequence of primers used in this study

Gene	Primer sequence	Reference
<i>Gapdh</i> *	F: TCACCACCATGGAGAAGGC	[32]
	R: GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA	
<i>Eef2</i> *	F: TGTCAGTCATCGCCCATGTG	[33]
	R: CATCCTTGCGAGTGTCAGTGA	
<i>Nfkb1</i>	F: GTGGAGGCATGTTCCGGTAGTG	[34]
	R: TCTTGGCACAATCTTTAGGGC	
<i>Il1b</i>	F: CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	[35]
	R: GATCCACACTCTCCAGCTGCA	
<i>Il17a</i>	F: GCTCCAGAAGGCCCTCAGA	[36]
	R: AGCTTCCCTCCGCATTGA	
<i>Muc2</i>	F: GATGGCACCTACCTCGTTGT	[37]
	R: GTCCTGGCACTTGTTGGAAT	
<i>Ocln</i>	F: ACTCCTCCAATGGCAAAGTG	[38]
	R: CCCCACCTGTCGTGTAGTCT	
<i>Tjp1</i>	F: CCACCTCTGTCCAGCTCTTC	[39]
	R: CACCGGAGTGATGGTTTTCT	
<i>Cldn1</i>	F: TCCTTGCTGAATCTGAACA	[40]
	R: AGCCATCCACATCTTCTG	
* Reference genes		

2.9. Statistical Analysis

The test for the normality of the data was performed using the Shapiro-Wilk test. Data were evaluated using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test (for parametric data) or Kruskal-Wallis test and further tested by Dunn's test (for non-parametric data). The Mann-Whitney test was used to analyze food and liquid intake before and after induction of inflammation by 5-FU. Spearman's test was used for correlation analysis. All data were performed using GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, United States), p-value < 0.05. Results are presented as mean \pm standard deviation.

3. RESULTS

3.1. *Escherichia coli* CEC15, as well as its inactivated form limited weight loss during mucositis

During the 10 days of treatment administration, there was no change in food and fluid intake, but a notable weight gain in the Ct- (negative control – healthy animals) (1.2 ± 0.5 g), MUC (mucositis control – healthy until day 10) (0.8 ± 0.6 g), CEC (Live CEC15 treatment) (1.1 ± 0.2 g), CECi (Heat inactivated CEC15 treatment) (1.2 ± 0.7 g), and CECs (CEC15 cell-free supernatant treatment) (1.9 ± 0.5 g) treated groups was observed (Fig. 2A). No increase in weight gain was observed in the groups treated with EcN (Live EcN treatment) (0 ± 1.5 g) and its derivatives EcNi (Heat inactivated EcN treatment) (0.5 ± 1 g) and EcNs (EcN cell-free supernatant treatment) (0.4 ± 1.6 g) (Fig. 2B). The treatment with 5-FU drastically decreased feed and water consumption (data not shown), which consequently led to a significant weight loss (-2.7 g \pm 0.5, $p < 0.0001$), while healthy animals (Ct- group) gained weight (1.0 g \pm 0.09) (Fig. 2a and 2b). Treatment with EcN (-2.1 g \pm 0.71, $p = 0.4208$), EcNi (-2.0 g \pm 0.64, $p = 0.2238$), and CECs (-2.1 g \pm 0.44, $p = 0.2692$) could not prevent animal weight loss. In contrast, animals treated with CEC (-1.6 g \pm 0.49, $p = 0.0035$), CECi (-1.5 g \pm 0.34, $p = 0.0004$), and EcNs (-1.9 g \pm 0.54, $p = 0.0462$) showed limited weight loss, when compared to the MUC (Intestinal mucositis control – no treatment) group (Fig. 2c). However, there was no significant difference when the different treatments were compared.

3.2. *Escherichia coli* CEC15, as well as its postbiotic fractions, limited intestinal architecture damages

The effects of CEC15, EcN, and their derivatives on the intestinal structure were also evaluated at the macroscopic and microscopic levels. The protective effect of the treatments on the intestinal mucosa can also be observed in the histological images (Fig. 3a), where we can see great destruction of the epithelial architecture of the ileum in the MUC group and its preservation, more pronounced, in the groups treated with CEC15 and its derivatives. The induction of mucositis led to a relevant shortening on small intestine length (MUC: 29.8 cm \pm 2.03, $p < 0.0001$) compared with the control group (36.7 cm \pm 2.03) with an average loss of 6.9 cm. The treatments with CEC (34.5 cm \pm 1.75, $p = 0.0012$), CECi (36.4 cm \pm 2.54, $p < 0.0001$), and EcNs (36.1 cm \pm 0.88, $p < 0.0001$) maintained intestinal length (Fig. 3b), preventing thus the shortening of the small intestine promoted by 5-FU administration. In contrast, EcN (30.3 cm \pm 3.04, $p = 0.9999$), EcNi (30.6 cm \pm 2.5, $p = 0.9943$), and CECs (32.9 cm \pm 2.18, $p = 0.0973$) did not help prevent small intestine shortening.

All treatments reduced the damage caused by 5-FU in the intestinal mucosa, as can be observed by the histological score, which was preserved in all treatments (Fig. 3c). Healthy animals presented a very low score (Ct-, 0.8 ± 0.46), which was increased by 5-FU administration (MUC, 13.1 ± 1.89 , $p < 0.0001$). However, only the group treated with live CEC15 (CEC, 3.3 ± 2.38 , $p < 0.0001$ to MUC) did not show significant differences compared with the healthy group. Furthermore, apart from the EcN group (6.9 ± 2.1 , $p < 0.0001$ to MUC), the other treatments did not show difference between them (EcNi, 5.4 ± 1.99 ; EcNs, 5.3 ± 1.83 ; CECi, 4.7 ± 2.06 ; CECs, 4.5 ± 0.76 , $p < 0.0001$ for all to MUC group). 5-FU treatment induced a considerable reduction in villus height (Fig. 3d) (MUC, 254.3 μ m \pm 16.56, $p < 0.0001$) and crypt

depth (Fig. 3E) (MUC, $128.9 \mu\text{m} \pm 25.33$, $p < 0.0001$) when compared to healthy animals (Ct-, $501.8 \mu\text{m} \pm 47.5$ and $197.1 \mu\text{m} \pm 32.74$, respectively). Although no treatment prevented villus shortening, all treatments (CEC, $389.0 \mu\text{m} \pm 22.15$; CECi, $394.4 \mu\text{m} \pm 22.54$; CECs, $425.1 \mu\text{m} \pm 27.11$; EcNi, $363.6 \mu\text{m} \pm 45.81$; EcNs, $383.4 \mu\text{m} \pm 22.15$, $p < 0.0001$ for all), except for the EcN group ($285.2 \mu\text{m} \pm 34.45$, $p = 0.6164$), showed a reduction in shortening, with this protection being more pronounced in groups containing CEC15. Regarding the depth of the crypts, no group could prevent or reduce the reduction of the crypts (Fig. 3e) (CEC, $150.2 \mu\text{m} \pm 20.04$, $p = 0.5176$; CECi, $145.8 \mu\text{m} \pm 16.06$, $p = 0.7764$; CECs, $144.2 \mu\text{m} \pm 12.38$, $p = 0.8509$; EcN, $148.3 \mu\text{m} \pm 20.19$, $p = 0.6304$; EcNi, $154.8 \mu\text{m} \pm 25.80$, $p = 0.2726$; EcN, $154.9 \mu\text{m} \pm 14.16$, $p = 0.2681$).

3.3. *Escherichia coli* CEC15, as well as its postbiotic fractions, restored goblet cells counts

The variation in the number of goblet cells was evaluated in PAS staining slides (Fig. 4a). Significant reduction on goblet cells' number was also observed in the 5-FU-treated (MUC: 22.6 ± 3.96 , $p < 0.0001$) ileum-inflamed mice compared to the Ct- group (109.1 ± 12.38). Goblet cell loss was minimized in mice treated with CEC15 (CEC, 68.4 ± 16.39 , $p < 0.0001$) and its derivatives (CECi, 66.5 ± 5.32 , $p < 0.0001$; CECs, 63.9 ± 14.62 , $p < 0.0001$). Similar results were observed in groups treated with the postbiotic forms of EcN (EcNi, 58.3 ± 8.83 , $p < 0.0001$; EcNs, 59.8 ± 6.76 , $p < 0.0001$), while the treatment with live EcN (31.3 ± 16.47 , $p = 0.8103$) was unable to alleviate this loss (Fig. 4b).

3.4. *Escherichia coli* CEC15, as well as its postbiotic fractions, limited gut permeability increase

The 5-FU administration triggered an increased intestinal permeability (Ct-, $0.014\% \pm 0.003$; MUC, $0.698\% \pm 0.289$, $p < 0.0001$). Although all tested treatments reduced the permeability caused by 5-FU (CEC, $0.067\% \pm 0.043$, $p < 0.0001$; CECi, $0.064\% \pm 0.043$, $p < 0.0001$; CECs, $0.103\% \pm 0.048$, $p < 0.0001$; EcN, $0.316\% \pm 0.159$, $p = 0.0001$; EcNi, $0.106\% \pm 0.062$, $p < 0.0001$; EcNs, $0.233\% \pm 0.185$, $p < 0.0001$), the EcN group was the only one that showed a significant difference with groups Ct- ($p = 0.0038$), CEC ($p = 0.0297$), and CECi ($p = 0.0266$) (Fig. 5). Consumption of CEC and of its postbiotic fractions led to permeability values close to that of the control healthy group. Consumption of EcN only partially limited (5-FU-induced permeability increase).

3.5. *Escherichia coli* CEC15, as well as its postbiotic fractions, limited induction of gut inflammation

Neutrophil infiltrate, which is an important marker of the inflammatory process, was evaluated by monitoring myeloperoxidase enzyme activity (Fig. 6a). Myeloperoxidase activity was highly increased by 5-FU administration (Ct-, 0.36 ± 0.17 ; MUC, 1.14 ± 0.28 , $p < 0.0001$) and was only reduced in the groups treated with CEC (0.43 ± 0.12 , $p < 0.0001$), CECs (0.52 ± 0.24 , $p = 0.0003$), and EcNi (0.70 ± 0.29 , $p =$

0.0250), while the other groups did not differ from the MUC group (EcN, 1.25 ± 0.41 , $p = 0.9928$; EcNs, 0.82 ± 0.16 , $p = 0.2373$; CECi, 0.76 ± 0.28 , $p = 0.0748$) (Fig. 6a). 5-FU administration also induced the expression of the pro-inflammatory related genes *Il1b* ($p < 0.0001$), *Il17a* ($p = 0.0021$), and *Nfkb1* ($p = 0.0006$) compared to the control group (Ct-). Modulation of these markers was also observed after treatment with both strains and their postbiotic derivatives. We noticed a reduction of *Il1b* mRNA transcription only in group CECi ($p = 0.0246$) and EcNi ($p = 0.0239$) (Fig. 6b), while *Nfkb1* transcription was reduced in groups CEC ($p = 0.0471$), EcN ($p = 0.0009$) and EcNs ($p = 0.0006$) (Fig. 6d). Finally, a decrease of *Il17a* expression ($p = 0.0477$) was only detected in the CEC group when compared to MUC group (Fig. 6c). Among the tested fractions, inactivated CECi and EcNi were the most efficient at reducing *Il1b* induction, while live CEC was the most efficient regarding *Il17a* expression.

3.6. Escherichia coli CEC15, as well as its postbiotic fractions, modulated expression of proteins involved in gut barrier function

The expression of intestinal barrier genes (*Muc2*, *Tjp1*, *Cldn1*, and *Ocln*), which are closely related to intestinal mucosa integrity, was also evaluated. No significant variation in the expression of these genes was observed between the control group (Ct-) and the MUC group (Fig. 7). Despite of this, among the treatments, there was a higher transcription of *Muc2* gene in the CEC group compared to the groups MUC ($p < 0.0001$), EcN ($p < 0.0001$), EcNi ($p < 0.0001$) and EcNs ($p < 0.0001$) (Fig. 7a). The *Tjp1* gene was also overexpressed in the CEC group compared with the groups MUC ($p = 0.0294$), EcN ($p < 0.0001$), EcNi ($p = 0.0002$) and EcNs ($p = 0.0004$). Although there was no difference between CECi and MUC groups, the CECi treatment enhanced the *Tjp1* expression when compared to EcN ($p = 0.0095$) and EcNi ($p = 0.0433$) groups (Fig. 7b). The *Cldn1* gene transcript was enhanced in the CECi group when compared to the MUC ($p = 0.0023$), EcN ($p < 0.0001$), EcNi ($p = 0.0002$) and EcNs ($p = 0.0176$) groups (Fig. 7c). Finally, while all treatments with EcN and its derivatives downregulated *Ocln* expression, no difference in its transcription was observed between the Ct-, MUC, CEC, CECi, and CECs groups (Fig. 7d).

4. DISCUSSION

Probiotics are considered essential tools in modulating inflammatory and infectious intestinal diseases, as well as a promising therapeutic alternative to alleviate symptoms of 5-FU induced mucositis [24]. Nonetheless, questions have been raised related to the safety of administering live bacteria in immunocompromised individuals and there is a constant search for solutions to this issue. The number of studies regarding the use of postbiotics, inactivated microorganisms and/or their metabolites, as an alternative to probiotics in these cases have risen with promising results [24, 41–43].

In this study, we have evaluated the postbiotic activity of formulations, heat-inactivated bacteria, and cell-free supernatant, derived from the *E. coli* strains Nissle 1917 and CEC15, in a murine model of 5-FU-induced intestinal mucositis. Beneficial activity of the two probiotic strains has been already established

in vivo in various mouse models of inflammation [11, 14, 19, 44–46]. In particular, we previously compared the beneficial activity of both strains on 5-FU-induced intestinal mucositis in mice and showed the better protective effect of the CEC15 strain [20]. Here we confirmed these results, notably in showing the specific effect of CEC15, compared to EcN, in the prevention of animal weight loss, villous height reduction, goblet cell depletion, neutrophil infiltrate, intestinal permeability increases, and inflammatory related genetic markers.

Mucositis is a global inflammation in the GIT, giving rise to various symptoms such as bleeding, diarrhea, abdominal pain, fatigue, malnutrition, electrolyte imbalance, and infections. These symptoms can cause life-threatening complications of cancer chemotherapy [47–49]. The cytotoxic effects of 5-FU on epithelial cells of the GIT represent a major challenge for cancer treatment, as they impair the patient's ability to tolerate therapy, consequently reducing the quality of life and influencing treatment success [50]. The inflammation caused by 5-FU, which extends throughout the whole GIT, is highly associated with weight loss and reduced fluid and food intake. This weight loss can occur either by reduced consumption or by decreased ability to absorb nutrients [48]. As expected, the induction of intestinal mucositis with 5-FU reduced significantly the ingesta of food and liquid and, therefore, induced a considerable weight loss on mice. Here, none of the treatments was able to maintain food and liquid intake in face of 5-FU administration. This inability to attenuate the decrease of food and liquid intake has been reported for other probiotic species in this animal model, like *Lactobacillus delbrueckii* [51, 52], *Lactiplantibacillus plantarum* (formerly *Lactobacillus plantarum*) [21], and *Lacticaseibacillus rhamnosus* (formerly *Lactobacillus rhamnosus*) [42]. Among the four postbiotic formulations tested, only two, heat-inactivated CEC15 (CECi) and EcN cell-free supernatant (EcNs), were able to attenuate weight loss. Similar results were found after administration of heat-inactivated *L. delbrueckii* CIDCA133 were the weight loss reduced from 10–6.5% from the initial weight [41], and with administration of heat-inactivated *L. rhamnosus* CGMCC1.3724, reducing weight loss from 2.4 g to 1.7 g [42].

Looking further on the effects of 5-FU administration, changes in the architecture of the intestinal epithelium are one of the commonly seen in the inflammatory process promoted in the intestinal mucositis [48]. We observed that all postbiotic treatments could reduce the damage associated with the intestinal mucosa by maintaining the integrity of the brush border of enterocytes and reducing the reactivity of the submucosa. The structural damage caused by the administration of 5-FU led to changes in the height of intestinal villi, the deepening of the crypts, and the reduction of goblet cells, whose main function is the production of mucin, a key component of the protective intestinal mucus layer. These are parameters for assessing the severity of the damage associated with mucositis and are also associated with the signs mentioned above [31, 53]. As expected, we could see a reduction on villus height and crypts depth, and a depletion on the number of goblet cells after 5-FU administration. All postbiotic formulations derived from both strains were able to mitigate the reduction of villus height and depletion of goblet cells. As reported before, the effectiveness of live CEC15 was confirmed as well as the absence of protection from live EcN facing 5-FU administration, the results here presented consolidate the CEC15 effect, as well as the effect of its postbiotic preparations in the protection of intestinal epithelium structure, in special the inactivated CEC15. As for EcN preparations, cell-free supernatant presented promising results, as it

has already been demonstrated before [53] with the heat-inactivated form showing some level of protection in a lower extent.

The damage caused to the intestinal mucosa by 5-FU is associated with increased intestinal permeability. This last is associated with an increased risk of infection and transit of complex molecules, including toxins, through the epithelium and promotes intestinal bleeding and fluid and nutrient loss. All treatments were found to prevent increased intestinal permeability. Nevertheless, the permeability result is partially in accordance with the results on gene expression modulation of barrier related genes. The groups with the lowest protection against increased permeability (EcN and EcNs, also EcNi and CECs to a lesser extent) are also the ones with reduced expression of *Tjp1* and *Ocln* genes, highly associated with the integrity of intestinal barrier. CEC15 groups, in special the CEC and CECi ones, present the best results in both permeability and gene expression of barrier related genes with an over expression of *Muc2* and *Tjp1* on the CEC group and of *Cldn1* on the CECi group. These results express the important role of CEC15, live or inactivated, in the maintenance of intestinal barrier integrity, by elevating the expression of tight junction proteins and the production of mucus, maintaining barrier integrity, and reducing the transit of toxic compounds and microorganisms. Previous research has highlighted the enhancement of mucins and tight junction proteins following treatment with heat-inactivated probiotics and/or their respective supernatants. An illustrative example is the supernatant of mulberry leaf extract fermented by *L. acidophilus*, whose consumption induced upregulation of *Muc2* and *Muc5ac* gene expression in 5-FU-inflamed mice [54]. Additionally, the EcN-derived supernatant was found to mitigate the epithelial barrier disruption induced by enteropathogenic *E. coli*, in Caco-2 cells, by elevating the gene expression of tight junction proteins such as *Tjp1*, *Cldn14*, and *Cldn2* [55].

All preparations of both strains promoted a protective effect on the intestinal mucosa, reducing the damage associated with mucositis. The infiltration of neutrophils in tissue is associated with inflammation as these cells are recruited in response to tissue damage [56]. The enzyme myeloperoxidase is produced exclusively by neutrophils and serves as an indirect measure of the number of cells present in the tissue [52]. MPO enzyme activity in injured tissue was attenuated by all treatments with the CEC15-derived preparations, in contrast to what is observed with those derived from the EcN strain. Similar results were seen after administration of postbiotics preparations of *L. delbrueckii* CIDCA133 [41]. The lower levels of MPO indicates that the CEC15 preparations are more efficient than the EcN in limiting neutrophil recruitment into the intestinal epithelium.

Mucositis is associated with altered expression of pro- and anti-inflammatory cytokine genes. These changes generate greater activation of inflammatory pathways such as NFkB and TNF, loosening of the intestinal barrier, and weakening the protection of the epithelium through the modulation of genes such as *Il1b*, *Il17a*, *Nfkb1*, among others [24]. Here we have seen an elevation of the expression of these three genes after administration of 5-FU, we have also observed a protection against *Il1b* by treatment with CECi and EcNi, and of *Nfkb* after treatment with EcNs in addition to live CEC15 and EcN. Expression of *Il17a* was only reduced by administration of live CEC15. Other groups, like EcNi and EcNs, have shown a tendency for protection (no difference to the Ct- group), however they did not present statistical difference

from the MUC group. The increase on *Il1b* expression has been correlated to increase on permeability by degradation of the occludin mRNA *in vitro* and in a murine model [57] and it seems to be the case on treatments with EcN and its derivatives. The *Il17a* gene is known to be overexpressed in intestinal inflamed tissue [58], its overexpression, however, it is not the sole responsible for the inflammatory process and there have been studies showing *Il17* as an anti-inflammatory cytokine, depending on the co-expression of other cytokines such as *Il10* and *Inf-γ* [59–62].

It's important to emphasize that not all probiotics demonstrated anti-inflammatory effects in the context of 5-FU-induced epithelial damage [53, 63]. Despite sharing similar probiotic characteristics [64], the mechanisms involved in mitigating 5-FU-induced inflammation may vary among strains or species. This variability could be attributed to factors such as the probiotic dosage, the type of antineoplastic agents, the specific experimental protocols used to induce mucositis, and the form in which beneficial microorganisms are administered, extending to their postbiotic forms (i.e., live, inactivated, or their secreted products) as we have demonstrated in this study [24, 65–67].

5. CONCLUSION

The results so far demonstrate that the *E. coli* CEC15 strain can protect the intestinal epithelium from the deleterious effects of 5-FU, maintaining its integrity besides modulating the inflammatory response. The study shed light on the protective role of CEC15 in preserving intestinal barrier integrity, promoting the upregulation of tight junction proteins and of mucin. Additionally, the observed reduction in neutrophil infiltration and modulation of pro- and anti-inflammatory cytokine genes confirms the anti-inflammatory potential of this probiotic. This protective effect of CEC15 may be mediated by bacterial structures and/or secreted metabolites considering that postbiotic preparations of the strain promoted beneficial effects like those promoted by live bacteria. Such postbiotic fractions may be used with less risk to patients. By contrast, despite being a recognized probiotic bacterium and having proven efficacy in several models of inflammatory bowel disease, EcN demonstrated here no protective effects in the model of intestinal mucositis used here, confirming that probiotic effects may be highly strain dependent. Overall, this study contributes to the growing understanding of probiotics and postbiotics as potential therapeutic strategies in mitigating mucositis-associated intestinal damage. Future research should further explore and refine these approaches to optimize their therapeutic benefits.

Declarations

Ethics approval and consent to participate: The experiment was conducted in agreement with the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the “Use of Animals Ethics Committee” from UFMG (CEUA – UFMG) under the protocol 210/2022.

Availability of data and materials: Raw data can become available upon reasonable request to the corresponding author.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Funding: This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) from Brazil.

Authors' contributions: Conceptualization, RG, TdS and VA; methodology, RG, TdS, and VA; formal analysis, RG, TdS, TG, KV, EF; resources, SF, VC and VA; writing-original draft preparation, RG and TdS; writing-review and editing, RG, TdS, GJ, YIL, CC, PL, JC, EG and VA; supervision, GJ, EG and VA; funding acquisition, GJ, EG and VA. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgements: This work was conducted in the frame of BactInflam International Associated Laboratory between INRAE (France) and UFMG (Brazil).

References

1. Hill C, Guarner F, Reid G et al (2014) The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11:506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
2. Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M (2013) Probiotics: Properties, Examples, and Specific Applications. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a010074–a010074. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010074>
3. Sassone-Corsi M, Nuccio S-P, Liu H et al (2016) Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut. *Nature* 540:280–283. <https://doi.org/10.1038/nature20557>
4. Bär F, Von Koschitzky H, Roblick U et al (2009) Cell-free supernatants of *Escherichia coli* Nissle 1917 modulate human colonic motility: evidence from an *in vitro* organ bath study. *Neurogastroenterology & Motility* 21:559–e17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2008.01258.x>
5. Leatham MP, Banerjee S, Autieri SM et al (2009) Precolonized Human Commensal *Escherichia coli* Strains Serve as a Barrier to *E. coli* O157:H7 Growth in the Streptomycin-Treated Mouse Intestine. *Infect Immun* 77:2876–2886. <https://doi.org/10.1128/IAI.00059-09>
6. Reissbrodt R, Hammes WP, dal Bello F et al (2009) Inhibition of growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by nonpathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 290:62–69. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01405.x>
7. Rund SA, Rohde H, Sonnenborn U, Oelschlaeger TA (2013) Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104:H4 and O157:H7. *Int J Med Microbiol* 303:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.11.006>
8. Behrouzi A, Mazaheri H, Falsafi S et al (2020) Intestinal effect of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 and its OMV. *J Diabetes Metab Disord* 19:597–604. <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00511-6>

9. Chiang CJ, Chao YP, Ali A et al (2021) Probiotic *Escherichia coli* Nissle inhibits IL-6 and MAPK-mediated cardiac hypertrophy during STZ-induced diabetes in rats. *Benef Microbes* 12:283–293. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0094>
10. Faghihi AH, Agah S, Masoudi M et al (2015) Efficacy of Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in Patients with Irritable Bowel Syndrome: a Double Blind Placebo-controlled Randomized Trial. *Acta Med Indones* 47:201–208
11. Hare PJ, Englander HE, Mok WWK (2022) Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits bacterial persisters that survive fluoroquinolone treatment. *J Appl Microbiol* 132:4020–4032. <https://doi.org/10.1111/jam.15541>
12. Olbertz D, Proquitté H, Patzer L et al (2022) Potential Benefit of Probiotic *E. Coli* Nissle in Term Neonates. *Klin Padiatr*. <https://doi.org/10.1055/a-1970-4340>
13. Pradhan S, Weiss AA (2020) Probiotic Properties of *Escherichia coli* Nissle in Human Intestinal Organoids. <https://doi.org/10.1128/mBio.01470-20>. *mBio* 11:
14. Teng G, Liu Z, Liu Y et al (2022) Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Expressing Elafin Protects Against Inflammation and Restores the Gut Microbiota. *Front Microbiol* 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.819336>
15. Homburg S, Oswald E, Hacker J, Dobrindt U (2007) Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 275:255–262. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00889.x>
16. Olier M, Marcq I, Salvador-Cartier C et al (2012) Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes* 3:501–509. <https://doi.org/10.4161/gmic.21737>
17. Bereswill S, Fischer A, Dunay IR et al (2013) Pro-inflammatory potential of *Escherichia coli* strains K12 and Nissle 1917 in a murine model of acute ileitis. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 3:126–134. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.3.2013.2.6>
18. Tomas J, Reygnier J, Mayeur C et al (2015) Early colonizing *Escherichia coli* elicits remodeling of rat colonic epithelium shifting toward a new homeostatic state. *ISME J* 9:46–58. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.111>
19. Escibano-Vazquez U, Verstraeten S, Martin R et al (2019) The commensal *Escherichia coli* CEC15 reinforces intestinal defences in gnotobiotic mice and is protective in a chronic colitis mouse model. *Sci Rep* 9:11431. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47611-9>
20. da Silva TF, Glória RA, Sousa TJ, Guédon E (2023) Comprehensive Probiogenomics Analysis of the Commensal *Escherichia Coli* CEC15 as a Potential Probiotic Strain. PREPRINT (Version 1) available at Research Square 1:1–1
21. Coelho-Rocha ND, de Jesus LCL, Barroso FAL et al (2023) Evaluation of Probiotic Properties of Novel Brazilian *Lactiplantibacillus plantarum* Strains. *Probiotics Antimicrob Proteins* 15:160–174. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09978-6>

22. Cuevas-González PF, Liceaga AM, Aguilar-Toalá JE (2020) Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Res Int* 136:109502. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109502>
23. Aguilar-Toalá JE, Garcia-Varela R, Garcia HS et al (2018) Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends Food Sci Technol* 75:105–114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>
24. Batista VL, da Silva TF, de Jesus LCL et al (2020) Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis. *Front Microbiol* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.544490>
25. Salminen S, Collado MC, Endo A et al (2021) The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18:649–667. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>
26. Ma L, Tu H, Chen T (2023) Postbiotics in Human Health: A Narrative Review. *Nutrients* 15:291. <https://doi.org/10.3390/nu15020291>
27. Izuddin WI, Loh TC, Foo HL et al (2019) Postbiotic *L. plantarum* RG14 improves ruminal epithelium growth, immune status and upregulates the intestinal barrier function in post-weaning lambs. *Sci Rep* 9:9938. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46076-0>
28. Jensen GS, Benson KF, Carter SG, Endres JR (2010) GanedenBC30™ cell wall and metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects in vitro. *BMC Immunol* 11:15. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-15>
29. Nocerino R, Paparo L, Terrin G et al (2017) Cow's milk and rice fermented with *Lactobacillus paracasei* CBA L74 prevent infectious diseases in children: A randomized controlled trial. *Clin Nutr* 36:118–125. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.12.004>
30. Vandenas Y, de Halleux V, Arciszewska M et al (2020) A Partly Fermented Infant Formula with Postbiotics Including 3'-GL, Specific Oligosaccharides, 2'-FL, and Milk Fat Supports Adequate Growth, Is Safe and Well-Tolerated in Healthy Term Infants: A Double-Blind, Randomised, Controlled, Multi-Country Trial. *Nutrients* 12:3560. <https://doi.org/10.3390/nu12113560>
31. Howarth GS, Francis GL, Cool JC et al (1996) Milk Growth Factors Enriched from Cheese Whey Ameliorate Intestinal Damage by Methotrexate When Administered Orally to Rats. *J Nutr* 126:2519–2530. <https://doi.org/10.1093/jn/126.10.2519>
32. Mustachio LM, Roszik J, Farria AT et al (2019) Repression of GCN5 expression or activity attenuates c-MYC expression in non-small cell lung cancer. *Am J Cancer Res* 9:1830–1845
33. Eissa N, Hussein H, Wang H et al (2016) Stability of Reference Genes for Messenger RNA Quantification by Real-Time PCR in Mouse Dextran Sodium Sulfate Experimental Colitis. *PLoS ONE* 11:e0156289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156289>
34. Zheng L, Zhang Y-L, Dai Y-C et al (2017) Jianpi Qingchang decoction alleviates ulcerative colitis by inhibiting nuclear factor- κ B activation. *World J Gastroenterol* 23:1180. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i7.1180>

35. Stifter SA, Bhattacharyya N, Pillay R et al (2016) Functional Interplay between Type I and II Interferons Is Essential to Limit Influenza A Virus-Induced Tissue Inflammation. *PLoS Pathog* 12:e1005378. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005378>
36. Zhu J, Yang F, Sang L et al (2015) IL-33 Aggravates DSS-Induced Acute Colitis in Mouse Colon Lamina Propria by Enhancing Th2 Cell Responses. *Mediators Inflamm* 2015:1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/913041>
37. Volynets V, Rings A, Bárdos G et al (2016) Intestinal barrier analysis by assessment of mucins, tight junctions, and α -defensins in healthy C57BL/6J and BALB/cJ mice. *Tissue Barriers* 4:e1208468. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1208468>
38. Barroso FAL, de Jesus LCL, de Castro CP et al (2021) Intake of *Lactobacillus delbrueckii* (pExu:hsp65) Prevents the Inflammation and the Disorganization of the Intestinal Mucosa in a Mouse Model of Mucositis. *Microorganisms* 9:107. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010107>
39. Tsai H-C, Chang F-P, Li T-H et al (2019) Elafibranor Inhibits Chronic Kidney Disease Progression in NASH Mice. *Biomed Res Int* 2019:1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/6740616>
40. Volynets V, Reichold A, Bárdos G et al (2016) Assessment of the Intestinal Barrier with Five Different Permeability Tests in Healthy C57BL/6J and BALB/cJ Mice. *Dig Dis Sci* 61:737–746. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3935-y>
41. Batista VL, De Jesus LCL, Tavares LM et al (2022) Paraprobiotics and Postbiotics of *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 Mitigate 5-FU-Induced Intestinal Inflammation. *Microorganisms* 10:1418. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071418>
42. Trindade LM, Torres L, Matos ID et al (2023) Paraprobiotic *Lacticaseibacillus rhamnosus* Protects Intestinal Damage in an Experimental Murine Model of Mucositis. *Probiotics Antimicrob Proteins* 15:338–350. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09842-z>
43. Wang H, Jatmiko YD, Bastian SEP et al (2017) Effects of Supernatants from *Escherichia coli* Nissle 1917 and *Faecalibacterium prausnitzii* on Intestinal Epithelial Cells and a Rat Model of 5-Fluorouracil-Induced Mucositis. *Nutr Cancer* 69:307–318. <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1263747>
44. Zhao Z, Xu S, Zhang W et al (2022) Probiotic *Escherichia coli* NISSLE 1917 for inflammatory bowel disease applications. *Food Funct* 13:5914–5924. <https://doi.org/10.1039/D2FO00226D>
45. Ukena SN, Singh A, Dringenberg U et al (2007) Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Inhibits Leaky Gut by Enhancing Mucosal Integrity. *PLoS ONE* 2:e1308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001308>
46. Barbaro MR, Fuschi D, Cremon C et al (2018) *Escherichia coli* Nissle 1917 restores epithelial permeability alterations induced by irritable bowel syndrome mediators. *Neurogastroenterology & Motility* 30:e13388. <https://doi.org/10.1111/nmo.13388>
47. Touchefeu Y, Montassier E, Nieman K et al (2014) Systematic review: the role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis - current evidence and potential

- clinical applications. <https://doi.org/10.1111/apt.12878>. *Aliment Pharmacol Ther* n/a-n/a
48. Sonis ST (2004) The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer* 4:277–284.
<https://doi.org/10.1038/nrc1318>
 49. Kim S, Chun H, Choi H et al (2018) Ursodeoxycholic acid attenuates 5-fluorouracil-induced mucositis in a rat model. *Oncol Lett*. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8893>
 50. Jamali J, Dayo A, Adeel A et al (2018) A survey on gastrointestinal adverse drug reactions of Doxorubicin and Cyclophosphamide combination therapy. *J Pak Med Assoc* 68:926–928
 51. De Jesus LCL, Drumond MM, de Carvalho A et al (2019) Protective effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* CIDCA 133 in a model of 5-Fluorouracil-Induced intestinal mucositis. *J Funct Foods*.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.027>
 52. Barroso FAL, de Jesus LCL, da Silva TF et al (2022) *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 Ameliorates Chemotherapy-Induced Mucositis by Modulating Epithelial Barrier and TLR2/4/Myd88/NF- κ B Signaling Pathway. *Front Microbiol* 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.858036>
 53. Prisciandaro LD, Geier MS, Butler RN et al (2011) Probiotic factors partially improve parameters of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Cancer Biol Ther* 11:671–677.
<https://doi.org/10.4161/cbt.11.7.14896>
 54. Oh NS, Lee JMY, Lee JMY et al (2017) Mulberry leaf extract fermented with *Lactobacillus acidophilus* A4 ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Lett Appl Microbiol*.
<https://doi.org/10.1111/lam.12741>
 55. Alvarez C-S, Giménez R, Cañas M-A et al (2019) Extracellular vesicles and soluble factors secreted by *Escherichia coli* Nissle 1917 and ECOR63 protect against enteropathogenic *E. coli*-induced intestinal epithelial barrier dysfunction. *BMC Microbiol* 19:166. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1534-3>
 56. Wang J (2018) Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res* 371:531–539.
<https://doi.org/10.1007/s00441-017-2785-7>
 57. Rawat M, Nighot M, Al-Sadi R et al (2020) IL1B Increases Intestinal Tight Junction Permeability by Up-regulation of MIR200C-3p, Which Degrades Occludin mRNA. *Gastroenterology* 159:1375–1389.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.06.038>
 58. Seiderer J, Elben I, Diegelmann J et al (2008) Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): Upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 14:437–445.
<https://doi.org/10.1002/ibd.20339>
 59. O'Connor W Jr, Kamanaka M, Booth CJ et al (2009) A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* 10:603–609. <https://doi.org/10.1038/ni.1736>
 60. Sarra M, Pallone F, MacDonald TT, Monteleone G (2010) IL-23/IL-17 axis in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 16:1808–1813. <https://doi.org/10.1002/ibd.21248>
 61. Leppkes M, Becker C, Ivanov II et al (2009) ROR γ -Expressing Th17 Cells Induce Murine Chronic Intestinal Inflammation via Redundant Effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* 136:257–267.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.018>

62. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y (2008) The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity* 28:454–467. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.004>
63. Maioli TU, de Melo Silva B, Dias MN et al (2014) Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. *J Negat Results Biomed* 13:6. <https://doi.org/10.1186/1477-5751-13-6>
64. Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A (2019) Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv Nutr* 10:S49–S66. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>
65. Chang C-T, Ho T-Y, Lin H et al (2012) 5-Fluorouracil Induced Intestinal Mucositis via Nuclear Factor- κ B Activation by Transcriptomic Analysis and In Vivo Bioluminescence Imaging. *PLoS ONE* 7:e31808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031808>
66. Yeung CY, Chan WT, Jiang C, Bin et al (2015) Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138746>
67. Wu Y, Wu J, Lin Z et al (2021) Administration of a Probiotic Mixture Ameliorates Cisplatin-Induced Mucositis and Pica by Regulating 5-HT in Rats. *J Immunol Res* 2021:1–16. <https://doi.org/10.1155/2021/9321196>

Figures

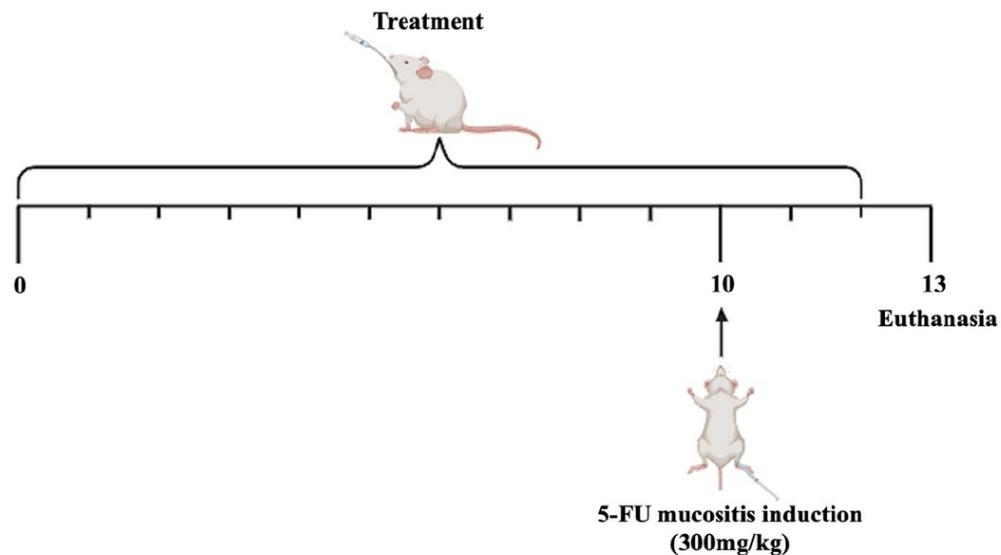


Figure 1

Experimental design. The experimental groups received doses of live, heat-inactivated *E. coli* Nissle 1917 or CEC15 or cell-free culture supernatant for 12 days. On the 10th day of experimentation, the animals received 300 mg/kg of 5-FU (or PBS) intraperitoneally and were euthanized after 72 hours.

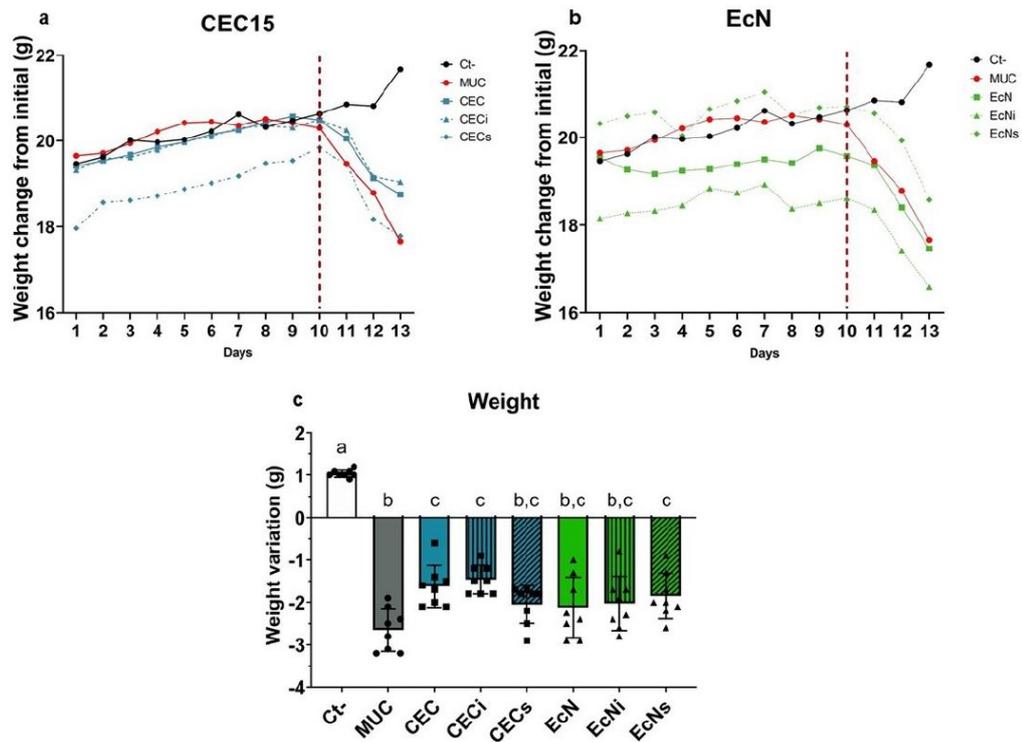


Figure 2

Treatment and 5-FU-induced weight modulation. (a) CEC15 groups weight variation during 10 days of treatment and 3 days after 5-FU-induction of mucositis. (b) EcN groups weight variation during 10 days of treatment and 3 days after 5-FU-induction of mucositis. The dotted red line indicated the date of mucositis induction. (c) Weight change after mucositis induction by administering 5-FU. Statistical analysis was performed by 2-way ANOVA followed by a post-test of Tukey. Different letters indicated significant differences.

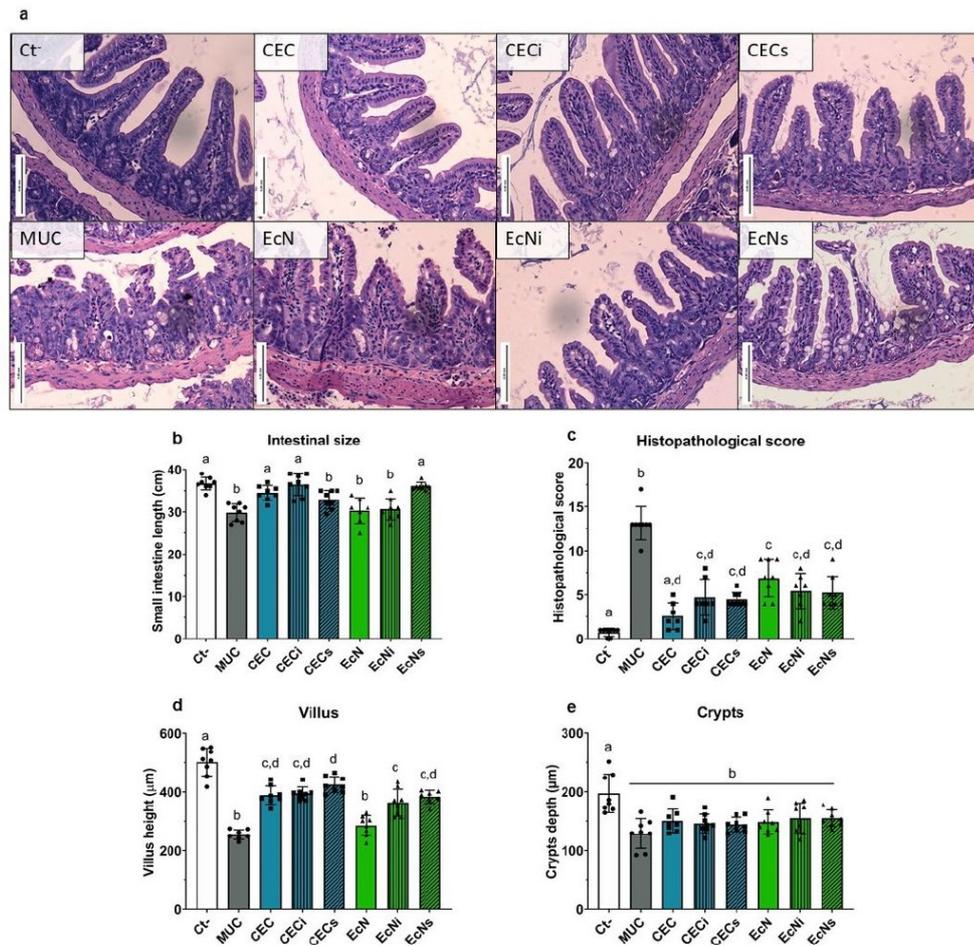


Figure 3

Modulation of macro and microscopic aspects of 5-FU-induced intestinal mucositis. (a) Histology of the ileal portion of the intestine stained in HE. (b) Modulation of intestinal length. (c) Histological score of the ileal portion. (d) Height of intestinal villus. (e) Depth of intestinal crypts. Villus height and crypt depth measurements were performed using ImageJ 1.51j.8 software (NIH, Bethesda, MD, United States). Statistical analysis was performed by 2-way ANOVA followed by a post-test of Tukey. Different letters indicated significant differences.

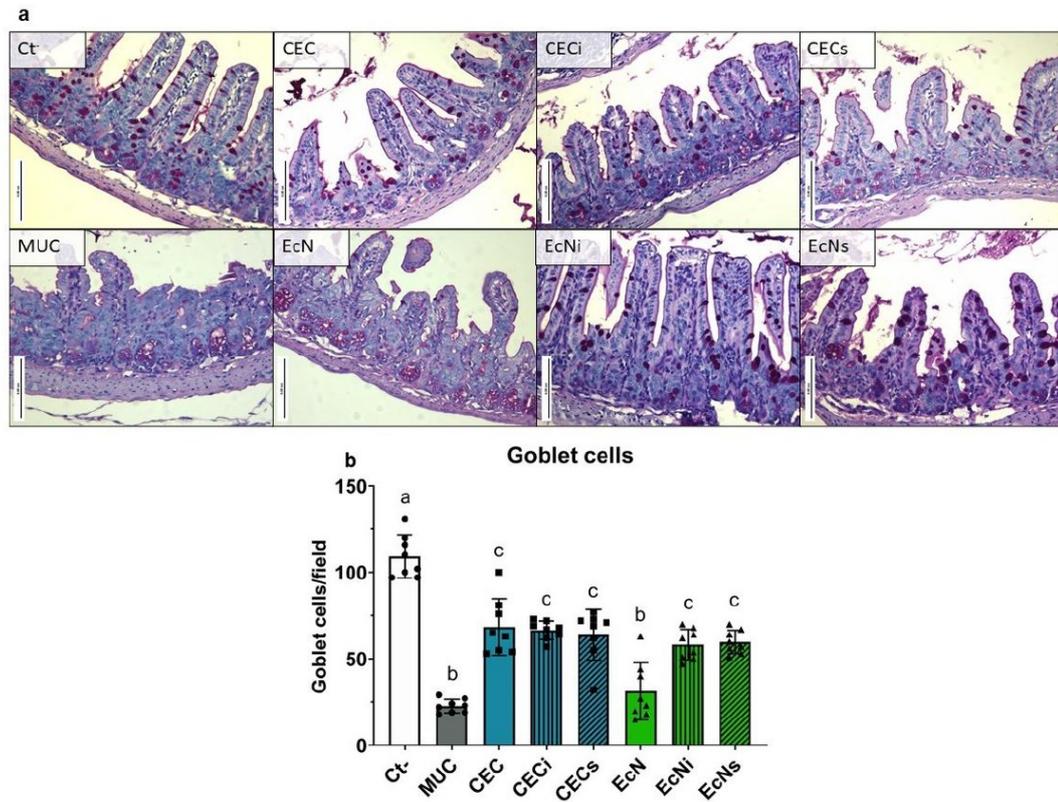


Figure 4

Goblet cell counting. (a) Histology of the iliac portion of the intestine stained in PA. (b) Goblet cell count per field. Statistical analysis was performed by 2-way ANOVA followed by a post-test of Tukey. Different letters indicated significant differences.

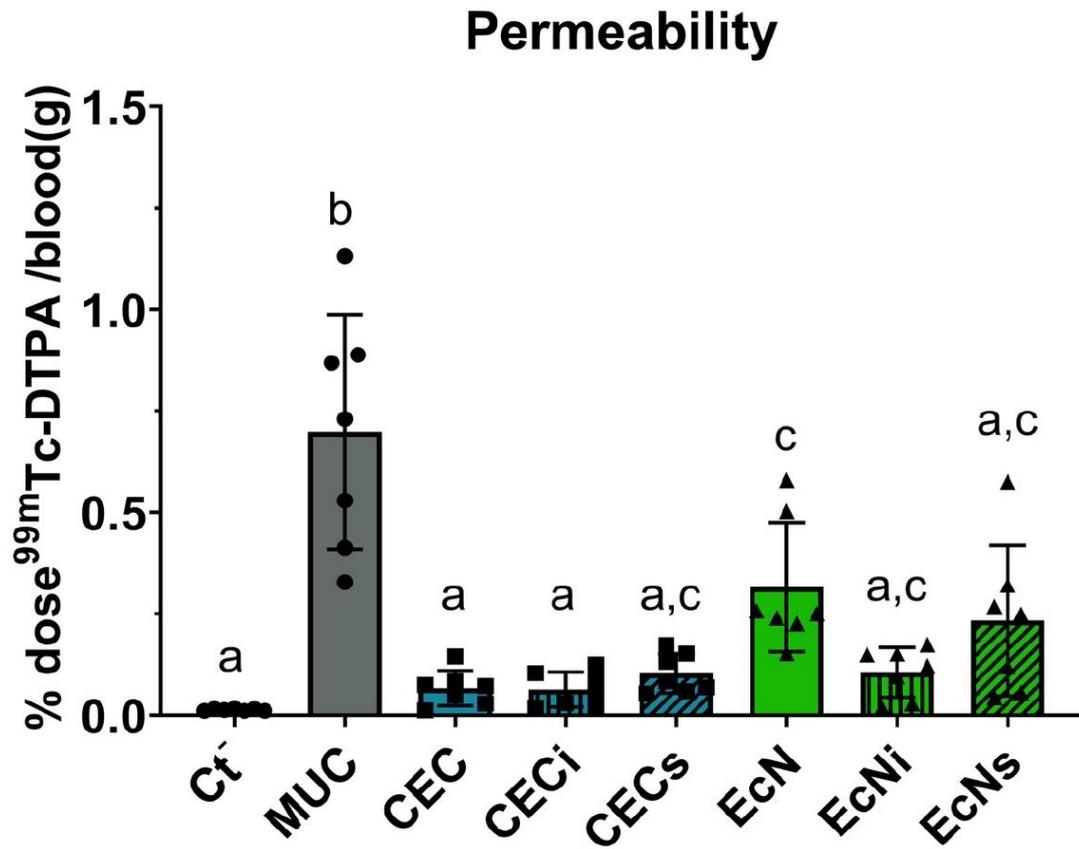


Figure 5

Intestinal permeability. Serum $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ dosage. Statistical analysis was performed by 2-way ANOVA followed by a post-test of Tukey. Different letters indicated significant differences.

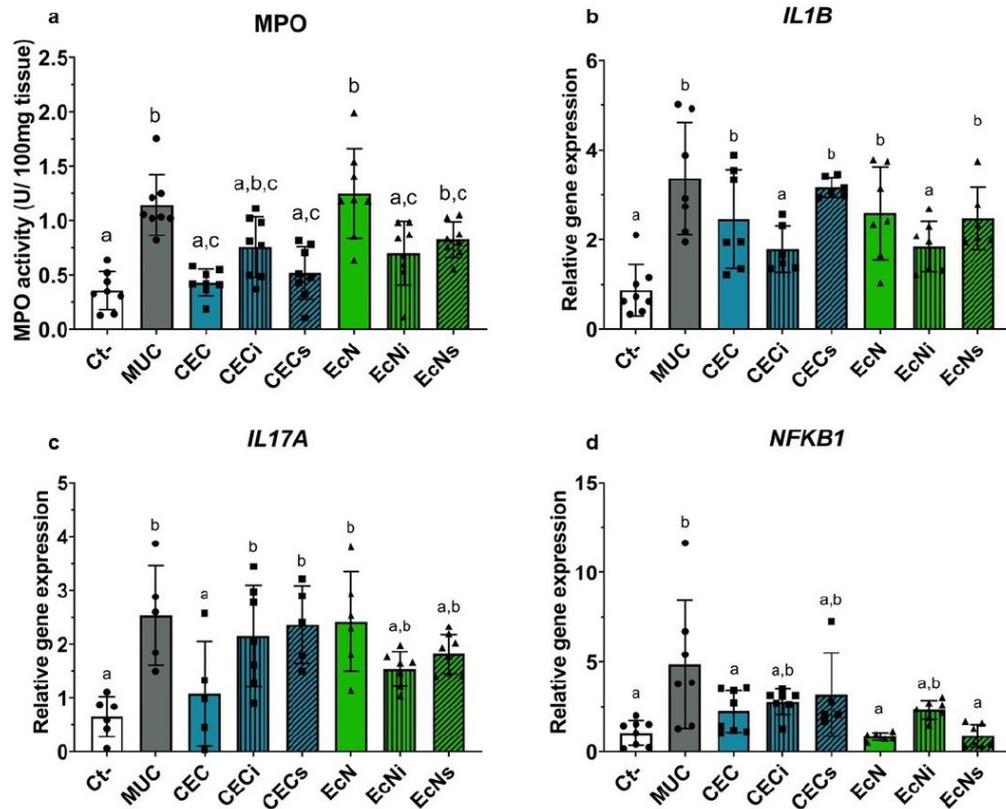


Figure 6

Modulation of inflammation by regulation of MPO activity and pro-inflammatory gene expression by CEC15, EcN, and their derivatives. MPO activity (a) and relative expression level of (b) *Il1b*, (c) *Il17a*, and (d) *Nfkb1* genes in all treated groups versus the Ct- control group. Statistical analysis was performed by 2-way ANOVA followed by a post-test of Tukey. Different letters indicated significant differences.

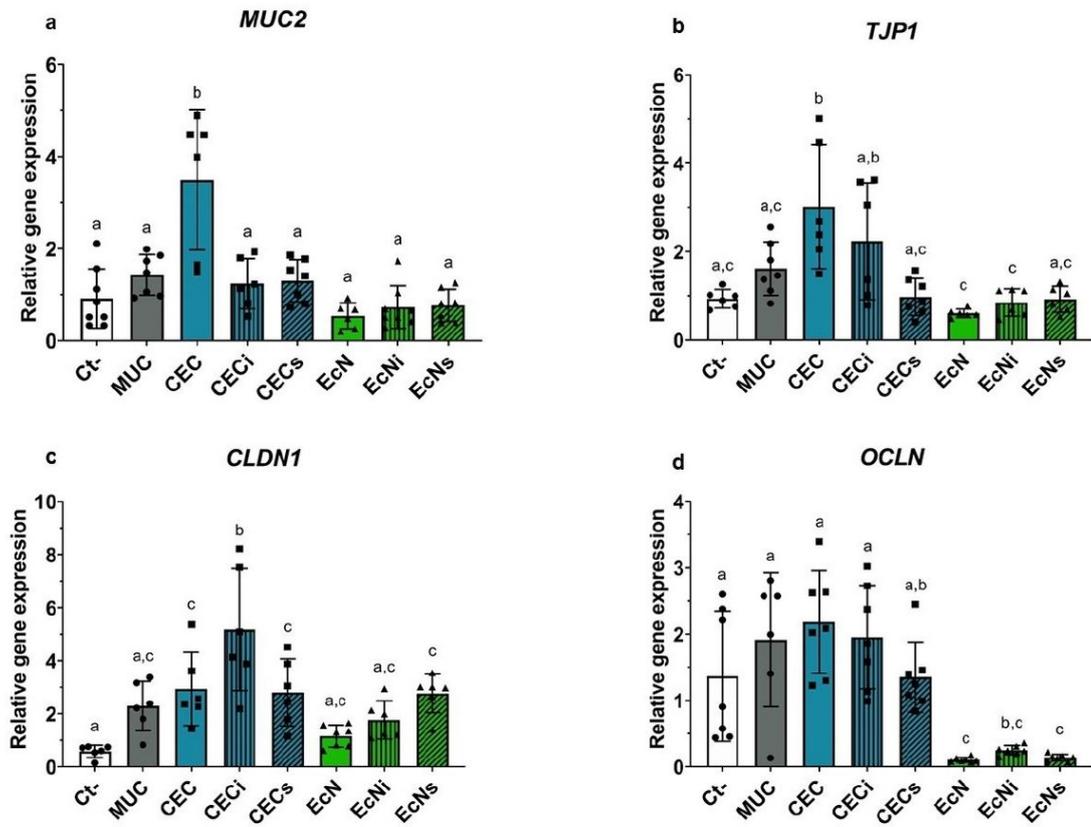


Figure 7

Modulation of barrier gene expression by CEC15, EcN and their derivatives. Relative expression level of (a) *Muc2*, (b) *Tjp1*, (c) *Cldn1*, and (d) *Ocln* genes in all treated groups versus the Ct- (control group). Statistical analysis was performed by 2-way ANOVA followed by a post-test of Tukey. Different letters indicated significant differences.

4. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

A mucosite intestinal é um dos principais efeitos adversos causados por antimetabólitos, como o 5-FU, no TGI dos pacientes em quimioterapia (LEE, 2014; PHILLIPS et al., 2018). Esta condição resulta em danos à mucosa intestinal, provocando redução das vilosidades, aprofundamento e destruição de criptas e intensa reação inflamatória com consequente ulceração (BASILE et al., 2019; DUNCAN; GRANT, 2003; HAMOUDA et al., 2017), que comprometem a função de barreira intestinal. A mucosite também pode levar a uma disbiose já que ocorre efeito deletério da microbiota e também o rompimento das junções firmes, além de provocar sintomas sistêmicos ao organismo como perda de peso, redução do consumo hídrico e alimentar, redução do comprimento intestinal e presença de infiltrado inflamatório no epitélio intestinal (CARVALHO et al., 2017; FERREIRA et al., 2012; LI et al., 2017; YEUNG et al., 2015).

Encontrar alternativas terapêuticas para prevenir, reduzir ou até mesmo tratar os danos à mucosa intestinal causados por quimioterápicos, torna-se de fundamental importância durante o tratamento de neoplasias. O uso de probióticos e posbióticos têm sido utilizados como terapias eficazes para o tratamento das desordens inflamatórias intestinais. Estudos demonstram que eles conseguem aumentar a integridade da mucosa intestinal, preservar a altura das vilosidades, aumentar a produção e liberação de mucinas e consequentemente melhorar a composição do biofilme que recobre a mucosa, demonstrando assim o grande potencial desses microrganismos para diminuir os danos à mucosa e consequentemente melhorar possíveis infecções intestinais. Similar aos efeitos promovidos pelos probióticos, temos vistos que os mesmos organismos em suas formas inativadas, fragmentos celulares, e até mesmo os metabólitos produzidos por esses microrganismos, apresentam efeitos benéficos quando administrados em quantidades adequadas. Essas preparações inativadas (posbióticos) possuem diversas vantagens sobre a bactéria viva, como maior tempo de prateleira, menor risco de infecções e transmissão de genes de resistência, entre outras.

Neste trabalho apresentado, foram avaliados os efeitos posbióticos de duas linhagens de *Escherichia coli* (CEC15 e Nissle 1917) inativadas pelo calor e seus metabólitos produzidos na forma de sobrenadante em um modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU. Os tratamentos com as preparações posbióticas foram comparados com o tratamento utilizando as respectivas linhagens vivas. A mucosite induzida por 5-FU resultou em perda de peso e redução na ingestão de alimentos e líquidos. A perda de peso, bem como a redução na ingestão de líquidos e alimentos acontece devido aos danos causados à mucosa que cobre toda a extensão

do trato gastrointestinal. A inflamação aguda causada pelo 5-FU provoca fortes dores, o que inibe o consumo normal de líquidos e sólidos, essa menor ingestão calórica, sua vez, leva a perda de peso (EDUARDO et al., 2018; SOARES et al., 2008). Outra característica associada com a perda de peso é a destruição das células intestinais, levando a uma redução no comprimento intestinal e, conseqüentemente, reduzida absorção de nutrientes (DE BARROS et al., 2018; KATO et al., 2017). Nenhum dos tratamentos conseguiu evitar totalmente a redução no consumo e a perda de peso. No entanto, tratamentos com a linhagem CEC15 viva e inativada pelo calor apresentou resultados melhores na atenuação da perda de peso em comparação com as linhagens de EcN, no qual apenas o sobrenadante livre de células de EcN apresentou atenuação da perda de peso. O mesmo resultado já havia sido observado anteriormente para o tratamento com as linhagens vivas (EU), com redução da perda de peso pela CEC15 e nenhum efeito com a administração de EcN.

Trabalhos similares, utilizando espécies diferentes de probióticos em modelo murino de mucosite intestinal por 5-FU demonstraram a incapacidade desses organismos de inibir completamente a perda de peso. Um estudo utilizando uma mistura de quatro probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, e *Bifidobacterium lactis*) mostrou uma redução de 20% na perda de peso causada pelo 5-FU, o mesmo, no entanto, não ocorreu quando apenas duas dessas linhagens foram administradas (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*) (QUARESMA et al., 2020). The probiotic mixture DM#1 (*B. breve* DM8310, *L. acidophilus* DM8302, *L. casei* DM8121, and *S. thermophilus* DM8309) também apresentou redução de aproximadamente 20% da perda de peso causada pelo 5-FU em ratos (TANG et al., 2017). *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 por sua vez reduziu a perda de peso em menos de 10% (BARROSO et al., 2022), o tratamento com sua forma inativada pelo calor, por sua vez, foi capaz de reduzir a perda em 30% (BATISTA et al., 2022). Isso sugere que o dano causado pelo 5-FU é tão agudo de modo que os tratamentos, seja com probióticos ou posbióticos não sejam capazes de proteger o indivíduo completamente. O presente trabalho mostra, no entanto, que após 72h da administração do 5-FU é visível uma estabilização da perda de peso, sugerindo que a continuação tratamento com CEC15 viva ou inativada pelo calor pode levar a uma restauração completa do peso do indivíduo.

Como mencionado acima, o tratamento com 5-FU leva a um dano severo no tecido epitelial intestinal, sendo claramente observado nas imagens histológicas aqui apresentadas e no resultado do escore histopatológico utilizado. Todos os tratamentos testados foram capazes de proteger a integridade da mucosa intestinal em algum nível, reduzindo os danos associados

à mucosite. Isso incluiu a manutenção da estrutura das vilosidades intestinais, criptas e células caliciformes, que são vitais para a absorção de nutrientes e produção de muco (DUNCAN; GRANT, 2003; LEE, 2014; SOARES et al., 2013). Essa proteção, no entanto, foi muito mais expressiva nos animais tratados com CEC15 viva e menos expressiva no tratamento com EcN viva, não havendo diferença entre os tratamentos com as preparações posbióticas. A preservação da estrutura das vilosidades também foi mais expressiva nos tratamentos com CEC15, resultado também observado na manutenção do número de células caliciformes. Além disso, todos os tratamentos, com exceção da EcN viva, impediram o aumento da permeabilidade intestinal, com os tratamentos utilizando CEC15 e seus posbióticos apresentando os melhores resultados. A proteção contra o aumento da permeabilidade corrobora com os resultados de expressão genica aqui apresentados dos genes *Muc2*, *Tjp1*, *Cldn1* e *Ocln*, os quais tiveram sua expressão aumentada nos grupos tratados com CEC15 viva ou seus posbióticos. Essa correlação entre genes de barreira e permeabilidade intestinal foi demonstrada anteriormente em diversos estudos utilizando diferentes espécies de probióticos e posbióticos (BASTOS et al., 2016; BATISTA et al., 2022; JUSTINO et al., 2014).

O processo inflamatório causado pelo 5-FU é agravado pela infiltração de neutrófilos (DUNCAN; GRANT, 2003). Nesse estudo, essa infiltração foi avaliada por meio da atividade da enzima mieloperoxidase, a qual foi reduzida pelos tratamentos com CEC15, enquanto o EcN não teve o mesmo efeito. Os resultados de expressão gênica, na qual foi avaliada a modulação de genes pro-inflamatórios, não estão diretamente associados com os níveis de atividade da mieloperoxidase. Alterações foram observadas após a administração de 5-FU, com alguns tratamentos demonstrando efeitos protetores contra essas alterações, em especial CEC15 e EcN inativadas. É importante observar que nem todos os probióticos demonstraram efeitos anti-inflamatórios nos danos induzidos pelo 5-FU e a eficácia pode variar dependendo de fatores como dosagem, tipo de quimioterapia, protocolos experimentais específicos e a forma de administração dos micro-organismos benéficos.

Apesar de muito promissores, as preparações posbióticas de CEC15 e EcN ainda demandam uma variedade de estudos para que se possa comprovar seus efeitos benéficos em diferentes dosagens e condições inflamatórias, além de realizar testes para avaliar a segurança em sua administração. Estudos clínicos em humanos também são essenciais para que essas preparações possam ser utilizadas no futuro. Finalmente, a produção dessas preparações em forma de um produto comercial deve ser estudada visando garantir estabilidade dos produtos e manutenção da atividade benéfica. Desse modo, trabalhos futuros contribuiriam para a contínua descoberta de terapias alternativas para os danos intestinais induzidos pela quimioterapia afim

de esclarecer os mecanismos pelos quais as bactérias probióticas e suas preparações posbióticas promovem seus efeitos imunomoduladores e protetores sobre a mucosa do TGI.

5. CONCLUSÃO

A literatura científica demonstra que algumas linhagens de bactérias Gram-negativas exercem atividade probiótica, seja em humanos ou em animais. E não somente os microrganismos vivos, bactérias inativadas e seus metabólitos também têm efeito sobre a saúde do hospedeiro. Nesse aspecto, a linhagem *E. coli* CEC15 apresentou um potencial benéfico no modelo murino de mucosite ao proteger o epitélio intestinal dos efeitos prejudiciais do 5-FU, mantendo sua integridade e ainda apresentou a capacidade de modular a resposta inflamatória. O estudo lança luz sobre o papel da CEC15, como posbiótico, na preservação da integridade da barreira intestinal, promovendo o aumento na expressão de proteínas de junções firmes e na produção de muco. Além disso, a redução observada na infiltração de neutrófilos e a modulação dos genes de citocinas pró e anti-inflamatórias sugerem os potenciais efeitos anti-inflamatórios desses tratamentos. Esse efeito protetor do CEC15 pode estar associado a estruturas celulares e/ou metabólitos secretados, uma vez que ambas as preparações posbiótica e filtrado de sobrenadantes promoveram efeitos benéficos nos hospedeiros tratados, semelhantes aos promovidos pelas bactérias vivas. Esses resultados também sugerem que as bactérias não precisam necessariamente ser vivas para promover seu efeito benéfico e podem ser usadas com menos risco para os pacientes.

Por outro lado, observamos aqui que, apesar de ser uma bactéria probiótica reconhecida e ter eficácia comprovada em diversos modelos de doença inflamatória intestinal, o EcN não apresenta resultados promissores no modelo de mucosite intestinal usado neste estudo, demonstrando mais uma limitação no uso dessa linhagem. No entanto, é crucial reconhecer a diversidade nas respostas aos probióticos, destacando a necessidade de abordagens personalizadas com base na linhagem, dose e forma de administração, levando em consideração as especificidades do contexto da mucosite.

Em resumo, este estudo contribui para o crescente entendimento dos probióticos e posbióticos como estratégias terapêuticas potenciais na atenuação dos danos intestinais associados à mucosite. Pesquisas futuras devem continuar explorando e aprimorando essas abordagens para otimizar seus benefícios terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- ACURCIO, L. B. et al. Milk fermented by *Lactobacillus* species from Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice against *Salmonella* Typhimurium infection. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 4, p. 579–588, 24 ago. 2017.
- ADAM, E. et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 activates DC and prevents house dust mite allergy through a TLR4-dependent pathway. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 7, p. 1995–2005, jul. 2010.
- ADARE BIOME. **About postbiotics**. Disponível em: <<https://www.about-postbiotics.com/en/about-postbiotics/>>. Acesso em: 31 ago. 2023.
- AGUILAR-TOALÁ, J. E. et al. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. **Trends in Food Science & Technology**, v. 75, p. 105–114, maio 2018.
- ALAKOMI, H.-L. et al. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2001–2005, maio 2000.
- ALGIERI, F. et al. Intestinal anti-inflammatory effects of probiotics in DNBS-colitis via modulation of gut microbiota and microRNAs. **European Journal of Nutrition**, v. 60, n. 5, p. 2537–2551, 20 ago. 2021.
- ALIAKBARPOUR, H. R. et al. The *Bacillus subtilis* and Lactic Acid Bacteria Probiotics Influences Intestinal Mucin Gene Expression, Histomorphology and Growth Performance in Broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 9, p. 1285–1293, 22 ago. 2012.
- ARTHUR, J. C. et al. Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. **Science**, v. 338, n. 6103, p. 120–123, 5 out. 2012.
- AZAD, MD. A. K. et al. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–8, 2018.
- BARROSO, F. A. L. et al. *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 Ameliorates Chemotherapy-Induced Mucositis by Modulating Epithelial Barrier and TLR2/4/Myd88/NF-κB Signaling Pathway. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 26 abr. 2022.
- BASILE, D. et al. Mucosal Injury during Anti-Cancer Treatment: From Pathobiology to Bedside. **Cancers**, v. 11, n. 6, p. 857, 20 jun. 2019.
- BASTOS, R. W. et al. *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 treatment reduces intestinal damage in a murine model of irinotecan-induced mucositis. **Beneficial Microbes**, v. 7, n. 4, p. 549–557, set. 2016.
- BATISTA, V. L. et al. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 17 set. 2020.
- BATISTA, V. L. et al. Paraprobiotics and Postbiotics of *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 Mitigate 5-FU-Induced Intestinal Inflammation. **Microorganisms**, v. 10, n. 7, p. 1418, 14 jul. 2022.

- BEHNSEN, J. et al. Probiotics: Properties, Examples, and Specific Applications. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 3, p. a010074–a010074, 1 mar. 2013.
- BLACKWOOD, B. P. et al. Probiotic *Lactobacillus* Species Strengthen Intestinal Barrier Function and Tight Junction Integrity in Experimental Necrotizing Enterocolitis. **Journal of Probiotics & Health**, v. 05, n. 01, 2017.
- CARVALHO, R. D. D. O. et al. Use of Wild Type or Recombinant Lactic Acid Bacteria as an Alternative Treatment for Gastrointestinal Inflammatory Diseases: A Focus on Inflammatory Bowel Diseases and Mucositis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 9 maio 2017.
- CASSIDY, S.; SYED, B. A. Colorectal cancer drugs market. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 8, p. 525–526, 19 ago. 2017.
- CASTILHO, N. P. A. et al. *Lactobacillus curvatus* UFV-NPAC1 and other lactic acid bacteria isolated from calabresa, a fermented meat product, present high bacteriocinogenic activity against *Listeria monocytogenes*. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 63, 20 dez. 2019.
- CHANG, C. W. et al. *Lactobacillus casei* Variety rhamnosus probiotic preventively attenuates 5-Fluorouracil/Oxaliplatin-induced intestinal injury in a syngeneic colorectal cancer model. **Frontiers in Microbiology**, 2018.
- CHANG, C.-J. et al. Next generation probiotics in disease amelioration. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, n. 3, p. 615–622, jul. 2019.
- CHIANG, C. J. et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle inhibits IL-6 and MAPK-mediated cardiac hypertrophy during STZ-induced diabetes in rats. **Beneficial Microbes**, v. 12, n. 3, p. 283–293, 15 jun. 2021.
- CINAUSERO, M. et al. New Frontiers in the Pathobiology and Treatment of Cancer Regimen-Related Mucosal Injury. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 8 jun. 2017.
- COLLADO, M. et al. The Impact of Probiotic on Gut Health. **Current Drug Metabolism**, v. 10, n. 1, p. 68–78, 1 jan. 2009.
- COUGNOUX, A. et al. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. **Gut**, v. 63, n. 12, p. 1932–1942, dez. 2014.
- CRISTOFORI, F. et al. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 26 fev. 2021.
- CUEVAS-GONZÁLEZ, P. F.; LICEAGA, A. M.; AGUILAR-TOALÁ, J. E. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. **Food Research International**, v. 136, p. 109502, out. 2020.
- CURSINO, L. et al. Exoproducts of the *Escherichia coli* strain H22 inhibiting some enteric pathogens both in vitro and in vivo. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 4, p. 821–829, abr. 2006.
- DA SILVA, T. F. et al. Comprehensive probiogenomics analysis of the commensal *Escherichia coli* CEC15 as a potential probiotic strain. **BMC Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 364, 27 nov. 2023.

- DALMASSO, G. et al. The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment. **Gut Microbes**, v. 5, n. 5, p. 675–680, 3 set. 2014.
- DE ALMADA, C. N. et al. Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 58, p. 96–114, dez. 2016.
- 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, p. 1567–1576, jul. 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**, 2019.
- DE KEERSMAECKER, S. C. J. et al. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, n. 1, p. 89–96, jun. 2006.
- DERIU, E. et al. Probiotic Bacteria Reduce *Salmonella* Typhimurium Intestinal Colonization by Competing for Iron. **Cell Host & Microbe**, v. 14, n. 1, p. 26–37, jul. 2013.
- DO CARMO, F. L. R. et al. *Propionibacterium freudenreichii* Surface Protein SlpB Is Involved in Adhesion to Intestinal HT-29 Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 8 jun. 2017.
- DO CARMO, F. L. R. et al. Probiotic *Propionibacterium freudenreichii* requires SlpB protein to mitigate mucositis induced by chemotherapy. **Oncotarget**, v. 10, n. 68, p. 7198–7219, 31 dez. 2019.
- DORON, S.; SNYDMAN, D. R. Risk and Safety of Probiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. suppl_2, p. S129–S134, 15 maio 2015.
- DUBBERT, S. et al. No genotoxicity is detectable for *Escherichia coli* strain Nissle 1917 by standard in vitro and in vivo tests. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 10, n. 1, p. 11–19, mar. 2020.
- DUNCAN, M.; GRANT, G. Oral and intestinal mucositis - Causes and possible treatments. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, 2003.
- DURANTI, S. et al. Bifidobacterium adolescentis as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 14112, 24 ago. 2020.
- DYNTEC. **Colinfant New Born**. Disponível em: <<https://dyntec.cz/en/product/colinfant-new-born-en/>>. Acesso em: 16 ago. 2023.
- 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, 17 fev. 2018.
- ENCK, P. et al. Randomized Controlled Treatment Trial of Irritable Bowel Syndrome with a Probiotic E.-coli Preparation (DSM17252) Compared to Placebo. **Zeitschrift für Gastroenterologie**, v. 47, n. 02, p. 209–214, 5 fev. 2009.

- ESCRIBANO-VAZQUEZ, U. et al. The commensal *Escherichia coli* CEC15 reinforces intestinal defenses in gnotobiotic mice and is protective in a chronic colitis mouse model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 11431, 7 dez. 2019.
- FANG, S.-B. et al. Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG upregulate gene expression of pro-inflammatory cytokines in 5-fluorouracil-pretreated Caco-2 cells. **Supportive Care in Cancer**, v. 22, n. 6, p. 1647–1654, 6 jun. 2014.
- FEDORAK, R. N. et al. The Probiotic VSL#3 Has Anti-inflammatory Effects and Could Reduce Endoscopic Recurrence After Surgery for Crohn's Disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 5, p. 928- 935.e2, maio 2015.
- 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, 31 jul. 2012.
- FOLIGNÉ, B.; DANIEL, C.; POT, B. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 284–292, jun. 2013.
- GAO, K. et al. Immunomodulation and signaling mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* GG and its components on porcine intestinal epithelial cells stimulated by lipopolysaccharide. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 50, n. 5, p. 700–713, out. 2017.
- GENEROSO, S. V. et al. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. **European Journal of Nutrition**, v. 50, n. 4, p. 261–269, 10 jun. 2011.
- GUICHARD, N. et al. Antineoplastic drugs and their analysis: a state-of-the-art review. **The Analyst**, v. 142, n. 13, p. 2273–2321, 2017.
- GUO, S. et al. *Escherichia coli* Nissle 1917 Protects Intestinal Barrier Function by Inhibiting NF- κ B-Mediated Activation of the MLCK-P-MLC Signaling Pathway. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, p. 1–13, 3 jul. 2019.
- HAFEZ, M. et al. The K5 Capsule of *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 Is Important in Mediating Interactions with Intestinal Epithelial Cells and Chemokine Induction. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 7, p. 2995–3003, jul. 2009.
- HALDER, D. et al. Indigenous Probiotic *Lactobacillus* Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria. **Biomedicines**, v. 5, n. 4, p. 31, 16 jun. 2017.
- HAMOUDA, N. et al. Apoptosis, Dysbiosis and Expression of Inflammatory Cytokines are Sequential Events in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 121, n. 3, p. 159–168, set. 2017.
- HENKER, J. et al. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. **European Journal of Pediatrics**, v. 166, n. 4, p. 311–318, 8 abr. 2007.
- HERBERS, A. H. E. et al. Impact of palifermin on intestinal mucositis of HSCT recipients after BEAM. **Bone Marrow Transplantation**, v. 49, n. 1, p. 8–10, 19 jan. 2014.

- 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, 10 ago. 2014.
- HSIEH, M.-C. et al. The beneficial effects of *Lactobacillus reuteri* ADR-1 or ADR-3 consumption on type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16791, 14 nov. 2018.
- IFTEKHAR, A. et al. Genomic aberrations after short-term exposure to colibactin-producing *E. coli* transform primary colon epithelial cells. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1003, 12 fev. 2021.
- IZUDDIN, W. I. et al. Postbiotic *L. plantarum* RG14 improves ruminal epithelium growth, immune status and upregulates the intestinal barrier function in post-weaning lambs. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9938, 9 jul. 2019.
- JENSEN, G. S. et al. GanedenBC30™ cell wall and metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects in vitro. **BMC Immunology**, v. 11, n. 1, p. 15, 24 dez. 2010.
- 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**, 2014.
- KACI, G. et al. Inhibition of the NF- κ B Pathway in Human Intestinal Epithelial Cells by Commensal *Streptococcus salivarius*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4681–4684, jul. 2011.
- 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**, 2017.
- KIM, S. et al. Ursodeoxycholic acid attenuates 5-fluorouracil-induced mucositis in a rat model. **Oncology Letters**, 4 jun. 2018.
- KLETA, S. et al. Role of F1C Fimbriae, Flagella, and Secreted Bacterial Components in the Inhibitory Effect of Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on Atypical Enteropathogenic *E. coli* Infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 5, p. 1801–1812, maio 2014.
- KOCIJANCIC, D. et al. Therapy of solid tumors using probiotic Symbioflor-2 - restraints and potential. **Oncotarget**, v. 7, n. 16, p. 22605–22622, 19 abr. 2016.
- KOCOURKOVÁ, I. et al. Effect of oral application of a probiotic *E. coli* strain on the intestinal microflora of children of allergic mothers during the first year of life. **Folia Microbiologica**, v. 52, n. 2, p. 189–193, mar. 2007.
- KOTHARI, D.; PATEL, S.; KIM, S.-K. Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 537–547, mar. 2019.
- KRUIS, W. et al. A diagnostic score for the irritable bowel syndrome. Its value in the exclusion of organic disease. **Gastroenterology**, v. 87, n. 1, p. 1–7, jul. 1984.

- KRUIS, W. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. **Gut**, v. 53, n. 11, p. 1617–1623, 1 nov. 2004.
- LASARO, M. A. et al. F1C Fimbriae Play an Important Role in Biofilm Formation and Intestinal Colonization by the *Escherichia coli* Commensal Strain Nissle 1917. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 246–251, jan. 2009.
- LEE, C. S. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: The role of inflammation. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 14, p. 3751, 2014.
- LEWIS, S. J.; HEATON, K. W. Stool Form Scale as a Useful Guide to Intestinal Transit Time. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 32, n. 9, p. 920–924, 8 jan. 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, 26 out. 2017.
- LIM, K. et al. Current Market Trends and Perspectives of Probiotics. **Current Topic in Lactic Acid Bacteria and Probiotics**, v. 3, n. 2, p. 46–53, fev. 2015.
- LIŠKA, J. et al. 10-year experience with umbilical cord blood IgE and microbiome therapy. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 45, n. 1, p. 35, 11 dez. 2019.
- LIU, J. et al. Functions of Gut Microbiota Metabolites, Current Status and Future Perspectives. **Aging and disease**, v. 13, n. 4, p. 1106, 2022.
- 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, maio 2003.
- MA, L.; TU, H.; CHEN, T. Postbiotics in Human Health: A Narrative Review. **Nutrients**, v. 15, n. 2, p. 291, 6 jan. 2023.
- MARTIN, P. et al. Interplay between Siderophores and Colibactin Genotoxin Biosynthetic Pathways in *Escherichia coli*. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 7, p. e1003437, 11 jul. 2013.
- MARTINS, C. G.; WAGNER, S. C.; LINDEN, R. Individualização Farmacocinética das Doses de 5-Fluoruracil no Câncer Colorretal. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 59, n. 2, p. 271–280, 28 jun. 2013.
- MASSIP, C. et al. Deciphering the interplay between the genotoxic and probiotic activities of *Escherichia coli* Nissle 1917. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 9, p. e1008029, 23 set. 2019.
- MEHTA, J. P.; AYAKAR, S.; SINGHAL, R. S. The potential of paraprobiotics and postbiotics to modulate the immune system: A Review. **Microbiological Research**, v. 275, p. 127449, out. 2023.
- MICENKOVÁ, L. et al. Administration of the Probiotic *Escherichia coli* Strain A0 34/86 Resulted in a Stable Colonization of the Human Intestine During the First Year of Life. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 2, p. 343–350, 8 jun. 2020.
- MIURA, K. et al. 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs. **Cancers**, v. 2, n. 3, p. 1717–1730, 17 set. 2010.

- MÖNDEL, M. et al. Probiotic *E. coli* treatment mediates antimicrobial human β -defensin synthesis and fecal excretion in humans. **Mucosal Immunology**, v. 2, n. 2, p. 166–172, mar. 2009.
- MONTEAGUDO-MERA, A. et al. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 16, p. 6463–6472, 2 ago. 2019.
- MUELLER, M.; TAINTER, C. R. ***Escherichia coli* Infection**. [s.l.] StatPearls Publishing LLC, 2023.
- NISSLE, A. Ueber die Grundlagen einer neuen ursächlichen Bekämpfung der pathologischen Darmflora ¹⁾. **DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 42, n. 39, p. 1181–1184, 14 set. 1916.
- NISSLE, A. Weiteres über Grundlagen und Praxis der Mutaflorbehandlung. **DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 51, n. 44, p. 1809–1813, 23 out. 1925.
- NOBRE, L. M. S. et al. Paraprobiotic *Enterococcus faecalis* EC-12 prevents the development of irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **Life Sciences**, v. 296, p. 120445, maio 2022.
- NOCERINO, R. et al. Cow's milk and rice fermented with *Lactobacillus paracasei* CBA L74 prevent infectious diseases in children: A randomized controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 118–125, fev. 2017.
- NOUGAYRÈDE, J.-P. et al. A Toxic Friend: Genotoxic and Mutagenic Activity of the Probiotic Strain *Escherichia coli* Nissle 1917. **mSphere**, v. 6, n. 4, 25 ago. 2021.
- PARADA VENEGAS, D. et al. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 11 mar. 2019.
- PARASSOL, N. et al. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 256–262, mar. 2005.
- PHILLIPS, E. et al. Mucositis and Cardiotoxicity Due to 5-Fluorouracil. **American Journal of Therapeutics**, v. 25, n. 6, p. e712–e714, nov. 2018.
- PIQUÉ, N.; BERLANGA, M.; MIÑANA-GALBIS, D. Health Benefits of Heat-Killed (Tyndallized) Probiotics: An Overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2534, 23 maio 2019.
- PLAZA-DÍAZ, J. et al. Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Chronic Diseases. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 555, 28 maio 2017.
- PLEGUEZUELOS-MANZANO, C. et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+ *E. coli*. **Nature**, v. 580, n. 7802, p. 269–273, 9 abr. 2020.
- PRISCIANDARO, L. D. et al. Probiotic factors partially improve parameters of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. **Cancer Biology & Therapy**, v. 11, n. 7, p. 671–677, 27 abr. 2011.

- PRISCIANDARO, L. D. et al. Probiotic factors partially prevent changes to caspases 3 and 7 activation and transepithelial electrical resistance in a model of 5-fluorouracil-induced epithelial cell damage. **Supportive Care in Cancer**, v. 20, n. 12, p. 3205–3210, 20 dez. 2012.
- QUARESMA, M. et al. Probiotic mixture containing *Lactobacillus spp.* and *Bifidobacterium spp.* attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Nutrition and Cancer**, v. 72, n. 8, p. 1355–1365, 16 nov. 2020.
- RAMANAN, D.; CADWELL, K. Intrinsic Defense Mechanisms of the Intestinal Epithelium. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 4, p. 434–441, abr. 2016.
- RATHER, I. A. et al. Probiotics and Atopic Dermatitis: An Overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 12 abr. 2016.
- REUTER, C. et al. An adherent mucus layer attenuates the genotoxic effect of colibactin. **Cellular Microbiology**, v. 20, n. 2, p. e12812, fev. 2018.
- SÁEZ-LARA, M. et al. Effects of Probiotics and Synbiotics on Obesity, Insulin Resistance Syndrome, Type 2 Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Review of Human Clinical Trials. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 928, 13 jun. 2016.
- 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, 4 set. 2021.
- SASSONE-CORSI, M. et al. Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut. **Nature**, v. 540, n. 7632, p. 280–283, 31 dez. 2016.
- SAWADA, D. et al. Effect of continuous ingestion of a beverage prepared with *Lactobacillus gasserii* CP2305 inactivated by heat treatment on the regulation of intestinal function. **Food Research International**, v. 79, p. 33–39, jan. 2016.
- SCHLEE, M. et al. Induction of Human β -Defensin 2 by the Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Is Mediated through Flagellin. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2399–2407, maio 2007.
- SCHOLTENS, P. A. M. J. et al. The Early Settlers: Intestinal Microbiology in Early Life. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 425–447, 10 abr. 2012.
- SHARMA, M.; SHUKLA, G. Metabiotics: One Step ahead of Probiotics; an Insight into Mechanisms Involved in Anticancerous Effect in Colorectal Cancer. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2 dez. 2016.
- SHENDEROV, B. A. Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 24, n. 0, 12 abr. 2013.
- SHI, Y. et al. Restoration of cefixime-induced gut microbiota changes by *Lactobacillus cocktails* and fructooligosaccharides in a mouse model. **Microbiological Research**, v. 200, p. 14–24, jul. 2017.
- SHIELDS, M. Chemotherapeutics. Em: **Pharmacognosy**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 295–313.

- SHIN, H. S. et al. Hypocholesterolemic effect of sonication-killed *Bifidobacterium longum* isolated from healthy adult Koreans in high cholesterol fed rats. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 9, p. 1425–1431, 14 set. 2010.
- SOARES, P. M. G. et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 2008.
- SOARES, P. M. G. et al. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine**, v. 61, n. 1, p. 46–49, jan. 2013.
- SONIS, S. T. The biologic role for nuclear factor kappa B in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 13, n. 5, p. 380–389, 1 set. 2002.
- SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 4, p. 277–284, abr. 2004.
- SONNENBORN, U. *Escherichia coli* strain Nissle 1917 - from bench to bedside and back: history of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 19, p. fnw212, out. 2016.
- SOUZA, E. L. S. et al. Beneficial effects resulting from oral administration of *Escherichia coli* Nissle 1917 on a chronic colitis model. **Beneficial Microbes**, v. 11, n. 8, p. 779–790, 2 dez. 2020.
- SUN, C. et al. Protective effects of *E. coli* Nissle 1917 on chickens infected with *Salmonella pullorum*. **Microbial Pathogenesis**, v. 172, p. 105768, nov. 2022.
- SYMBIOPHARM. **Symbioflor®2**. Disponível em: <<https://www.symbiopharm.de/en/products/symbioflorr-probiotic-drugs/symbioflorr-2-against-irritable-bowel-syndrome>>. Acesso em: 16 ago. 2023.
- TANG, Y. et al. Administration of probiotic mixture DM#1 ameliorated 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis and dysbiosis in rats. **Nutrition**, 2017.
- TOMAS, J. et al. Early colonizing *Escherichia coli* elicits remodeling of rat colonic epithelium shifting toward a new homeostatic state. **The ISME Journal**, v. 9, n. 1, p. 46–58, 11 jan. 2015.
- 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**, jul. 2014.
- TRINDADE, L. M. et al. Paraprobiotic *Lactobacillus rhamnosus* Protects Intestinal Damage in an Experimental Murine Model of Mucositis. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 15, n. 2, p. 338–350, 15 abr. 2023.
- VAISHNAVI, C. Translocation of gut flora and its role in sepsis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 334–342, out. 2013.
- VANDENPLAS, Y. et al. A Partly Fermented Infant Formula with Postbiotics Including 3'-GL, Specific Oligosaccharides, 2'-FL, and Milk Fat Supports Adequate Growth, Is Safe and

- Well-Tolerated in Healthy Term Infants: A Double-Blind, Randomised, Controlled, Multi-Country Trial. **Nutrients**, v. 12, n. 11, p. 3560, 20 nov. 2020.
- VETVICKA, V. et al. Immunological Effects of Yeast- and Mushroom-Derived β -Glucans. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 4, p. 615–622, dez. 2008.
- VILLA, A.; SONIS, S. T. Mucositis: Pathobiology and management. **Current Opinion in Oncology**, 2015.
- VINDEROLA, G. et al. Postbiotics in the medical field under the perspective of the ISAPP definition: scientific, regulatory, and marketing considerations. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 8 set. 2023.
- VINDEROLA, G.; SANDERS, M. E.; SALMINEN, S. The Concept of Postbiotics. **Foods**, v. 11, n. 8, p. 1077, 8 abr. 2022.
- WALLACE, C. J. K. et al. The Effects of Probiotics on Symptoms of Depression: Protocol for a Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. **Neuropsychobiology**, v. 79, n. 1, p. 108–116, 2020.
- WANG, H. et al. *Escherichia coli* Nissle 1917-derived factors reduce cell death and late apoptosis and increase transepithelial electrical resistance in a model of 5-fluorouracil-induced intestinal epithelial cell damage. **Cancer Biology & Therapy**, v. 15, n. 5, p. 560–569, 20 maio 2014.
- WANG, H. et al. Effects of Supernatants from *Escherichia coli* Nissle 1917 and *Faecalibacterium prausnitzii* on Intestinal Epithelial Cells and a Rat Model of 5-Fluorouracil-Induced Mucositis. **Nutrition and Cancer**, v. 69, n. 2, p. 307–318, 17 fev. 2017a.
- WANG, L. et al. Colicins of *Escherichia coli* Lead to Resistance against the Diarrhea-Causing Pathogen Enterotoxigenic *E. coli* in Pigs. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 5, 26 out. 2022.
- WANG, X. et al. Multiple effects of probiotics on different types of diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 30, n. 6, p. 611–622, 24 maio 2017b.
- WASSENAAR, T. M. Insights from 100 years of research with probiotic *E. coli*. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 6, n. 3, p. 147–161, set. 2016.
- WEGH et al. Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 4673, 20 set. 2019.
- YEUNG, C. Y. et al. Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model. **PLoS ONE**, 2015.
- YU, X. et al. Bioengineered *Escherichia coli* Nissle 1917 for tumour-targeting therapy. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 629–636, 21 maio 2020.
- ZAHARUDDIN, L. et al. A randomized double-blind placebo-controlled trial of probiotics in post-surgical colorectal cancer. **BMC Gastroenterology**, v. 19, n. 1, p. 131, 24 dez. 2019.
- ZHAO, Z. et al. Probiotic *Escherichia coli* NISSLE 1917 for inflammatory bowel disease applications. **Food & Function**, v. 13, n. 11, p. 5914–5924, 2022.

APÊNDICE A – Produção científica

Tabela 2: Produção científica e participações em eventos

Categoria	Quantidade	Situação
Créditos	28	Integralizados
Primeira autoria em artigo científico	1	Submetido para publicação
Coautoria em artigo científico	3	Publicados
	2	Submetidos para publicação
Coautoria em capítulo de livro	2	Publicados
Apresentação de trabalhos	3	Concluídos
Participação em eventos	5	Concluídos

1. Coautoria em artigo científico publicado:
“Fat matters: Fermented whole milk potentiates the anti-colitis effect of *Propionibacterium freudenreichii*”
2. Coautoria em artigo científico publicado:
“Growth differentiation factor 11 delivered by dairy *Lactococcus lactis* strains modulates inflammation and prevents mucosal damage in a mice model of intestinal mucositis”
3. Coautoria em artigo científico publicado:
“Comprehensive probiogenomics analysis of the commensal *Escherichia coli* CEC15 as a potential probiotic strain”
4. Coautoria em artigo científico submetido para publicação:
“From genome do bedside: the road of probiotics from characterization to commercialization”
5. Coautoria em artigo científico submetido para publicação:
“p62 protein-based gene therapy modulates the immune responses in DSS-induced colitis in mice”
6. Coautoria em capítulo de livro publicado
“LAB as cell factories: A synthetic biology approach for plasmid DNA and recombinant protein production”
7. Coautoria em capítulo de livro publicado:
“Lactic acid bacteria-based beverages in promotion of gastrointestinal tract health”
8. Apresentação de trabalho:
“Abordagem sinérgica utilizando vacina de DNA e proteína vacinal heteróloga HSP65 no tratamento da colite induzida por DSS”
9. Apresentação de trabalho:
“Anti-inflammatory properties of the *Escherichia coli* CEC15 strain in a murine model of 5-FU-induced intestinal mucositis”
10. Apresentação de trabalho:
“Efeito posbiótico de *Escherichia coli* CEC15 e *Escherichia coli* NISSLE 1917 em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU”

11. Participação em eventos
Gente Time Conference 2022
12. Participação em eventos
IX Simpósio de Microbiologia da UFMG
13. Participação em eventos
LIA2022 Bact-Inflam: Closing Seminars
14. Participação em eventos
98º Congresso Brasileiro de Genética
15. Participação em eventos
X Simpósio de Microbiologia da UFMG

Ao longo do período de desenvolvimento das atividades de mestrado estive inserido em diversos trabalhos do grupo, voltados à prospecção e caracterização de bactérias com potencial probiótico e posbiótico. Destaco aqui minha participação no trabalho intitulado “Fat matters: Fermented whole milk potentiates the anti-colitis effect of *Propionibacterium freudenreichii*” publicado no ano de 2023, com o qual contribuí realizando os procedimentos experimentais *in vivo* com camundongos e análises *ex vivo* como performar as análises de MPO, extração de material genético para metagenômica, avaliação de escore histopatológico e auxiliar na escrita do artigo. Além deste, atuei de forma semelhante na execução dos experimentos para o artigo “Comprehensive probiogenomics analysis of the commensal *Escherichia coli* CEC15 as a potential probiotic strain”, cujos dados serviram de base para o desenvolvimento do trabalho desta dissertação. Neste projeto, atuei com toda a experimentação animal e análises *ex vivo*, além de executar procedimentos *in vitro* e auxiliar nas análises metagenômicas. Estive envolvido na escrita e correção dos artigos de revisão e capítulos de livros publicados e participei de atividades de experimentação animal, dando suporte em procedimentos de eutanásia e experimentação em bancada.

Participei de eventos científicos tanto do programa de pós graduação em genética, Gene Time Conference, no qual apresentei o trabalho intitulado “Anti-inflammatory properties of the *Escherichia coli* CEC15 strain in a murine model of 5-FU-induced intestinal mucositis” em formato de banner, quanto também do programa de pós graduação em microbiologia, o Simpósio de Microbiologia da UFMG. Além destes, participei do evento LIA – Bact-Inflam, promovido pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Vasco Azevedo em colaboração com pesquisadores do INRAe e do Congresso Brasileiro de Genética. Completei os créditos devidos do programa de mestrado em genética com disciplinas ofertadas pelo departamento e também, disciplinas do programa de pós graduação em Microbiologia, atingindo um total de 28 créditos integralizados.

ANEXO A – Ficha de aprovação no CEUA

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Prezado(a):	
Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.	
Protocolo CEUA: 210/2022 Título do projeto: Efeito modulatório do paraprobiótico e posbiótico de <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 e <i>Escherichia coli</i> CEC15 em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU. Finalidade: Pesquisa Pesquisador responsável: Vasco Ariston de Carvalho Azevedo Unidade: Instituto de Ciências Biológicas Departamento: Departamento de Biologia Geral	
Situação atual: Decisão Final - Aprovado	
Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 26/09/2022. Validade: 26/09/2022 à 25/09/2027.	
Belo Horizonte, 26/09/2022.	
Atenciosamente,	
Sistema Solicite CEUA UFMG https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br	