

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

Bruno Gallotti Costa

**EFEITO DA FIBRA SOLÚVEL COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA NA
MUCOSITE INTESTINAL EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGO**

Belo Horizonte
2020

Bruno Gallotti Costa

**EFEITO DA FIBRA SOLÚVEL COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA NA
MUCOSITE INTESTINAL EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGO**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos
Martins

Coorientadora: Profa. Dra. Angélica
Thomaz Vieira

Belo Horizonte

2020

043

Costa, Bruno Gallotti.

Efeito da fibra solúvel como estratégia terapêutica na mucosite intestinal experimental em camundongo [manuscrito] / Bruno Gallotti Costa. – 2020.
74 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins. Coorientadora: Profa. Dra. Angélica Thomaz Vieira.

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

1. Microbiologia. 2. Mucosite. 3. Microbiota. 4. Fibras na Dieta. 5. Pectinas. I. Martins, Flaviano dos Santos. II. Vieira, Angélica Thomaz. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Bruno Gallotti Costa
Nº REGISTRO: 2018684439

Às 08:00 horas do dia 20 de fevereiro de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Simone de Vasconcelos Generoso, Paola Caroline Lacerda Leocádio e o Prof. Flaviano dos Santos Martins - Orientador, para julgar o trabalho final "EFEITO DA FIBRA SOLÚVEL COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA NA MUCOSITE INTESTINAL EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGO", do aluno **Bruno Gallotti Costa**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Dra. Simone de Vasconcelos Generoso Simone de Vasconcelos
Dra. Paola Caroline Lacerda Leocádio Paola Caroline Lacerda Leocádio
Prof. Flaviano dos Santos Martins [Orientador] Flaviano

Flávio Guimarães da Fonseca

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador do PPGM/UFMG

RESUMO

A mucosite é uma inflamação da mucosa gastrointestinal associada a pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. Dietas enriquecidas em fibras solúveis têm apresentado efeitos benéficos e imunomodulares, em grande parte, pela produção de ácidos graxos de cadeia curta por membros da microbiota indígena, contribuindo para a homeostase intestinal. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da dieta rica em fibra solúvel (HF), bem como o efeito da ausência da fibra dietética utilizando uma dieta com zero teor de fibras (ZF), na mucosite experimental murina induzida pelo quimioterápico irinotecano. Camundongos da linhagem C57BL/6 foram divididos em grupos que receberam as dietas controle (AIN93), HF e ZF. Os animais receberam as dietas por 14 dias, sendo que no dia 10 iniciou-se a indução da mucosite e os animais foram sacrificados após 4 dias. Os animais tratados com a dieta HF tiveram uma diminuição da permeabilidade intestinal após a indução da mucosite enquanto a dieta ZF aumentou a permeabilidade com relação ao grupo mucosite não tratado. Animais com mucosite apresentaram mielossupressão e redução do comprimento do intestino, e a dieta HF foi capaz de prevenir esses parâmetros. Animais com mucosite apresentaram aumento da expressão de mediadores inflamatórios como as citocinas IL-1 β , IL-6 e o tratamento com a fibra diminuiu a expressão desses mediadores. A indução da mucosite resultou em disbiose associada ao aumento de bactérias do gênero *Enterococcus*, e a dieta HF foi capaz de reduzir essa população e aumentar a população de bactérias ácido láticas. De maneira interessante, a ausência de fibras exacerbou a população de Enterobactérias e diminuiu a diversidade de bactérias da microbiota intestinal dos animais tratados com a dieta ZF em comparação aos animais controle e mucosite não tratado. A ingestão defibras aumentou a população de *Bacteroides sp.* e também a concentração de acetato nas fezes dos animais, que por sua vez, pode estar associado ao efeito benéfico da dieta HF, visto que o tratamento oral com acetato melhorou alguns parâmetros clínicos nos animais com mucosite, como a redução da atividade de MPO e EPO. Dessa forma, nossos resultados sugerem a importância da ingestão defibras na composição da microbiota e manutenção da homeostase como estratégia terapêutica importante para a mucosite, e também para o entendimento dos riscos que uma dieta deficiente em fibra pode trazer durante o tratamento quimioterápico.

Palavras-chave: mucosite; microbiota; dieta rica em fibra; dieta zero fibra; pectina.

ABSTRACT

Mucositis is an inflammation of the gastrointestinal mucosa very frequent in patients under chemo- and radiotherapy. Fiber-enriched diets, especially soluble fibers, have shown very important beneficial and immunomodulatory effects for the individual, mainly by inducing the production of short chain fatty acids contributing to intestinal homeostasis. Thus, the aim of this study is to evaluate the effect of high soluble fiber (HF) diet, as well as the effect of the absence of dietary fiber using a zero fiber (ZF) diet, on chemotherapy-induced murine experimental mucositis irinotecan. C57BL/6 mice were fed with control (AIN93), HF and ZF diets for 14 days. Mucositis was induced on day 10 and the animals were sacrificed 4 days after. Mice fed with HF diet had decreased intestinal permeability after mucositis induction while the ZF diet increased the permeability in comparison with untreated mucositis group. Mucositis induction was associated with myelosuppression and reduced intestine length and administration of HF diet was able to prevent these parameters. Mucositis induction was also associated with increased expression of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-6, and treatment with fiber decreased the expression of these mediators. The induction of mucositis resulted in dysbiosis associated with an increase *Enterococcus sp.*, and the HF diet was able to reduce this population and increase the population of lactic acid bacteria. Interestingly, the absence of fibers in the diet exacerbated the population *Enterobacteriaceae* and decreased the bacterial diversity of the gut microbiota of mice treated with ZF diet compared to control and untreated mucositis groups. Fiber intake increased the population of *Bacteroides sp.* and also increased the concentration of acetate in the feces, which, in turn, may be associated with the beneficial effect of the HF diet, since oral treatment with acetate improved some clinical parameters in animals with induced mucositis, such as decreased MPO and EPO activity. Therefore, our results suggest the importance of fiber intake in the composition of the microbiota and maintenance of homeostasis as an important therapeutic strategy for mucositis, and also for understanding the risks that a fiber-deficient diet can bring during chemotherapy.

Keywords: mucositis; microbiota; high fiber diet; zero fiber diet; pectin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases da mucosite intestinal	16
Figura 2. Amplificação do sinal na mucosite.....	17
Figura 3. Causas da disbiose intestinal e suas consequências fisiológicas no organismo do hospedeiro	21
Figura 4. Representação esquemática da estrutura da pectina	26
Figura 5. Desenho experimental.....	31
Figura 6. Consumo de ração e desenvolvimento ponderal.....	42
Figura 7. Mielossupressão.....	43
Figura 8. Atividade de MPO e EPO	44
Figura 9. Análise da permeabilidade intestinal	45
Figura 10. Avaliação da concentração de sIgA e expressão de <i>Muc2</i>	47
Figura 11. Perfil de citocinas	48
Figura 12. Análises microbiológicas	51
Figura 13. Concentração de AGCC nas fezes e soro	52
Figura 14. Avaliação do efeito da administração oral de acetato na mucosite	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas AIN-93, HF e ZF.....	31
Tabela 2. Meios e condições de cultura para a análise qualitativa e quantitativa do conteúdo intestinal dos animais.....	34
Tabela 3. Composição do mix para realização da síntese de cDNA.....	38
Tabela 4. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para qPCR.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU - 5 fluorouracil

^{99m}Tc - tecnécio sestamibi

AGCC - ácidos graxos de cadeia curta

AIN-93 – dieta controle

ANOVA – análise de variância

AS - ágar sangue

AS-S - ágar sangue suplementado

BAL - bactérias ácido lácticas

BBE - *Bacteroides* Bile Esculina

BHI - infuso de cérebro coração (do inglês *Brain Heart Infusion*)

BHT – Hidroxitolueno butilado

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX-2 - ciclo-oxigenase-2

CTP-11 - irinotecano

DII – doenças inflamatórias intestinais

DNA - ácido desoxirribonucleico

DNTP – desoxinucleotídeo trifosfato

DSS – sulfato de sódio dextrano

DTPA - ácido dietilenoaminopentacético

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática

EPO - peroxidase eosinofílica

ERO - espécies reativas de oxigênio

FaFar - Faculdade de Farmácia

FOS - frutooligossacarídeos

g - força gravitacional

GG - *Gorbach and Goldin*

GOS – galactooligossacarídeos

GPR – receptor acoplado à proteína G

HDAC – histonas deacetilases

HE - Hematoxilina e eosina

HF- *High Fiber*

HTAB - brometo dehexadeciltrimetilamônio

i.p. - intraperitoneal

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

IgA – imunoglobulina A

IL - interleucina

LABio - Laboratório de Agentes Bioterapêuticos

LEFM - Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos

LMI- Laboratório de Microbiota e Imunomodulação

LPS – lipopolissacarídeo

MAPK - proteínas cinases ativadas por mitógenos

MBq - megabecquerel

MMP - metaloproteinase

MPO – mieloperoxidase

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

MRS - *de Man, Rogosa & Sharpe*

NB2 - nível de biossegurança 2

NF-κB - fator de transcrição nuclear kappa B

nm - nanômetro

OD - densidade óptica

OPD - o-fenilenodiamina

p53 – proteína de tumor p53

PAR2 – receptor ativado por protease 2

PBS - tampão fosfato-salino

pH - potencial hidrogeniônico

PMSF - fenilmetilsulfonilfluorido

qRT-PCR – transcrição reversa reação da polimerase em cadeia em tempo real

qPCR – reação da polimerase em cadeia em tempo real

QT/RT - quimio/radioterapia

RNA - ácido ribonucléico

rpm - rotações por minuto

slgA - imunoglobulina do tipo A secretória

SII - Síndrome do Intestino Irritável

TGI - trato gastrointestinal

TGF- β – fator de transformação do crescimento beta

TLR - receptores do tipo *toll*

TMB - tetrametilbenzidina

TNF - fator de necrose tumoral

UA - unidades arbitrárias

UFC - Unidade formadora de colônia

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

XOS - xilooligossacarídeos

ZF – *zero/low fiber*

ZO – zônula de oclusão

ZO-1 - *zonula occludens-1*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Mucosite	13
1.1.1 Mucosite e microbiota intestinal	16
1.2 Dieta e a composição da microbiota intestinal.....	19
1.3 Fibras alimentares e pectina.....	22
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Animais.....	29
4.2 Dieta e tratamento com acetato.....	29
4.3 Indução de mucosite	29
4.4 Desenho experimental.....	30
4.5 Avaliação clínica dos animais e consumo de alimento	31
4.6 Avaliação da mielossupressão	31
4.7 Determinação da permeabilidade intestinal.....	32
4.8 Avaliação dos parâmetros microbiológicos – Microbiota Intestinal	33
4.9 Avaliação dos parâmetros imunológicos	34
4.9.1 Medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	34
4.9.2 Medida da atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO)	34
4.9.3 Dosagem de sIgA.....	35
4.10 Análise da expressão de citocinas e <i>Muc2</i>	35
4.11 Dosagem de AGCC.....	38
4.12 Análise estatística	39
5. RESULTADOS	40
5.1 Consumo de alimento e desenvolvimento ponderal	40
5.2 Mielossupressão	41
5.3 MPO e EPO.....	42
5.4 Permeabilidade intestinal	44
5.5 Concentração de sIgA e expressão de <i>Muc2</i>	45
5.6 Perfil de citocinas	46

5.7 Análises microbiológicas	47
5.8 Produção de AGCC	50
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO	61
8. REFERÊNCIAS	62
9. FINANCIAMENTO	71
10. ANEXO	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mucosite

O câncer é uma doença onde ocorrem mutações no DNA ocasionando em uma multiplicação exacerbada e no funcionamento anormal das células, que acabam perdendo sua função original (FERNANDES; MAFRA, 2005). O tratamento do câncer é complexo e podem ser necessários vários tipos de terapias para a eliminação das células neoplásicas, tais como a radioterapia, quimioterapia e cirurgia para retirada do tumor (RUBIRA et al., 2012). A quimioterapia é tratamento mais comum em casos de câncer e consiste no uso de drogas antitumorais que exercem efeito citotóxico sobre as células cancerígenas (RUBIRA et al., 2012; FALZONE; SALOMONE; LIBRA, 2018). Dentre os diferentes exemplos de quimioterápicos, o irinotecano é a principal fármaco antineoplásico utilizado em pacientes que apresentam câncer colorretal metastático (NIELSEN et al., 2017).

O cloridrato de Irinotecano (CPT-11) é um alcaloide derivado dos extratos da planta *Camptotheca acuminata*, sendo bem conhecido pelo seu amplo espectro de atividade antineoplásica em modelos *in vitro* e *in vivo* (FUJITA, 2015; KUNIMOTO et al., 1987). Seu mecanismo de ação se resume à inibição da enzima topoisomerase I, responsável pela replicação e transcrição do DNA, de forma que a fase S do ciclo celular não possa ser completada, acarretando em morte celular (OYAGA-IRIARTE et al., 2019; XU; VILLALONA-CALERO, 2002). A administração de CTP-11 está associada a um quadro de disbiose intestinal e alterações histopatológicas da mucosa ocasionando os efeitos colaterais frequentemente associados ao uso desse fármaco, como leucopenia, anemia, fadiga, náuseas, vômitos, diarreias, perda de peso e a mucosite (RUBIRA et al., 2012; PEDROSO et al., 2015).

A mucosite é um dos principais efeitos colaterais causados pela administração de quimioterápicos durante o tratamento do câncer. A mucosa gastrointestinal possui alta taxa de proliferação e devido à pouca seletividade dos quimioterápicos, ela, assim como as células neoplásicas, também está propensa a sofrer os efeitos dessa droga, o que pode acarretar no desenvolvimento da doença nesses pacientes (GIFONI, 2012). Tanto a mucosite oral quanto a mucosite intestinal estão relacionadas à alta toxicidade dos agentes antineoplásicos e são responsáveis por significantes taxas de morbidade e mortalidade entre os pacientes submetidos a esse tipo de terapia (WOO apud LIMA, 2004). Sendo assim, toda a mucosa gastrointestinal está sujeita a

desenvolver a inflamação e, por isso, o termo mucosite gastrointestinal vem sendo o mais adequado para caracterização dessa patologia (GIFONI, 2012).

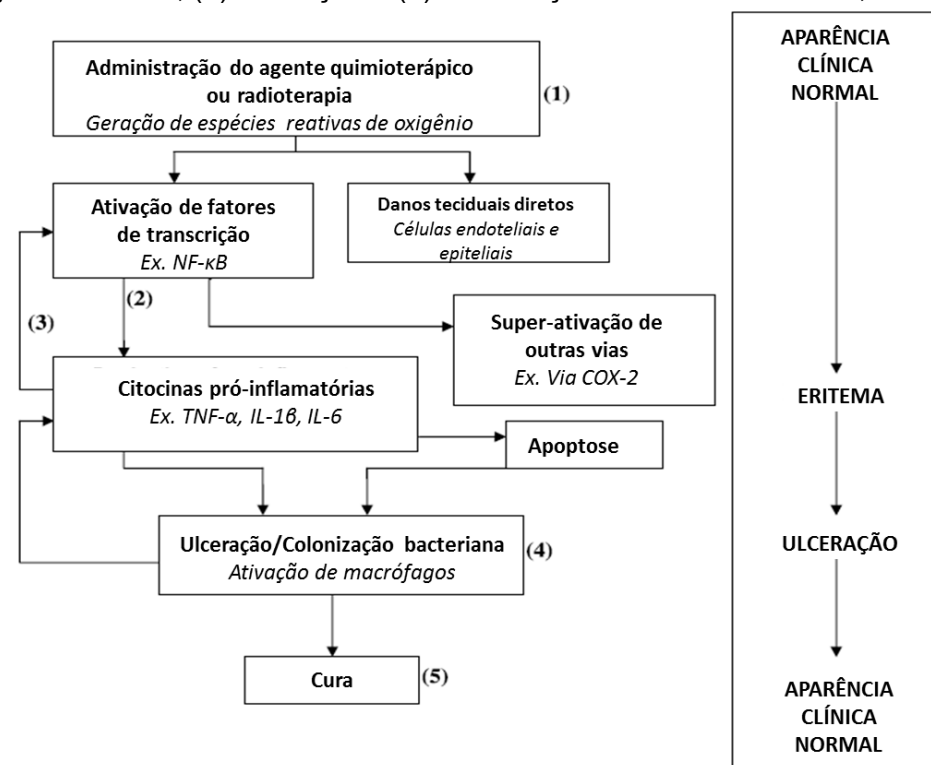
Apesar de ser bastante comum em terapias antineoplásicas, não se sabe ao certo o mecanismo biológico da mucosite intestinal (GIBSON; KEEFE apud LEOCADIO, 2012), devido ao local onde a doença se desenvolve. O intestino é um órgão de difícil acesso, sendo necessários métodos invasivos para chegar até a lesão (endoscopia com biópsia) (SMITH apud SOARES, 2008). A maioria dos estudos clínicos a respeito da mucosite está relacionada à mucosite oral, uma vez que a boca é um local acessível para analisar e caracterizar as lesões, bem como observar o desenvolvimento da doença; entretanto, acredita-se que os processos envolvidos nas alterações do epitélio da mucosa oral são similares nas outras regiões do trato gastrointestinal (TGI) (GIFONI, 2012).

O desenvolvimento da mucosite ocorre em cinco fases: iniciação, resposta aos danos primários, amplificação de sinais, ulceração e cicatrização (Figura 1) (SONIS apud LEOCADIO, 2012). Sonis (2004) constatou que a fase de iniciação ocorre logo após a administração do quimioterápico e este, por sua vez, será responsável pela quebra das fitas de DNA nas células resultando em dano tecidual. Nessa fase, também ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que em pequenas concentrações desempenham papel na regulação de fatores de transcrição que modulam a proliferação, adesão e apoptose celular; porém, durante a administração de um quimioterápico, ocorre o estresse oxidativo, onde a concentração de ERO é maior que a concentração de antioxidantes, ocasionando em perda da função celular, apoptose e necrose (BETTERIDGE, NORDBERD e ARNER apud LEOCÁDIO, 2012). O estresse oxidativo e a geração de ERO são os eventos primários que desencadeiam a mucosite (SONIS apud LEOCÁDIO, 2012).

A segunda fase da mucosite se refere à resposta aos danos primários causados pelo estresse oxidativo, produção de ERO e quebra das fitas de DNA. Nessa fase, “ocorre aumento do processo de apoptose e perda progressiva de células da cripta e da superfície de absorção” (MENEZES, 2014). A fase de iniciação da mucosite desencadeia a ativação de diversos fatores de transcrição, como o p53 e o NF- κ B (fator de transcrição nuclear kappa B), sendo que este último é considerado o mais significativo em relação à toxicidade e resistência dos tumores à terapia (SONIS, 2004). A ativação de NF- κ B resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF (fator de necrose tumoral), interleucina (IL)-1 β e IL-6, que, por meio da ativação

de diversos genes, exercem efeito tóxico na mucosa resultando em dano tecidual e apoptose (CHANG *et al.* apud LEOCÁDIO, 2012).

5 **Figura 1.** Fases da mucosite intestinal: (1) iniciação, (2) resposta aos danos primários, (3) amplificação dos sinais, (4) ulceração e (5) cicatrização. Fonte: PEDROSO, 2014.

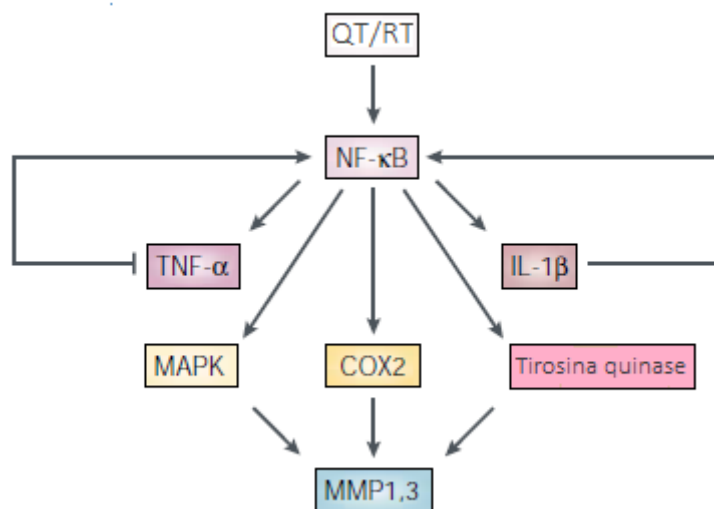


Na terceira fase da mucosite, que se refere à amplificação dos sinais, as citocinas pró-inflamatórias, além de participar do dano tecidual, também participam de um *feedback* positivo que amplifica os danos primários iniciados pela ação do quimioterápico (SONIS, 2004), agravando o dano tecidual e apoptose decorrente do aumento da produção de citocinas e do estresse oxidativo (SONIS apud LEOCÁDIO, 2012). A ativação de NF-κB na segunda fase da mucosite, bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias, ativam o NF-κB em outras células, que resulta na transcrição de genes que codificam MAPK (proteínas cinases ativadas por mitógenos), COX-2 (ciclo-oxigenase 2) e tirosina-quinases; estes por sua vez ativam as metaloproteinases (MMP) 1 e 3 no epitélio intestinal, que resultam em dano tecidual (Figura 2) (SONIS, 2004).

Na fase de ulceração, ou quarta fase da mucosite, ocorre a perda da integridade da mucosa resultando em lesões muito dolorosas para o paciente e em maior susceptibilidade para colonização bacteriana sobre tais lesões (SONIS, 2004).

Nessa fase, além das ulcerações, observa-se redução da área das vilosidades, redução do comprimento do intestino delgado e aumento da profundidade das criptas (KEEFE; FERREIRA; SOARES apud LEOCÁDIO, 2012). Metabólitos das bactérias presentes nas úlceras ativam células inflamatórias a migrarem para o local da lesão; tais células são responsáveis por produzirem e liberarem citocinas pró-inflamatórias que induzem a expressão de genes pró-apoptóticos aumentando a lesão na mucosa (SONIS, 2004). Essas lesões infecciosas na mucosa rompem a barreira intestinal aumentando o risco de translocação bacteriana e, conseqüentemente, bacteremia e sepse, sendo por isso a fase de maior preocupação para os médicos durante a manifestação da mucosite (GIFONI, 2012; LEOCÁDIO, 2012; SONIS, 2004).

Figura 2. Amplificação de sinal na mucosite. Fonte: SONIS, 2004. QT/RT - quimio/radioterapia.



15

A quinta e última fase da mucosite é a cicatrização. Na maioria dos casos, a cicatrização ocorre espontaneamente no momento em que o tratamento com o quimioterápico é interrompido; há então a retomada da proliferação celular do tecido da mucosa, bem como sua regeneração, e também o restabelecimento da microbiota do local.

20

1.1.1 Mucosite e microbiota intestinal

O modelo proposto por SONIS (2004) caracteriza bem os estágios da inflamação induzida por quimioterápicos no intestino, porém não deixa claro o papel da microbiota no desenvolvimento da doença (PEDROSO, 2014). Nesse modelo, a

25

microbiota está presente apenas na fase de ulceração, mas segundo Van Vliet e colaboradores (2010), bactérias do TGI tem a capacidade de metabolizar determinados quimioterápicos, levando à formação de metabólitos ativos que favorecem o desenvolvimento da mucosite intestinal.

5 Durante a fase de iniciação, há um aumento da produção de ERO, afetando a oxigenação intestinal e, conseqüentemente, as bactérias simbiotes ali presentes, causando uma mudança na composição da microbiota (STRINGER, 2013). Em pacientes com ileostomia, Stringer (2013) observou um aumento da comunidade de *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae*, que são bactérias aerotolerantes, quando comparadas com bactérias anaeróbias; uma vez que a ileostomia é tratada, a comunidade bacteriana retoma proporções normais, mostrando a mudança da microbiota intestinal sob a influência de oxigênio.

15 O NF-κB é responsável pela ativação de mais de 200 genes envolvidos na produção de citocinas pró-inflamatórias que intensificam o dano tecidual na mucosa (SONIS, 2004). Bactérias da microbiota indígena têm o poder de diminuir a ativação do NF-κB, resultando em uma menor resposta inflamatória. *Faecalibacterium prausnitzii* é uma dessas bactérias que é capaz de induzir a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, ocasionando em uma menor ativação de NF-κB e em uma inflamação atenuada (KELLY et al.; BEG; SOKOL et al. apud STRINGER, 2013). De fato, aumento de IL-10 parece ser um fator protetor na mucosite, uma vez que animais isentos de germes, que possuem naturalmente altos níveis dessa citocina anti-inflamatória, não desenvolvem mucosite quando exposto ao quimioterápico irinotecano (PEDROSO et al., 2015).

25 Estudos demonstram que durante a terapia antineoplásica ocorre uma diminuição da diversidade bacteriana na mucosa levando ao quadro de disbiose (EDLUND; SRINGER; VLIET apud MENEZES, 2014). Além disso, MENEZES (2014) demonstrou que a inibição da expansão do conteúdo de enterobactérias impede a amplificação do processo inflamatório durante a mucosite induzida por quimioterápicos, sugerindo que a disbiose da microbiota tem relação causal com o desenvolvimento dessa patologia. Dessa forma, é importante manter o equilíbrio microbiano durante a quimioterapia para atenuar a resposta inflamatória e manter a integridade estrutural do intestino (STRINGER, 2013).

30 A quimioterapia/radioterapia (QT/RT) aumenta a permeabilidade intestinal devido a apoptose das células da cripta, bem como a atrofia das vilosidades

(MENEZES, 2014; VAN VLIET et al., 2010). Van Vliet e colaboradores (2010) sugerem que a microbiota intestinal também esteja envolvida na permeabilidade intestinal. Estudos mostraram que a microbiota indígena aumenta a eficiência da barreira epitelial diminuindo a permeabilidade intestinal (WANG et al. apud VAN VLIET et al., 2010). Bifidobactérias e lactobacilos, ambas bactérias da microbiota indígena, estão associadas a uma maior expressão de proteínas da zônula de oclusão (ZO), fazendo as células epiteliais da mucosa ficarem mais fortemente ligadas, diminuindo, assim, a permeabilidade intestinal (LIU et al.; MOORTHY et al. apud VAN VLIET et al., 2010). A microbiota comensal pode influenciar a fase ulcerativa da mucosite em que, no modelo proposto por SONIS (2004), há a perda da integridade intestinal, que pode estar associada ao quadro de disbiose da mucosa, aumentando a permeabilidade intestinal (VAN VLIET et al., 2010).

A mucosa intestinal é revestida em toda sua extensão por muco epitelial que é regulado por bactérias comensais e é importante para a manutenção da integridade intestinal (GUARNER apud MENEZES, 2014). O muco epitelial também tem a função de proteger o intestino contra infecções e inflamações bacterianas (VAN VLIET et al., 2010). Esse muco é constituído principalmente por glicoproteínas e mucinas; os genes que codificam as mucinas são os genes da família *Muc* e são regulados por bactérias da microbiota indígena e seus metabólitos (CABALLERO-FRANCO; MATTAR; apud VAN VLIET et al., 2010). *Lactobacillus rhamnosus* GG (Gorbach and Goldin) e *Lactobacillus plantarum* aumentam a expressão dos genes *Muc2* e *Muc3* (KIM et al.; MACK et al.; apud VAN VLIET et al., 2010). Estudos feitos sobre mucosite induzida por 5 fluorouracil (5-FU) mostram que o número de células caliciformes do jejuno diminuiu significativamente, assim como os níveis de mucina, quando comparados com o grupo controle (STRINGER; SAEGUSA et al. apud STRINGER, 2013). Tal fato pode estar relacionado à perda da homeostase intestinal, devido à administração do quimioterápico, que acarreta na diminuição da população de bactérias que regulam genes da família *Muc* e à redução do número e do tamanho das células caliciformes ao longo do TGI (KANDORI et al. apud VAN VLIET et al., 2010).

A ulceração da camada epitelial, juntamente com o quadro de disbiose e alteração da camada de muco intestinal, aumentam a permeabilidade intestinal, aumentando as chances de translocação bacteriana durante o desenvolvimento da mucosite para os tecidos adjacentes e para o sangue, resultando em bacteremia e sepse (MENEZES, 2014).

Como citado anteriormente, há estudos relacionando a importância da microbiota indígena para a mucosa e que, durante o tratamento quimioterápico, essa microbiota é alterada (MENEZES, 2014; PEDROSO *et al.*, 2015). Sabendo disso, é importante utilizar estratégias para manter a homeostase intestinal e evitar a disbiose durante a QT/RT, como por exemplo, a suplementação da dieta com fibras.

Sabendo da severidade do tratamento oncológico, o cuidado nutricional em pacientes imunossuprimidos é necessária para garantir uma melhor resposta ao tratamento quimioterápico e diminuir os efeitos colaterais deste. Uma dieta adequada contribui para o equilíbrio da microbiota e homeostase intestinal que por sua vez favorece o controle do câncer.

1.2 Dieta e a composição da microbiota intestinal

O TGI humano é colonizado por centenas a milhares de espécies de microrganismos descritos que estabelecem uma relação simbiótica com o hospedeiro (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2015). Esses microrganismos oferecem diversos benefícios para o hospedeiro, como proteção contra patógenos, regulação do sistema imune, fortalecimento da barreira intestinal e produção de nutrientes (THURSBY; JUGE, 2017). Porém, esses efeitos benéficos da microbiota para o hospedeiro ocorrem quando esta se encontra em equilíbrio ou eubiose.

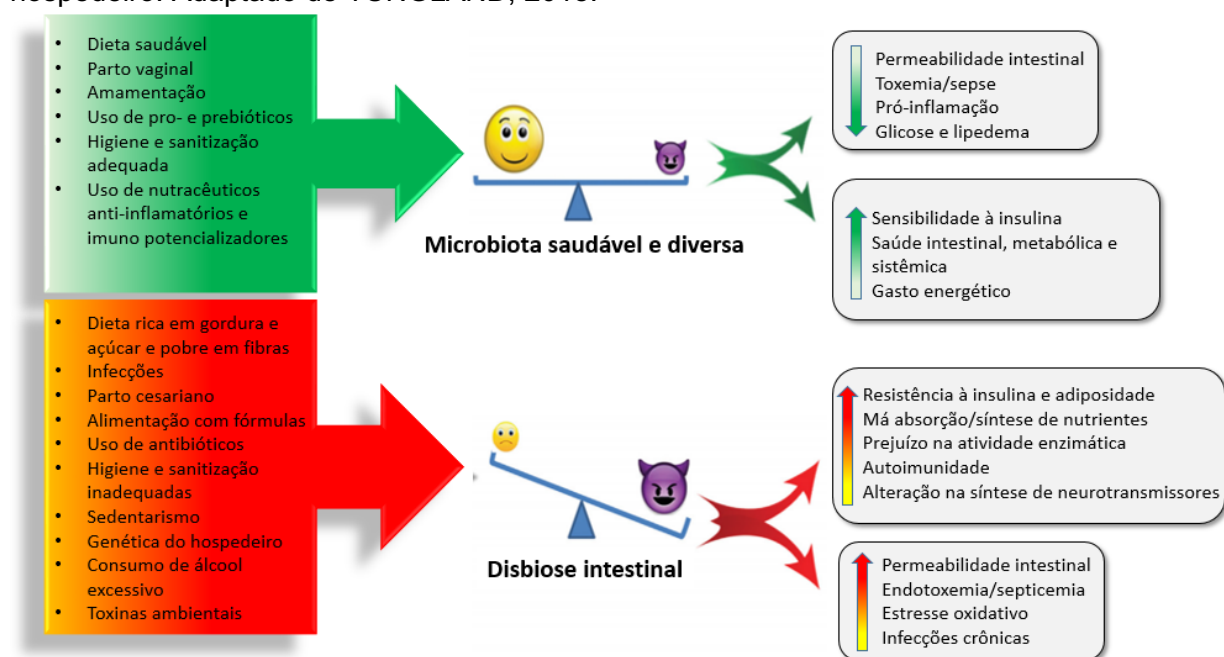
Uma vez que a homeostase é rompida, há um desequilíbrio da microbiota levando a um quadro de disbiose, que está associado a diversas desordens intestinais, como a Síndrome do Intestino Irritável (SII), doença celíaca e alegria alimentar (ENGEN *et al.*, 2015). A disbiose pode ser definida como a diminuição da população de bactérias que promovem a saúde e o aumento de bactérias que acarretam em doença (WILKINS; MONGA; MILLER, 2019). Ela pode ser ocasionada por diversos fatores como a ingestão de álcool, administração de antibióticos, estado imune do hospedeiro, distúrbios no ciclo circadiano e dieta (ENGEN *et al.*, 2015; PAIXÃO; CASTRO, 2016) (figura 3).

A dieta é um dos fatores que mais impactam a composição e a diversidade da microbiota, uma vez que, os diferentes componentes da dieta são capazes de moldar as comunidades bacterianas ao longo do tempo (MAKKI *et al.*, 2018). Com relação ao primeiro estágio de vida, a amamentação exerce grande influência nos tipos de microrganismos da microbiota do recém-nascido (PAIXÃO; CASTRO, 2016), assim como o tipo de leite ao qual o bebê é alimentado (leite materno ou leite industrializado)

(PENA; NICOLI, 2001 apud PAIXÃO; CASTRO, 2016). Bebês alimentados com leite materno apresentam maiores proporções de bifidobactérias, enquanto que os alimentados com leite industrializado apresentem menores números de bactérias anaeróbias (RODRÍGUEZ et al., 2015).

5

Figura 3. Causas da disbiose intestinal e suas consequências fisiológicas no organismo do hospedeiro. Adaptado de TUNGLAND, 2018.



Com relação aos adultos, a microbiota já é mais estável e diversos estudos utilizando sequenciamento de nova geração do gene 16S rRNA, mostraram que no intestino grosso de adultos há uma dominância entre os grupos Firmicutes e Bacteroidetes, seguido por membros do grupo Actinobacteria, como *Bifidobacterium* spp. (RODRÍGUEZ et al., 2015). Embora menos frequente, os estudos feitos para avaliar a composição da microbiota do intestino delgado mostrou que este é composto principalmente por estafilococos e membros dos gêneros *Clostridium* e *Veillonella* e que essa microbiota apresenta flutuações temporais ao longo do dia, onde um mesmo indivíduo pode apresentar perfil diferente no período da manhã e da tarde, justificado pela dieta do indivíduo e a frequência com que o alimento é ingerido (RODRÍGUEZ et al., 2015).

Além do impacto sobre a microbiota, a dieta pode agir diretamente sobre a resposta fisiológica do hospedeiro; sendo assim, o tipo de dieta pode contribuir para o desenvolvimento de doenças, como doenças inflamatórias intestinais (DII) e asma

crônica, (STATOVCI et al., 2017) ou trazer benefícios para o organismo por meio do aumento de bactérias benéficas à saúde.

A *Westernized diet* recebe esse nome porque é uma dieta comum em países ocidentais e se caracteriza pela alta ingestão de proteína e gordura animal, açúcar, álcool e sal, e pelo baixo consumo de frutas e vegetais, que são alimentos ricos em fibras (STATOVCI et al., 2017). Dietas ricas em gorduras e pobre em fibras contribuem para o desenvolvimento de obesidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares; essas doenças não estão frequentes apenas no ocidente, mas também em países do oriente que adotaram o estilo de vida ocidental, como Japão e África do Sul (STATOVCI et al., 2017).

A modulação da microbiota associada ao consumo de fibra depende das propriedades físico-químicas do carboidrato ingerido e da capacidade das bactérias da microbiota de fermentá-lo (HOLSCHER, 2017); a ingestão de fibras pode favorecer o crescimento de determinados grupos bacterianos em detrimento de outros. Dessa forma, a resposta à ingestão de fibras alimentares não é uniforme e varia de acordo com a composição da microbiota pré-existente do indivíduo e que depende, por sua vez, dos hábitos alimentares deste (O'GRADY; O'CONNOR; SHANAHAN, 2019).

Um estudo realizado por Nicolucci e colaboradores (2017) visou analisar o efeito da suplementação de prebiótico (inulina enriquecida com oligofrutose) sobre a microbiota intestinal e sobre o metabolismo de crianças saudáveis e crianças com sobrepeso e obesas. Eles observaram que as crianças que receberam a suplementação de fibra apresentaram aumento na população de *Bifidobacterium* e uma redução de *Bacteroides vulgatus*. A redução da população de *B. vulgatus* foi acompanhada da redução da porcentagem de gordura nas crianças obesas e com sobrepeso, indicando a relação dessa bactéria com a adiposidade.

Outro estudo conduzido por De Filippo e colaboradores (2010) buscou comparar a microbiota intestinal de crianças entre 1 a 6 anos de uma vila da África rural, um ambiente que se assemelha ao período Neolítico e sua agricultura de subsistência, com a microbiota intestinal de crianças da mesma idade da Europa Ocidental, um ambiente típico do mundo desenvolvido. Eles observaram que as crianças africanas, que consumiam muitas fibras, apresentavam predominância de bactérias do filo Bacteroidetes, enquanto que nas crianças europeias, que consumiam muita gordura e açúcar, predominava o filo Firmicutes. Exclusivamente no grupo das crianças africanas, observou-se a presença de *Xylanibacter*, *Prevotella*, *Butyrivibrio*, e

Treponema que são bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que desempenham papel protetor contra inflamações intestinais. Isso indica que dietas ricas em fibras e pobres em gordura e açúcar selecionam bactérias produtoras de AGCC.

5 Os AGCC são metabólitos microbianos que constituem os principais produtos bacterianos gerados a partir da fermentação de fibras alimentares no intestino (DALILE et al., 2019). Aproximadamente 95% dos AGCC produzidos pelo metabolismo das bactérias endógenas são utilizados como fonte de energia pelos colonócitos e o restante é transportado para o fígado onde atuarão na sinalização do
10 metabolismo de lipídios e na regulação de glicose/insulina (CARDING et al., 2015). Outro benefício atribuído aos AGCC é a sua propriedade anti-inflamatória que se dá por meio da inibição das histonas deacetilases agindo sobre a expressão gênica da célula (CARDING et al., 2015), diminuindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias e aumentando a expressão de citocinas anti-inflamatórias.

15 Diferentes dietas possuem diferentes efeitos sobre o organismo e o consumo de fibras contribui para a modulação do sistema imune e da microbiota onde estudos demonstram o efeito benéfico de uma rica em fibra sobre a saúde. Dessa forma, as fibras alimentares, como a pectina, podem auxiliar no tratamento de doenças e resolução de inflamações devido à produção de AGCC e seu efeito imunomodulador.

20

1.3 Fibras alimentares e pectina

As fibras alimentares vêm sendo amplamente estudadas nas últimas décadas e pesquisas evidenciaram que seu consumo promove benefícios à saúde. A definição de fibra alimentar foi inicialmente proposta por Hipsley, em 1953, onde ele a definia
25 como componentes da parede celular de plantas que não são digeridos por reações enzimáticas (DHINGRA et al., 2012). Desde então, essa definição passou por várias revisões até que em 2009 a Comissão do Codex Alimentarius definiu a fibra alimentar como:

30 Polímeros de carboidratos com dez ou mais unidades monoméricas, que não são hidrolisados pelas enzimas no intestino delgado humano e que pertence a uma das seguintes categorias:

- (i) Polímeros de carboidratos comestíveis presentes naturalmente em alimentos como são consumidos;
 - (ii) Polímeros de carboidratos comestíveis que foram obtidos a partir de material cru por métodos físicos, químicos ou enzimáticos e que tenham efeito fisiológico benéfico sobre a saúde humana demonstrado e comprovado por meio de evidências científicas amplamente aceitas;
- 35

- (iii) Polímeros de carboidratos sintéticos que tenham efeito fisiológico benéfico sobre a saúde humana demonstrado e comprovado por meio de evidências científicas amplamente aceitas.

5 Embora as fibras possam ser classificadas com base em parâmetros como o tipo de polissacarídeo que compõe a fibra, sitio de digestão e sua função na planta, a forma mais comum para classificá-las é com base em sua solubilidade em água (DHINGRA et al., 2012). Dessa forma, as fibras alimentares podem ser classificadas como solúveis ou insolúveis. As fibras insolúveis são fibras que não digeridas pelo
10 organismo e, portanto, não sofrem ação das enzimas do TGI (YANG et al., 2017). As fibras insolúveis não são absorvidas pelo organismo e seu consumo está associado à diminuição do tempo de trânsito intestinal e ao aumento da excreção fecal; a celulose, hemicelulose e lignina estão entre os principais exemplos de fibras insolúveis e são encontradas na parede celular de plantas, onde atuam conjuntamente para manter a
15 funções da célula vegetal (JR; W, 2016). As principais fontes de fibras insolúveis são cereais, grãos, nozes, castanhas, amêndoas, batatas e arroz (JR; W, 2016).

As fibras solúveis ao se solubilizarem em água, geralmente formam gel e são fermentadas por bactérias da microbiota intestinal resultando na produção de AGCC, como o acetato, propionato e butirato (SLAVIN et al., 2009). Dentre os efeitos
20 associados à ingestão de fibras solúveis estão a redução dos níveis sanguíneos de colesterol e lipídios e a diminuição da absorção de glicose pelo intestino (MCRORIE; MCKEOWN, 2019; JR; W, 2016).

Algumas fibras alimentares podem ser classificadas com prebióticos. Prebióticos são substratos seletivamente utilizados por micro-organismos do
25 hospedeiro conferindo efeitos benéficos à saúde (GIBSON et al., 2017). Os prebióticos mais comuns utilizados na dieta humana são: frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS), xilooligossacarídeos (XOS), inulina e lactulose (MARKOWIAK; ŚLIZEWSKA, 2017). Polissacarídeos como a pectina não são considerados prebióticos, porém alguns estudos têm demonstrado o potencial
30 prebiótico desta fibra (CHUNG et al., 2017).

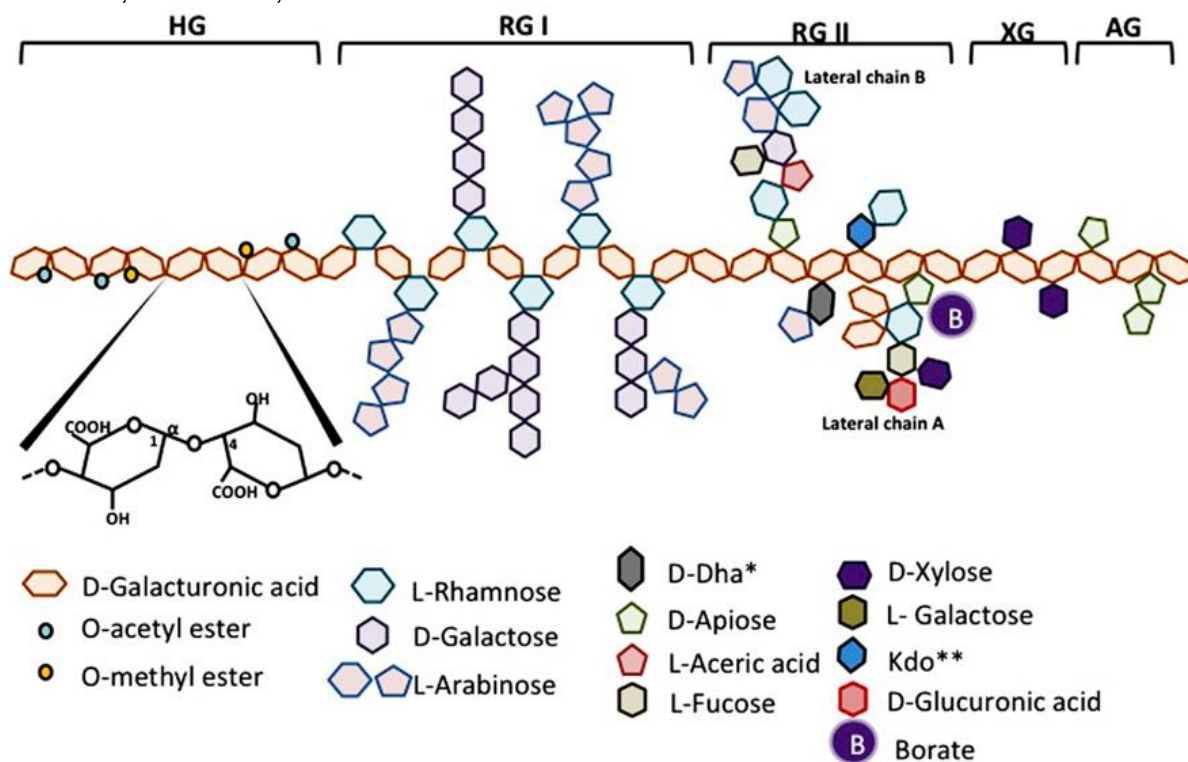
A pectina é um polissacarídeo estrutural composto principalmente por ácido galactalurônico que está geralmente associado a outros componentes da parede celular de plantas terrestres, como a celulose, hemicelulose e lignina (figura 4) (LARA-ESPINOZA et al., 2018). A pectina pode ser encontrada em quase todas as plantas,
35 mas são obtidas principalmente por meio de frutas cítricas e maçãs; porém,

recentemente, outras fontes de pectina têm ganhado importância, como o açúcar de beterraba, girassóis, resíduos da manga, amaranço, dentre outros (LARA-ESPINOZA et al., 2018).

A pectina é uma fibra solúvel que não é degradada por enzimas digestivas e seu longo tamanho impede que ela seja absorvida pelo intestino (ELIAZ; RAZ, 2019). Apesar de não ser digerida pelo organismo, a microbiota residente do ceco e cólon têm a capacidade de fermentar a pectina levando à produção de AGCC (LI; ZHANG; YANG, 2018) e, conseqüentemente, à diminuição do pH intestinal e aumento da digestão e absorção de sais minerais, como o zinco (WANG et al., 2019).

10

Figura 4. Representação esquemática da estrutura da pectina. HG – homogalactaronana; RG – rhamnogalactaronana; XG – xilogalactaronana; AG – arabinogalactano. Fonte: LECLERE; CUTSEM; MICHIELS, 2013.



*D-Dha = 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid

**Kdo = 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid

15

As fibras alimentares têm a capacidade de prevenir doenças comuns em países ocidentais devido à sua capacidade de modular nosso sistema imune. Os efeitos imunomodulatórios da pectina promovem benefícios contra diversas doenças, como inflamações induzidas por endotoxina, alergias, colite e pancreatite (SAHASRABUDHE et al., 2018).

20

Uma das formas da pectina promover benefícios para o organismo é, como comentado anteriormente, via produção de AGCC. Um estudo conduzido por Li, Zhang e Yang (2018) tinha como objetivo avaliar o efeito protetor da pectina em modelo de doença hepática não gordurosa em ratos. Observou-se que a dieta rica em pectina foi capaz de prevenir o desenvolvimento da doença e que um dos mecanismos responsáveis por esse efeito protetor foi a produção de AGCC, como o acetato e propionato.

Um estudo realizado por Yang e colaboradores (2017) visava avaliar o efeito da ingestão de pectina na fibrose intestinal induzida por radioterapia em modelo murino. O consumo de pectina foi capaz de reduzir a fibrose intestinal via modulação da microbiota intestinal e produção de AGCC (butirato, acetato e propionato). Os autores atribuem os efeitos benéficos dos AGCC tanto à ativação dos receptores acoplados à proteína G (GPR41, GPR43 e GPR109A), quanto à inibição de histonas deacetilases (HDAC).

O receptor acoplado à proteína G é ativado por AGCC e desempenham papel fundamental na regulação da homeostase e imunidade intestinal. Um trabalho sobre o efeito da dieta rica em fibra em modelo de infecção por vírus sincicial respiratório demonstrou que a ingestão de pectina promoveu efeitos antivirais e reduziu os efeitos citotóxicos da infecção mediante a produção de acetato e ativação de GPR43 nas células epiteliais do pulmão (ANTUNES et al., 2019).

Vieira e colaboradores (2017) observou o efeito terapêutico da dieta rica em fibra e um dos seus metabólitos, acetato, sobre modelo experimental de artrite gotosa. Tanto a dieta rica em pectina quanto o acetato apresentaram efeitos benéficos na resolução da inflamação através, pelo menos em parte, da ativação de GPR43. O tratamento com a fibra e o acetato resultou em menor tempo de resolução da inflamação através da indução da apoptose de neutrófilos e aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10, TGF- β e anexina A1.

Outro mecanismo associado ao efeito benéfico da pectina é por meio do bloqueio de receptores da resposta imune inata. Sahasrabudhe e colaboradores (2018) tinham como objetivo elucidar o mecanismo pelo qual a ingestão de pectina prevenia a ileíte induzida por doxorrubicina. Eles observaram que a ingestão de pectina preveniu a ileíte por meio da interação direta da fibra com o receptor do tipo toll (TLR) 2. Essa interação, por sua vez, suprime o complexo TLR2-TLR1 resultando na inibição da resposta pró-inflamatória e prevenção da ileíte.

Com base nisso, acreditamos que a pectina pode ser uma boa estratégia terapêutica para o tratamento da mucosite intestinal induzida por irinotecano.

2. JUSTIFICATIVA

A mucosite é um efeito colateral bastante comum em pacientes com câncer submetidos a quimio e radioterapia, cujo processo inflamatório gera sintomas totalmente indesejados e intoleráveis ao paciente, levando à suspensão do tratamento oncológico. Além disso, a mucosite também está associada a um maior tempo de hospitalização e, conseqüentemente, maior gasto em saúde pública. Dessa forma, a busca por novas estratégias terapêuticas para os pacientes em tratamento para o câncer é crucial. Dentre os fatores envolvidos no desenvolvimento da mucosite, a microbiota intestinal tem um papel de grande relevância. Assim, considerando que a microbiota intestinal está diretamente envolvida em diversos processos fisiológicos no organismo, e ainda, sabendo-se que a administração de quimioterápicos aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio que causará alteração no microambiente do intestino, podendo levar a um quadro de disbiose associado ao agravamento do processo inflamatório, esse trabalho visa, a busca de estratégias terapêuticas para a mucosite tendo como o principal alvo a modulação da microbiota pela dieta rica em fibra. As fibras dietéticas, em especial as solúveis, tem demonstrado efeitos benéficos e imunomoduladores de extrema importância em diversos contextos inflamatórios. Muito disso, inclusive, associado à sua capacidade de modular a produção de ácidos graxos de cadeia curta produzidos pela microbiota intestinal. Por outro lado, a deficiência em fibras, muito associado ao consumo de dietas ocidentais (uma dieta caracterizada por altas quantidades de gordura e açúcar e baixas quantidades de fibra) está acompanhado do desenvolvimento de diversas doenças, como doenças inflamatórias intestinais. O desenvolvimento dessas doenças está relacionado à baixa diversidade de microbiota intestinal ocasionando em disbiose. Nesse contexto, a principal hipótese desse trabalho é de que suplementação da dieta com fibra possa restaurar a diversidade da microbiota intestinal, revertendo a disbiose e diminuindo o processo patológico induzido pela mucosite. Sendo assim, o presente estudo visa analisar o potencial efeito da dieta rica em fibra, bem como sua deficiência, em modelo murino de mucosite induzida por irinotecano.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da dieta rica e pobre em fibra em modelo experimental murino de mucosite intestinal induzida pelo irinotecano.

5

3.2 Objetivos específicos

1. Verificar o efeito da dieta rica e pobre em fibra na mucosite intestinal induzida por irinotecano, analisando a permeabilidade intestinal e sintomas clínicos, como perda de peso e consumo de alimento.

10 2. Avaliar o efeito da ingestão de fibra na mucosite experimental sobre a resposta imunológica, analisando:

a) Mielossupressão,

b) Infiltrado de neutrófilos (MPO) e eosinófilos (EPO) nos tecidos inflamados,

c) Níveis de imunoglobulina A secretória (sIgA),

15 d) Expressão de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF) e de *Muc2*.

3. Avaliar o efeito do tratamento a nível microbiológico, analisando:

a) Modificação da microbiota intestinal por métodos dependentes de cultivo,

b) Aumento da população de enterobactérias no conteúdo intestinal.

20 4. Avaliar a produção de AGCC e o efeito da administração oral de acetato nos parâmetros clínicos associados à mucosite intestinal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

A manutenção, assim como o uso dos animais nos experimentos, foi conduzida respeitando as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, convencionais, de seis a oito semanas de idade, da linhagem C57BL/6, provenientes do Biotério Central do ICB/UFMG. Para os experimentos, os camundongos foram mantidos em mini-isoladores de modelo ALE.MIL.01.03 (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), no biotério do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, nível de biossegurança 2 (NB2). Os animais receberam ração preparada conforme descrito no item 4.2 e água filtrada *ad libitum*. Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério, e parâmetros como aeração, umidade (60-80%) e temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$) também foram controlados. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo este procedimento precedido por anestesia geral com solução de cetamina/xilazina (80-100 mg/kg de cetamina e 8-15 mg/kg de xilazina) (WIRTZ et al., 2007). Para cada experimento foram utilizados 6 animais por grupo.

Os experimentos propostos aqui foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) (anexo).

4.2 Dieta e tratamento com acetato

Os animais foram alimentados com a dieta AIN-93M ou uma das duas dietas modificadas: dieta rica em fibras (HF), contendo 15% de pectina, ou dieta pobre em fibras (ZF), contendo baixo/zero teor de fibra. A composição de cada dieta pode ser vista na tabela 1. Os camundongos que foram tratados com acetato de sódio (Sigma-Aldrich) receberam esse AGCC durante todo o experimento. O acetato foi adicionado à água potável estéril dos camundongos *ad libitum* a 150 mM e a solução de água foi trocada todos os dias para evitar contaminação e alterações significativas.

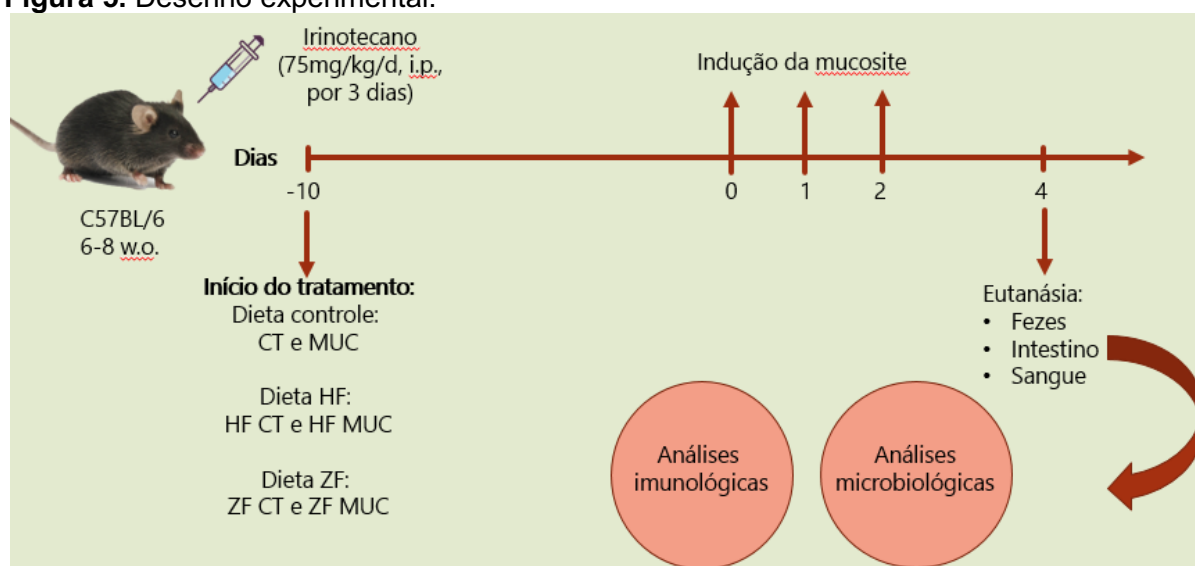
4.3 Indução de mucosite

Para indução de mucosite, foi utilizado o quimioterápico irinotecano (CTP-11) (PEDROSO et al., 2015). Os animais receberam 75 mg/kg de peso corpóreo da droga por via intraperitoneal (i.p.) em três doses, uma vez ao dia por três dias. Eles foram sacrificados quatro dias após o início da indução da mucosite (Figura 5).

Tabela 1. Composição das dietas AIN-93, HF e ZF.

Ingredientes	Quantidade (g)		
	AIN-93M	HF	ZF
BHT	0,008	0,008	0,008
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
Cistina	1,80	1,80	1,80
Mix de vitaminas	10,0	10,0	10,0
Mix de minerais	35,0	35,0	35,0
Celulose	50,0	50,0	0
Óleo de soja	40,0	40,0	40,0
Sacarose	100,0	100,0	100,0
Maltodextrina	155,0	55,0	205,0
Caseína	140,0	140,0	140,0
Amido de milho	465,7	415,7	465,7
Água destilada	300,0	300,0	300,0
Pectina	0	150,0	0

Figura 5. Desenho experimental.



4.4 Desenho experimental

5 Para avaliar o efeito da dieta rica e pobre em fibra na mucosite, os animais foram divididos em seis grupos, contendo seis animais por grupo, conforme descrito a seguir:

1. Grupo controle dieta AIN-93 - (CT),
2. Grupo mucosite dieta AIN-93 - (MUC),

3. Grupo controle dieta HF - (HF CT),
4. Grupo mucosite dieta HF - (HF MUC),
5. Grupo controle dieta ZF - (ZF CT),
6. Grupo mucosite dieta ZF - (ZF MUC).

5 Os animais começaram a receber as dietas 10 dias antes da indução da mucosite e durante todo o período do experimento até o sacrifício dos animais (Figura 3).

Após a indução da mucosite, os animais foram avaliados diariamente, às 09:00 horas, quanto à perda de peso e consumo de ração. Ao final do experimento os animais foram anestesiados para coleta de sangue (para avaliação da permeabilidade intestinal) e, em seguida, sacrificados para coleta do jejuno e íleo para realização das dosagens de MPO, EPO e citocinas. O conteúdo intestinal (intestino delgado) foi coletado para dosagem de sIgA, enquanto que a avaliação da microbiota intestinal e quantificação de AGCC foram realizadas a partir das fezes coletadas no último dia do experimento. O fêmur também foi retirado para avaliação de mielossupressão.

4.5 Avaliação clínica dos animais e consumo de alimento

A avaliação clínica dos animais foi feita pelo acompanhamento do ganho ou perda de peso e o consumo de ração. Os animais foram pesados desde o dia zero (início da indução da doença) até o dia do sacrifício e o resultado foi expresso como média da porcentagem de ganho ou perda de peso em relação ao peso do dia zero. A ração foi pesada todos os dias após a indução da doença e foi calculado o consumo de ração diário por gaiola. Os resultados foram expressos em consumo de ração (grama) por grupo.

4.6 Avaliação da mielossupressão

Para avaliação da mielossupressão, foi feita uma incisão na região acima do acetábulo, permitindo a remoção do fêmur e tíbia. O músculo foi removido a fim de expor o canal medular, cortando em seguida as extremidades epifisárias. A medula foi lavada com uma seringa de 26 gauge utilizando PBS 1X. Em seguida, a suspensão celular foi homogeneizada e centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos. O *pellet* obtido foi ressuspensionado em 2 mL de solução de lise de hemácias 1X, e incubado a 37°C por 5 minutos. Em seguida, 4 mL de PBS 1X foi adicionado, e a solução obtida foi centrifugada a 1200 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos. O sobrenadante foi

descartado e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de PBS 1X. Para contagem total das células, 5 µL da suspensão de células foi diluído em 95 µL de solução de Turk. Por fim, 10 µL da amostra foram utilizadas para contagem em câmara de Neubauer.

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

5 Sendo,

Q= quantidade de células encontradas

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

10⁴ = fator de correção

1 mL = volume final da ressuspensão celular

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

Para medula: Número de células se encontra na faixa de 10⁷ células/mL.

4.7 Determinação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi avaliada de duas formas: pela determinação da radioatividade no sangue após a administração oral de tecnécio sestamibi-ácido dietilenoaminopentacético (^{99m}Tc-DTPA) e pela fluorescência do soro através de dextrano marcado com conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC-dextrano). Após a indução da mucosite, alíquotas de 0,1 mL de solução de DTPA marcado com 18,5 megabecquerel (MBq) de ^{99m}Tc foram administradas, por gavagem, a todos os animais. Após 4 horas da administração, os camundongos foram anestesiados i.p. Em seguida, 500 µL de sangue foram coletados por punção cardíaca para determinação da radioatividade (GENEROSO et al., 2011). Para os cálculos do percentual de dose, utilizamos um padrão de dose contendo o mesmo volume de ^{99m}Tc-DTPA administrado aos camundongos, de acordo com a seguinte fórmula:

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

cpm= contagem por minuto

25

O ensaio de permeabilidade intestinal por FITC-dextrano foi realizado conforme descrito por Canesso et al. (2014). Resumidamente, os camundongos tiveram comida e água retiradas durante a noite. Os animais receberam administração oral de FITC-dextrano (50 mg por 100 g de peso corporal na concentração de 20 mg/mL, MW 4000; Sigma-Aldrich) e após 4 horas o soro foi coletado por punção cardíaca e a intensidade da fluorescência foi medida para cada amostra (excitação 492 nm; emissão 525 nm).

30

A concentração de FITC-dextrano no sangue total foi determinada com base em uma curva padrão gerada por diluições seriadas de FITC-dextrano. A permeabilidade intestinal é apresentada como μg de FITC-dextrano por mL de soro ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

5 4.8 Avaliação dos parâmetros microbiológicos – Microbiota Intestinal

Após coleta das fezes, as amostras foram pesadas e homogeneizadas em função do peso, numa diluição 10^{-2} , em PBS estéril na câmara de anaerobiose. A partir dessa diluição foram feitas novas diluições decimais no mesmo diluente. Alíquotas de 0,1 mL destas diluições foram semeadas em placas de Petri contendo ágar sangue suplementado (AS-S) com 0,1% de hemina, 0,1% de menadiona, 0,5% de extrato de levedura e 5% de sangue de carneiro desfibrinado (HOLDMAN; CATO; MOORE, 1977), ágar MRS (de Man, Rogosa & Sharpe) (Merck), e ágar Bacteroides Bile Esculina (BBE) (Difco) (LIVINGSTON; KOMINOS; YEE, 1978). A incubação total, antes da enumeração, foi de até uma semana a 37°C com leituras intermediárias. As mesmas diluições foram retiradas da câmara e usadas, também, para semear, em aerobiose, 0,1 mL em superfícies de placas de ágar sangue (AS), ágar MacConkey (Difco) e ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) (Difco) acrescido de 0,02% de azida sódica. As placas foram incubadas 24 horas a 37°C . Após a incubação e contagem das colônias crescidas, os dados foram apresentados em log de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama (g) de fezes. A lista dos meios e condições de cultura e finalidades de cada um está apresentada na Tabela 1.

Tabela 2. Meios e condições de cultura para a análise qualitativa e quantitativa do conteúdo intestinal dos animais.

Meio de cultura	Atmosfera	Tempo de incubação	Micro-organismos
AS-S	Anaerobiose	7 dias	Anaeróbios totais
Ágar BBE	Anaerobiose	7 dias	<i>Bacteroides</i> spp.
Ágar MRS	Anaerobiose	7 dias	Bactérias ácido lácticas (BAL)
AS	Aerobiose	2 dias	Aeróbios totais
Ágar McConkey	Aerobiose	1 dia	Enterobactérias
Ágar BHI azida	Aerobiose	1 dia	<i>Enterococcus</i> spp.

4.9 Avaliação dos parâmetros imunológicos

4.9.1 Medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da enzima MPO foi utilizada como índice de
5 recrutamento de neutrófilos nos tecidos (Vieira et al., 2009). Sumariamente,
fragmentos do íleo dos animais foram removidos e congelados a -80°C . Após o
descongelamento, o tecido será homogeneizado em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl,
0,02 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,015 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$) (100 mg de tecido em 1,9 mL de tampão),
utilizando-se homogeneizador de tecidos (Ultra-turrax IKA T10 basic), centrifugado a
10 10.600 g (Eppendorf 5430 R, São Paulo, SP, Brasil) por 15 minutos a 4°C . O
precipitado foi submetido à lise hipotônica (500 μL de solução de NaCl 0,2% seguido
de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos
após) para lise de hemácias. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspenso
em tampão NaH_2PO_4 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio
15 (HTAB) 0,5% (Sigma) e re-homogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram
transferidas para tubos de microcentrifugação de 1,5 mL e submetidos a três ciclos de
congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras
foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 10.600 g. O sobrenadante foi
recolhido e a atividade da MPO no precipitado ressuspenso foi calculada pela
20 medida das alterações na densidade óptica (OD) à 450 nm utilizando
tetrametilbenzidina (TMB) (1,6 mM) (Sigma) e H_2O_2 (0,5 mM). A leitura foi feita em
leitor de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) e os
resultados foram expressos pela absorbância.

4.9.2 Medida da atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO)

A atividade da enzima EPO, como quantidade relativa de eosinófilos no tecido,
foi avaliada por meio de testes enzimáticos como descrito anteriormente por Strath,
Warren e Sanderson (1985). Para tanto, para cada 100 mg de tecido (íleo) pesado, foi
adicionado 1,9 mL de PBS 5X (pH 7,2), em seguida o tecido foi homogeneizado (Ultra-
30 turrax IKA T10 basic) e centrifugado a 10.600 g/10.000 rpm (Eppendorf 5430 R, São
Paulo, SP, Brasil) por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi submetido
à lise hipotônica por adição de 500 μL de salina 0,2%, seguido pela adição de 500 μL
de salina 1,6%, suplementada com glicose 5%. Em seguida, o material foi novamente
centrifugado sob as mesmas condições anteriormente utilizadas e o sobrenadante foi

desprezado. O *pellet* foi ressuspenso em 1,9 mL de PBS (pH 7,4), contendo HTAB 0,5% para cada 100 mg de amostra. Dessa solução foi recolhida uma alíquota de 1 mL que foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, seguido de 3 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Essa amostra foi
5 centrifugada a 10.600 g por 15 minutos a 4°C e apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificação da peroxidase. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo que em cada poço, 75 µL de amostra ou branco (PBS/HTAB 0,5%) foi incubada com 75 µL de substrato [1,5 mM de *o*-fenilenodiamina, (OPD, Sigma) em tampão Tris-HCl - 0,075 µM pH 8,0 suplementado de H₂O₂ 6,6 mM]. A placa foi incubada a 20°C,
10 no escuro, por aproximadamente 30 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 1 M. A leitura ocorreu em leitor de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com filtro de 492 nm, e os resultados foram expressos como UA.

15 4.9.3 Dosagem de sIgA

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

4.10 Análise da expressão de citocinas e *Muc2*

Para avaliação da expressão de citocinas, amostras do íleo dos animais foram coletadas no último dia do protocolo experimental e colocadas em microtubos

contendo 150 µL de solução de RNA later (ThermoFisher) e armazenadas em freezer -80°C até o momento das análises. Para a dosagem de citocinas os tecidos foram submetidos à três etapas:

1. Extração do RNA;
- 5 2. Síntese de cDNA;
3. Amplificação do cDNA por qPCR;

Extração de RNA:

Para extração do RNA, *beads* magnéticas e 500 µL de Trizol (Ludwig Biotech) foram adicionados a um microtubo de 2 mL. Em seguida, os tecidos foram transferidos para os microtubos contendo as *beads* e o trizol e foram homogenizados com o auxílio do homogenizador de tecidos Precellys. Após esse processo 100 µL de clorofórmio foram adicionados ao tudo e homogeneizados vagarosamente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 *g* por 15 minutos a 4°C. Após essa etapa, o conteúdo do microtubo estará dividido em três fases: fase inferior (rosa), fase intermediária (branca) e fase aquosa superior (transparente). A fase aquosa foi transferida para um tudo de 1,5 mL e em seguida foram adicionados 200 µL de isopropanol gelado para precipitação do RNA. As amostras foram centrifugadas a 12000 *g* por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 500 µL de etanol 70% gelado e as amostras foram centrifugadas a 12000 *g* por 10 minutos a 4°C e em seguida, o sobrenadante foi descartado; essa etapa foi repetida duas vezes. Após o descarte do sobrenadante, os microtubos foram deixados abertos para que o *pellet* secasse. Em seguida, foram adicionados 40 µL de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) e o RNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific). Após esse processo, foi feita uma corrida em gel de agarose 1,5% para avaliar o estado do RNA extraído.

Para a purificação do RNA, as amostras foram purificadas com DNase I (Invitrogen) para a retirada de DNA genômico que pudesse estar presente na amostra e interferir nas análises posteriores. Posteriormente, a DNase I foi inativada para prosseguir para a etapa de síntese de cDNA.

Síntese de cDNA:

A síntese de cDNA foi feita seguindo as instruções do kit Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher). Para isso, foi preparado um mix de acordo com a tabela a seguir:

Tabela 3. Composição do mix para realização de uma reação para síntese de cDNA. DNTP – desoxinucleotídeo trifosfato

Componente	Quantidade
Buffer 10X RT	2 μ L
DNTP Mix 25X (100Mm)	0,8 μ L
Primers RT 10X	2 μ L
Inibidor de RNase	1 μ L
Água Nuclease Free	3,2 μ L
Transcriptase Reversa	1 μ L

Após o preparo do mix, 10 μ L da solução foram transferidos para um microtubo de 0,2 mL. Em seguida, 10 μ L de RNA foram adicionados ao microtubo e homogeneizados com o auxílio de uma pipeta. As amostras foram levadas ao

5 termociclador onde o programa do ciclo escolhido consistia em quatro etapas:

1. 25°C por 10 minutos;
2. 37°C por 1:30 hora;
3. 85°C por 5 minutos;
- 10 4. 4°C hold forever.

Após o ciclo no termociclador as amostras foram armazenadas em freezer - 20°C.

Amplificação do cDNA:

A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada no aparelho Applied Biosystems 15 7900HT *Fast Real Time PCR System* usando o *PowerUp™ SYBR® Green Master Mix* (Thermo). Antes de iniciar o processo de amplificação, os primers utilizados foram padronizados a 5pmol e o cDNA foi diluído em 1:10. Em seguida, para a realização da reação em uma placa de 96 poços cheia foi feito um mix conforme a seguir:

- 500 μ L *Sybr Green*;
- 20 • 50 μ L *Primer forward*;
- 50 μ L *Primer reverse*;
- 300 μ L Água Nuclease Free.

Foram colocados 8 μ L de mix e 2 μ L de amostra em cada um dos poços da placa e em seguida esta foi colocada na máquina de qPCR sob a seguintes condições:

- 25 1. 1 ciclo de 50 °C por 2 minutos;
2. 1 ciclo de 95°C por 10 minutos;

3. 40 ciclos de: 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 minuto;
4. 4 °C hold forever

A expressão dos genes alvo foi analisada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando a β -actina como referência enógena e os valores foram expressos em quantidade de gene amplificado em comparação ao grupo controle ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). A sequência de nucleotídeos de cada primer utilizado está listada na tabela 2.

Tabela 4. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para qPCR no tecido intestinal (íleo)

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
Muc2	GATGGCACCTACCTCGTTGT	GTCCTGGCACTTGTTGGAAT
IL-6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
IL-10	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT
IL-1 β	CTCCATGAGCTTTGTACAAGG	TGCTGATGTACCAGTTGGGG
TNF	ACGTGGAACTGGCAGAAGAG	CTCCTCCACTTGGTGGTTTG
β -actina	GCTGAGAGGGAAATCGTGCGTG	CCAGGGAGGAAGAGGATGCGG

10

4.11 Dosagem de AGCC

As amostras de fezes foram extraídas e ressuspendidas na proporção de 1:6 (p/v - gramas de soluto em 100 mL de solução) em H₂SO₄ 0,01 N. Em seguida, homogeneizadas em um *vórtex* durante 1 min e centrifugadas a 20 000 g durante 30 minutos, o sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de acetato de celulose com poro de 0,2 μ m. Para a dosagem dos AGCC no soro, as amostras foram diluídas na proporção de 1:3 (p/v - gramas de soluto em 100 mL de solução) em H₂SO₄ 0,01 N e homogeneizadas em um *vórtex*. Em seguida centrifugadas a 20000 g durante 30 minutos e filtrada através de uma membrana de acetato de celulose com poro de 0,2 μ m. Para as dosagens das amostras de fezes e soro foi utilizado o sistema de HPLC Shimadzu (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), equipado com um controlador de sistema CBM-20A, bomba LC-20AD, amostrador automático SIL-10 A, acoplado a um detector UV-visível SPD-10A, ajustado para 210 nm. As análises foram realizadas no modo isocrático, com fase móvel H₂SO₄ (Fluka) à 0,01 N, com vazão de 0,6 mL/min e a 55 °C, utilizando a coluna SUPELCOGEL™ C610H, 6% Crosslinked HPLC Column - 9 μ m particle size, 30 cm \times 7.8 mm (Sigma–Aldrich, St Louis, MO) e SUPELCOGEL™

25

H Guard Column (Sigma–Aldrich, St Louis, MO). Para as análises foram injetados na coluna 5 µL do extrato fecal ou soro. Foram adotadas curvas de calibração externa de sete pontos para quantificar acetato, butirato e propionato nas amostras fecais e soro, utilizando AGCC de grau analítico (Sigma-Aldrich, Milão, Itália) como padrões. As concentrações de AGCC foram expressas em µmol por miligrama de fezes úmidas e em µmol por mL de soro.

4.12 Análise estatística

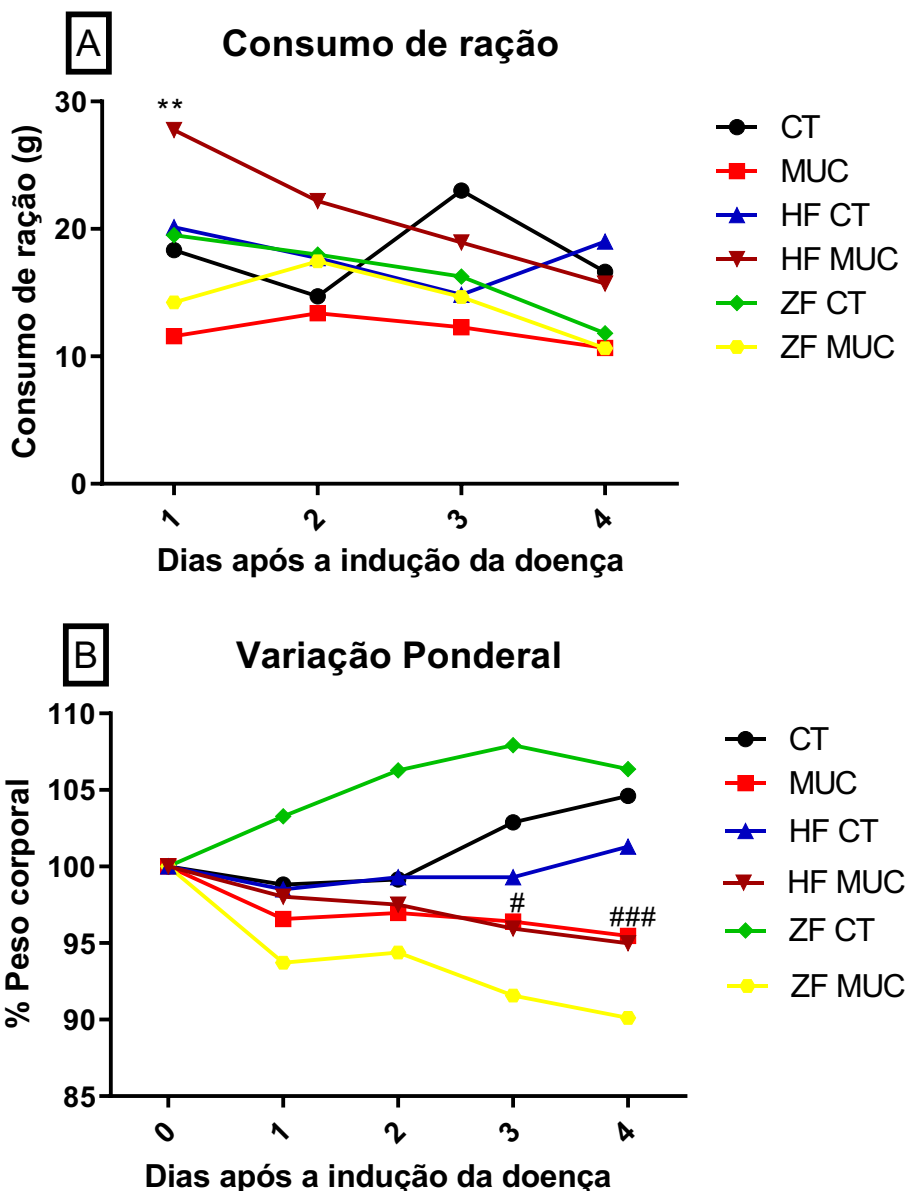
Os dados foram apresentados como a média ± erro padrão. Os dados foram analisados quanto à distribuição normal pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados normalizados foram comparados usando a análise de variância seguida pela análise post hoc de *Newman-Keuls*. A análise *Two-way* ANOVA seguida do teste de *Bonferroni* foi realizada para comparar a variação do peso corporal entre todos os grupos experimentais. Todos os dados foram analisados usando o software *GraphPad Prism* 5.0, e consideradas significativas as diferenças em que $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Consumo de alimento e desenvolvimento ponderal

Dentre os diversos sintomas da mucosite, está a perda de apetite e, devido a isso, é comum observar a perda de peso em pacientes que desenvolveram a doença. A figura 6A mostra o perfil do consumo de ração pelos animais. Podemos observar que não houve diferenças significativas quanto ao consumo de ração entre os grupos, exceto pelo dia 1, onde o grupo HF MUC consumiu mais alimento quando comparado com o grupo mucosite (MUC). A indução da mucosite não interferiu no consumo de alimento indicado pela ausência de diferenças significativas entre o grupo controle e grupo MUC. Em relação ao peso corporal dos animais, a indução da mucosite reduziu o peso corporal dos animais de forma significativa nos dias 3 e 4, em comparação ao grupo controle. Entretanto, ambas as dietas HF e ZF não acarretaram em variação de peso significativa nos grupos HF MUC e ZF MUC em relação ao grupo mucosite (figura 6B).

Figura 6. Análise do consumo de ração (A) e da variação do peso corporal (B) durante a manifestação da mucosite. Os animais receberam uma dose de irinotecano (75 mg/kg) (grupos MUC, HF MUC e ZF MUC) via i.p. nos dias 0, 1 e 2, e foram eutanasiados no dia 4. Os animais foram tratados com a dieta AIN-93, HF ou ZF (n = 6 animais por grupo). ** indica que houve diferença significativa em relação ao grupo MUC ($p < 0,01$). # e ### indicam diferenças significativas entre o grupo MUC e o grupo controle, em que $p < 0,1$ e $p < 0,01$, respectivamente. A análise estatística foi feita através do teste Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Banferroni (A e B). AIN-93 (dieta controle); HF (dieta rica em fibra); ZF (dieta pobre/zero fibra); CT (controle); MUC (grupo mucosite não tratado); HF CT (grupo controle da dieta rica em fibra); HF MUC (grupo mucosite tratado com a dieta rica em fibra); ZF CT (grupo controle da dieta pobre em fibra); ZF MUC (grupo mucosite tratado com a dieta pobre em fibra).



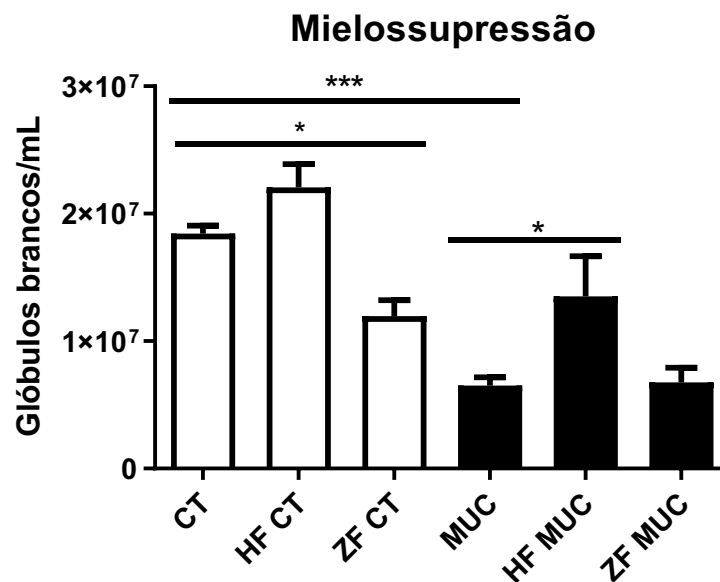
15

5.2 Mielosupressão

A mielosupressão é um efeito colateral frequente em pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico que ocasiona diminuição de glóbulos brancos pela medula

óssea devido à alta toxicidade do fármaco. Observamos que a indução da mucosite pelo irinotecano acarreta em mielossupressão, indicada pela redução de células totais da medula óssea e a ingestão de fibra reduziu o efeito tóxico do fármaco prevenindo essa redução. A ingestão de uma dieta com baixo teor em fibra ocasionou em mielossupressão que pode ser observada comparando os grupos ZF CT e CT. Os animais desafiados e que foram tratados com dieta deficiente em fibra obtiveram uma resposta semelhante ao grupo mucosite não tratado (Figura 7).

Figura 7. Avaliação do efeito protetor da dieta rica em fibra sobre a medula óssea. A mucosite foi induzida por meio de três doses diárias de irinotecano (75 mg/kg) i.p. (grupos MUC, HF MUC e ZF MUC). Os animais foram tratados com a dieta AIN-93, HF ou ZF (n = 6 animais por grupo). A administração de irinotecano acarretou em mielossupressão no grupo mucosite não tratado em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$). A ingestão de fibra solúvel minimizou o efeito tóxico do quimioterápico no grupo HF MUC acarretando em proteção da medula óssea quando comparado ao grupo mucosite não tratado ($p < 0,05$). A dieta pobre em fibra ocasionou em mielossupressão entre o grupo ZF CT e o grupo CT ($p < 0,05$). Análise estatística foi feita pelo teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. * e *** indicam diferença significativa entre os grupos com $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente. AIN-93 (dieta controle); HF (dieta rica em fibra); ZF (dieta pobre/zero fibra); CT (controle); MUC (grupo mucosite não tratado); HF MUC (grupo controle da dieta rica em fibra); HF MUC (grupo mucosite tratado com a dieta rica em fibra); ZF CT (grupo controle da dieta pobre em fibra); ZF MUC (grupo mucosite tratado com a dieta pobre em fibra).



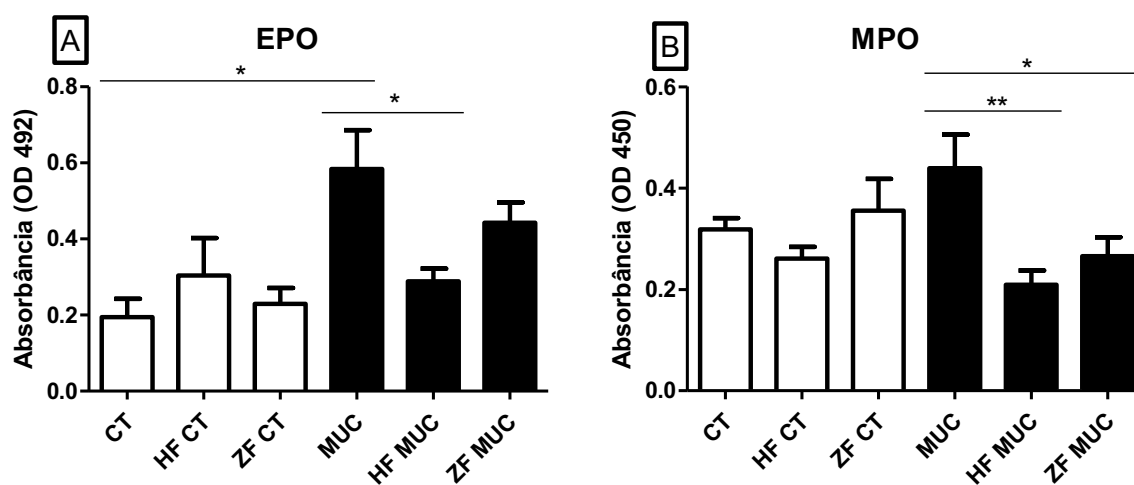
25 5.3 MPO e EPO

A indução da mucosite está frequentemente associada à presença de neutrófilos e eosinófilos no tecido intestinal. A mieloperoxidase (MPO) e a peroxidase eosinofílica (EPO) são enzimas presentes nos neutrófilos e eosinófilos, respectivamente, que têm sido utilizadas como marcadores dessas células para

quantificar o infiltrado inflamatório no tecido inflamado. A indução da mucosite aumentou significativamente o infiltrado de eosinófilos em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). O mesmo não foi observado em relação ao infiltrado de neutrófilos, onde não houve diferença significativa entre o grupo mucosite não tratado e o grupo controle, porém há uma tendência de maior infiltrado inflamatório no grupo mucosite não tratado ($p < 0,059$).

A ingestão da fibra acarretou diminuição do infiltrado tanto de eosinófilos quanto de neutrófilos ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). A ausência da fibra na dieta não apresentou diferença significativa em relação à atividade de EPO entre o grupo mucosite não tratado e o grupo mucosite tratado com a dieta pobre em fibra, porém em relação à atividade de MPO, a dieta ZF também diminuiu significativamente o infiltrado de neutrófilos ($p < 0,05$).

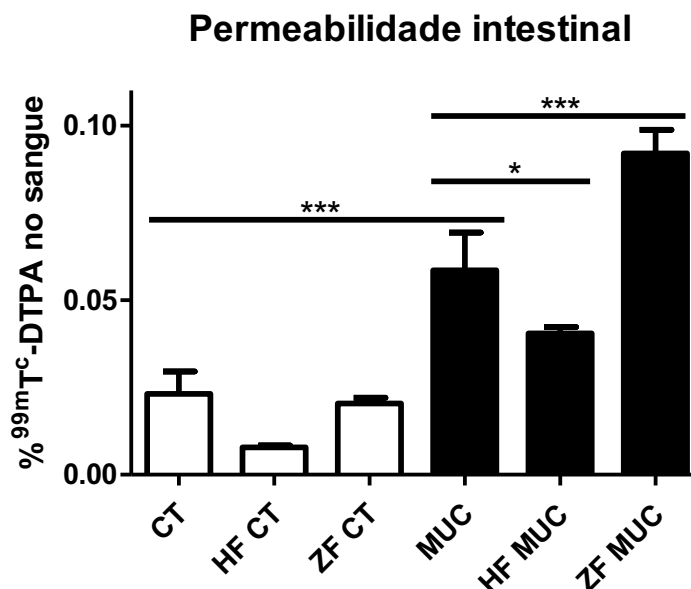
Figura 8. Avaliação do infiltrado inflamatório através da quantificação da atividade de EPO (A) e MPO (B). A mucosite foi induzida por meio de três doses diárias de irinotecano (75mg/kg) via i.p. (grupos MUC, HF MUC e ZF MUC). Os animais foram tratados com a dieta AIN-93, HF ou ZF ($n = 6$ animais por grupo). A indução da mucosite acarretou no aumento significativo da atividade de EPO no grupo MUC em relação ao grupo controle. A ingestão de fibra reduziu significativamente atividade das duas enzimas e, conseqüentemente, reduziu o infiltrado inflamatório no tecido intestinal. A dieta ZF, por sua vez, também apresentou atividade de MPO reduzida em relação ao grupo mucosite não tratado de forma significativa ($p < 0,05$), porém o mesmo não foi observado com relação à atividade de EPO. Análise estatística foi feita pelo teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. * e ** indicam diferença significativa entre os grupos com $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente. AIN-93 (dieta controle); HF (dieta rica em fibra); ZF (dieta pobre/zero fibra); CT (controle); MUC (grupo mucosite não tratado); HF CT (grupo controle da dieta rica em fibra); HF MUC (grupo mucosite tratado com a dieta rica em fibra); ZF CT (grupo controle da dieta pobre em fibra); ZF MUC (grupo mucosite tratado com a dieta pobre em fibra).



5.4 Permeabilidade intestinal

Um dos sintomas da mucosite é a formação de úlceras no tecido da mucosa gastrointestinal. Essas úlceras se originam devido à perda de integridade da barreira epitelial trazendo diversos riscos ao paciente, como, por exemplo, a translocação de bactérias do intestino para outras partes do corpo. A ingestão de fibra apresentou efeito benéfico protegendo a mucosa e diminuindo a permeabilidade intestinal. A ausência de fibras, por sua vez, não protegeu a mucosa intestinal e agravou o quadro de aumento da permeabilidade (figura 9).

Figura 9. Avaliação da permeabilidade intestinal por meio da medição da radioatividade no sangue após administração oral de DTPA marcado com tecnécio. A mucosite foi induzida por meio de três doses diárias de irinotecano (75 mg/kg) via i.p. (grupos MUC, HF MUC e ZF MUC). Os animais foram tratados com a dieta AIN-93, HF ou ZF (n = 6 animais por grupo). O desenvolvimento da mucosite acarretou no aumento da permeabilidade intestinal no grupo mucosite não tratado com relação ao grupo controle ($p < 0,001$). A ingestão de fibra solúvel minimizou o efeito do quimioterápico sobre a barreira epitelial diminuindo a permeabilidade intestinal no grupo HF MUC quando comparado com o grupo mucosite não tratado ($p < 0,05$). A ausência de fibra na dieta, por sua vez, acentuou o efeito deletério fármaco sobre a barreira epitelial em comparação ao grupo mucosite não tratado ($p < 0,001$). Análise estatística foi feita pelo teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. * e *** indicam diferença significativa entre os grupos com $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente. AIN-93 (dieta controle); HF (dieta rica em fibra); ZF (dieta pobre/zero fibra); CT (controle); MUC (grupo mucosite não tratado); HF CT (grupo controle da dieta rica em fibra); HF MUC (grupo mucosite tratado com a dieta rica em fibra); ZF CT (grupo controle da dieta pobre em fibra); ZF MUC (grupo mucosite tratado com a dieta pobre em fibra).

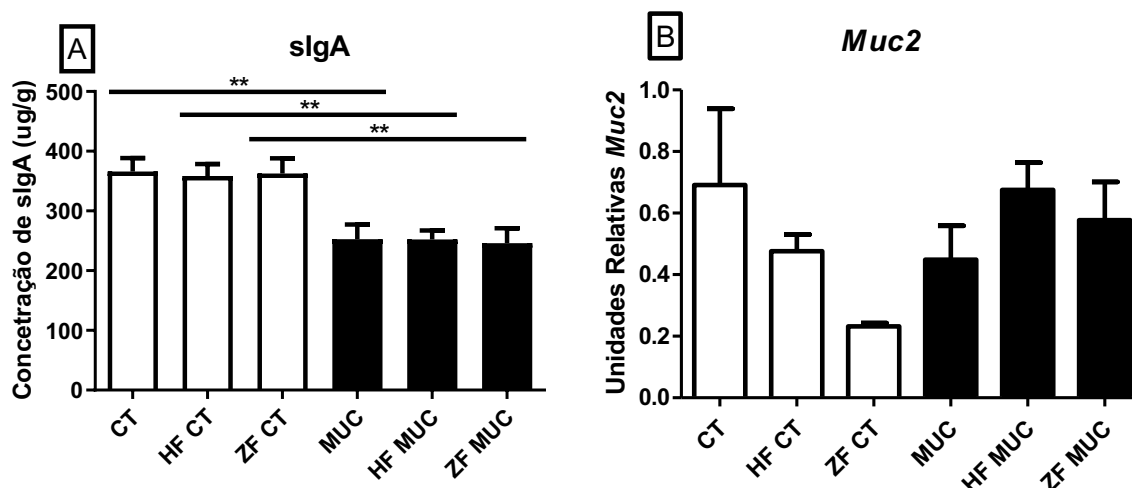


5.5 Concentração de sIgA e expressão de *Muc2*

A sIgA é um anticorpo que desempenha importante papel na resposta imune de mucosas, sendo a principal frente de defesa imunológica não específica contra patógenos. A concentração de sIgA foi determinada a partir do fluido intestinal pelo método de ELISA. Ao comparar os grupos controle entre si e os grupo mucosite entre si não foi observada diferença significativa, porém ao comparar os grupos controle e seus respectivos grupos desafiados, observou-se a diminuição da produção de sIgA de forma significativa ($p < 0,01$) (figura 10A).

A camada de muco é a barreira física que impede a colonização do epitélio intestinal por bactérias da microbiota, evitando, assim, o desenvolvimento de doenças. Ela é formada pela secreção de mucina pelas células caliciformes por meio da ativação de diversos genes, sendo *Muc2* o principal deles. A quantificação de *Muc2* foi feita por qPCR a partir da transcrição de mRNA de células do intestino. A expressão de *Muc2* não foi significativa entre os grupos (figura 10B).

Figura 10. Efeito da ingestão de fibra solúvel no intestino de delgado de camundongos com mucosite induzida por irinotecano: níveis de sIgA (A) e expressão de *Muc2* (B). A mucosite foi induzida por meio de três doses diárias de irinotecano (75 mg/kg) i.p. (grupos MUC, HF MUC e ZF MUC). Os animais foram tratados com a dieta AIN-93, HF ou ZF (n = 6 animais por grupo). A indução da mucosite diminuiu significativamente a secreção de IgA no intestino delgado do grupo mucosite não tratado em comparação ao grupo controle (A). O mesmo perfil de secreção de sIgA foi observado nos grupos HF MUC e ZF MUC quando comparados com seus respectivos controles, HF CT e ZF CT. A expressão de *Muc2* não foi significativa entre os grupos (B). Análise estatística foi feita pelo teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. ** indica diferença significativa entre os grupos com $p < 0,01$. AIN-93 (dieta controle); HF (dieta rica em fibra); ZF (dieta pobre/zero fibra); CT (controle); MUC (grupo mucosite não tratado); HF CT (grupo controle da dieta rica em fibra); HF MUC (grupo mucosite tratado com a dieta rica em fibra); ZF CT (grupo controle da dieta pobre em fibra); ZF MUC (grupo mucosite tratado com a dieta pobre em fibra).



5.6 Perfil de citocinas

Durante o quadro de mucosite as citocinas desempenham importante papel no desenvolvimento da doença. Citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF, são responsáveis por agravar os sintomas da inflamação mediante uma injúria ou presença de um patógeno. Dessa forma, controlar os níveis dessas citocinas é de extrema importância pra minimizar ou resolver a inflamação. A quantificação dessas citocinas foi feita por qPCR a partir da transcrição de mRNA de células tecido

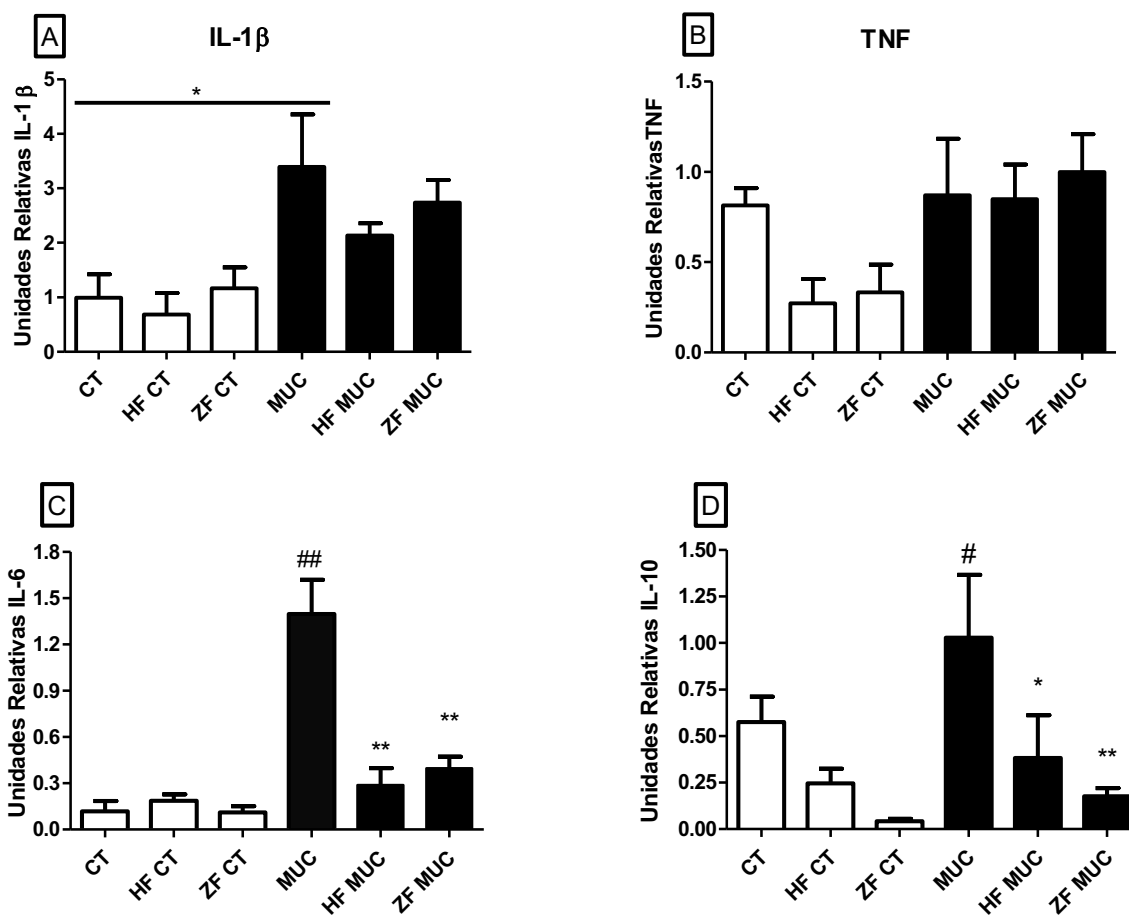
5 intestinal. A expressão de IL-1 β (figura 11A) foi significativa entre o grupo controle e mucosite, porém não foi significativa para as dietas HF e ZF. Apesar de não haver diferença significativa, há uma tendência de uma menor expressão de IL-1 β nos animais desafiados com irinotecano e tratados com a dieta HF. A expressão de TNF também não apresentou diferença estatística entre os grupos. Com relação a IL-6, a

10 indução da mucosite resultou no aumento significativo da expressão dessa citocina no grupo mucosite não tratado com relação ao grupo controle, porém o tratamento com a fibra diminuiu sua expressão de forma significativa (figura 11C).

A expressão de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, apresentou altos níveis de expressão no grupo mucosite não tratado em comparação como grupo controle. A ingestão de fibra, por sua vez, acarretou em uma menor expressão dessa citocina de

20 forma significativa (figura 11D).

Figura 11. Avaliação da expressão de citocinas pelas células do íleo em camundongos com mucosite induzida por quimioterapia: IL-1 β (A), TNF (B), IL-6 (C) e IL-10. Os animais receberam três doses diárias de irinotecano (75 mg/kg) via i.p. (grupos MUC, HF MUC e ZF MUC) e foram tratados com a dieta AIN-93, HF ou ZF (n = 6 animais por grupo). A expressão de IL-1 β aumentou significativamente no grupo mucosite não tratado em comparação ao grupo controle (A). A ingestão de fibra não acarretou em mudança da expressão de TNF nos grupos estudados (B). A indução da mucosite aumentou da expressão de IL-6 no grupo mucosite não tratado em relação ao grupo controle e tanto a ingestão de fibra quanto a ausência dela na dieta foi capaz de diminuir esses parâmetros (C). A administração de irinotecano aumentou significativamente a expressão de IL-10 no grupo mucosite não tratado em relação ao grupo mucosite tratado com a fibra (D). Análise estatística foi feita pelo teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. * e ** indicam diferença significativa em relação ao grupo MUC, com p < 0,05 e p < 0,01, respectivamente. # e ## indicam diferença significativa em relação ao grupo controle, com p < 0,05 e p < 0,01, respectivamente. AIN-93 (dieta controle); HF (dieta rica em fibra); ZF (dieta pobre/zero fibra); CT (controle); MUC (grupo mucosite não tratado); HF CT (grupo controle da dieta rica em fibra); HF MUC (grupo mucosite tratado com a dieta rica em fibra); ZF CT (grupo controle da dieta pobre em fibra); ZF MUC (grupo mucosite tratado com a dieta pobre em fibra).



20

5.7 Análises microbiológicas

A mucosite intestinal é caracterizada pela produção de ERO por meio da quebra das fitas de DNA pelo quimioterápico. O aumento da concentração de ERO

causa uma mudança no microambiente intestinal levando ao quadro de disbiose, onde há o aumento da concentração de bactérias patogênicas e diminuição de bactérias benéficas. Dessa forma buscamos analisar a composição da microbiota por métodos dependentes de cultivo em cada grupo experimental.

5 Os meios MacConkey e BHI com azida favorecem o crescimento de *Enterobacteriaceae* e *Enterococcus*, respectivamente. O aumento da concentração desses grupos bacterianos é indicativo de disbiose. Tanto o meio MacConkey (figura 12A) quanto o meio BHI com azida (figura 12B) tiveram um aumento significativo da concentração de bactérias no grupo mucosite não tratado em relação ao grupo
10 controle ($p < 0.05$), indicando uma disbiose ocasionada pelo tratamento quimioterápico. A dieta HF foi capaz reverter esse quadro, diminuindo tanto a população de *Enterococcus* sp. e *Enterobacteriaceae* ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). A dieta ZF, por sua vez, agravou o quadro de disbiose no grupo mucosite tratado com a dieta ZF aumentando significativamente a população de
15 enterobactérias em relação ao grupo mucosite não tratado ($p < 0,05$). Interessantemente, somente a administração da dieta ZF no grupo controle (ZF CT) foi capaz de interromper a homeostase intestinal e causar disbiose no grupo controle tratado com a dieta ZF, uma vez que a população de enterobactérias estava significativamente aumentada nesse grupo em relação ao grupo controle ($p < 0,001$).

20 Os meios MRS (12C) e BBE (12D) são meios seletivos, onde o primeiro seleciona o crescimento de bactérias ácido láticas e o segundo seleciona o crescimento de *Bacteroides* sp. Esses dois grupos são conhecidos por promoverem benefícios à saúde do hospedeiro por meio da proteção contra patógenos e modulação do sistema imune. Outro benefício atribuído ao gênero *Bacteroides* é o fato de serem
25 os principais produtores de AGCC a partir da fermentação de fibras. Em nosso estudo observamos que a ingestão de fibra acarretou numa maior concentração desses grupos de bactérias de forma significativa, indicando o efeito benéfico atribuído à ingestão da dieta HF.

Os meios ágar sangue e ágar sangue suplementado são meios ricos em
30 nutrientes e favorecem o crescimento de diversos grupos bacterianos. Na microbiota intestinal há a predominância de bactérias anaeróbicas devido à mucosa intestinal ser um ambiente isento de oxigênio. Comparando os dois meios, que foram incubados em atmosferas diferentes (aerobiose e anaerobiose), houve um pequeno aumento da contagem de UFC no meio ágar sangue suplementado (anaerobiose) (figura 12F) em

relação ao ágar sangue (aerobiose) (figura 12E). A ingestão de fibra preveniu a diminuição de bactérias anaeróbias no grupo mucosite tratado com a dieta HF em relação ao grupo mucosite não tratado ($p < 0,05$) (figura 12F).

5

10

15

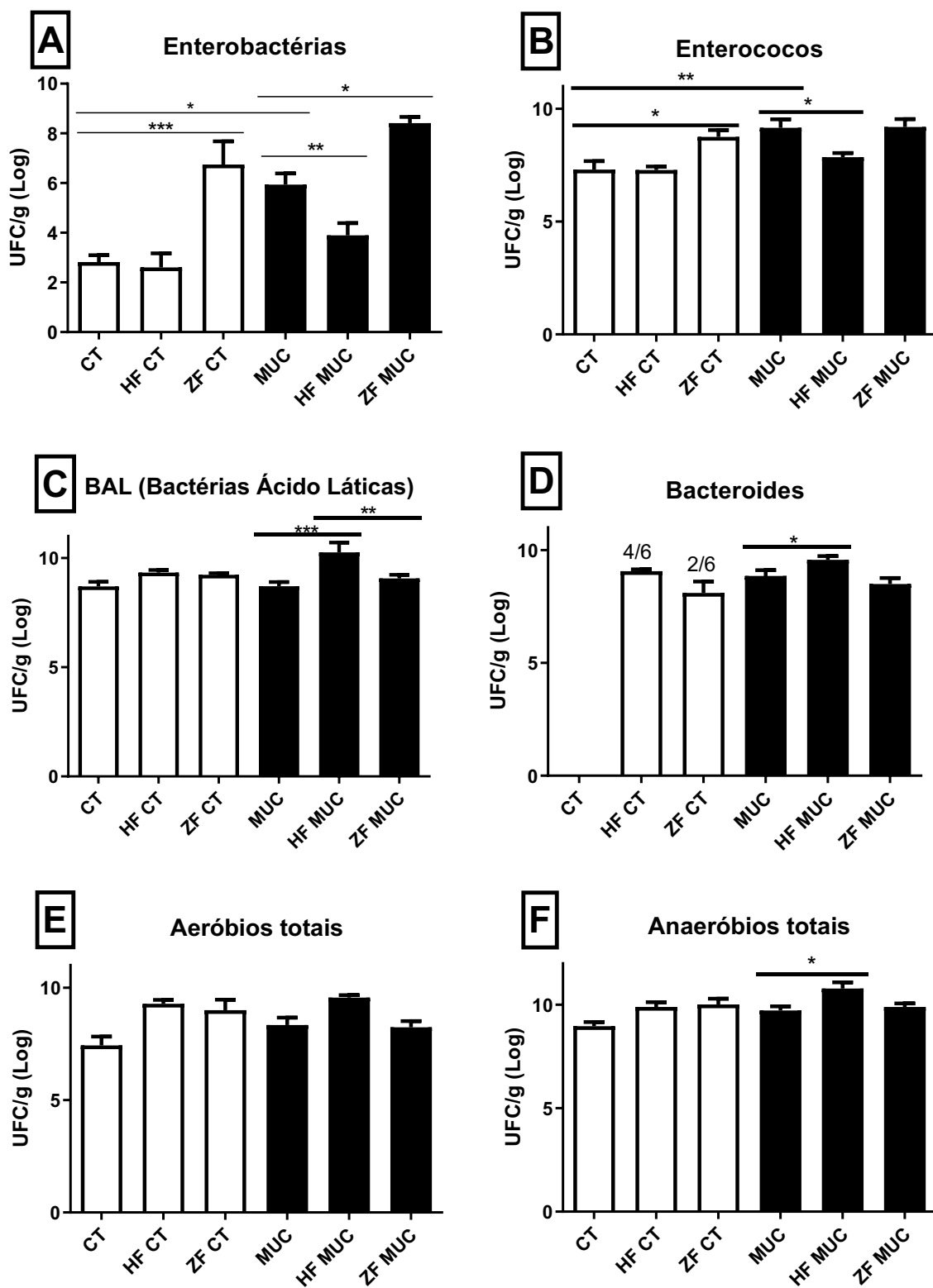
Figura 12: Quantificação de bactérias da microbiota intestinal por método dependente de cultivo pelos meios MacConkey (A), BHI (B), MRS (C), BBE (D), AS (Aeróbios totais) (E) e AS-S (Anaeróbios totais) (F). Os animais receberam três doses diárias de irinotecano (75mg/kg) via i.p. (grupos MUC, HF MUC e ZF MUC) e foram tratados com a dieta AIN-93, HF ou ZF (n = 6 animais por grupo). A indução da mucosite acarretou no aumento significativo de enterobactérias (A) e enterococos (B) no grupo mucosite não tratado em relação ao grupo controle, indicando disbiose; a ingestão de pectina manteve a homeostase intestinal, diminuindo a população desses grupos no grupo HF MUC em comparação ao grupo mucosite não tratado. A dieta HF acarretou no aumento de BAL (C) e de *Bacteroides* sp. (D), grupos bacterianos associados à promoção da saúde no hospedeiro, no grupo HF MUC comparado ao grupo mucosite não tratado. Não foram observadas diferenças significativas na contagem de aeróbios totais (E), porém a ingestão de fibra solúvel aumentou significativamente a população de anaeróbios totais (F) no grupo HF MUC em comparação ao grupo mucosite não tratado. Análise estatística foi feita pelo teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. *, ** e *** indicam diferença significativa entre os grupos com $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. AIN-93 (dieta controle); HF (dieta rica em fibra); ZF (dieta pobre/zero fibra); CT (controle); MUC (grupo mucosite não tratado); HF CT (grupo controle da dieta rica em fibra); HF MUC (grupo mucosite tratado com a dieta rica em fibra); ZF CT (grupo controle da dieta pobre em fibra); ZF MUC (grupo mucosite tratado com a dieta pobre em fibra); AS (ágar sangue); AS-S (ágar sangue suplementado); BHI (brain heart infusion); MRS (ágar Man, Rugosa, Sharpe); BBE (ágar *Bacteroides* bile esculina); BAL (bactéria ácido lácticas).

20

25

30

35



5.8 Produção de AGCC

A ingestão de pectina foi capaz de reverter a disbiose intestinal, proteger a medula óssea contra os efeitos tóxicos do irinotecano e diminuir a permeabilidade

intestinal por meio da proteção da barreira epitelial. A pectina é uma fibra solúvel que, ao ser fermentada por bactérias da microbiota, gera AGCC, como o acetato. A ingestão de fibra aumentou significativamente a produção de AGCC, principalmente acetato, em relação ao grupo controle, tanto nas fezes (figura 13A) quanto no soro (figura 13B).

Sabendo da ação imunomoduladora e dos efeitos dos AGCC no organismo, os benefícios relacionados à dieta HF na mucosite intestinal podem ser atribuídos ao aumento da concentração de acetato no organismo dos camundongos. O efeito terapêutico da administração de acetato mostrou que esse AGCC foi capaz de reverter, em parte, parâmetros clínicos relacionados ao desenvolvimento da mucosite (figura 14). Sendo assim, o efeito benéfico da dieta HF pode estar associado ao aumento da concentração de acetato; porém, uma vez que o acetato em si não foi capaz de mostrar a mesma resposta que a dieta HF, pode-se afirmar que o efeito benéfico da ingestão de fibra está além da produção de AGCC.

Figura 13. Efeito da ingestão de fibra solúvel sobre a concentração de AGCC nas fezes (A) e soro (B) dos animais. A ingestão de pectina acarretou no aumento da concentração de acetato em comparação ao grupo controle, tanto nas fezes quanto no soro. Os níveis de butirato e propionato nas fezes não variaram mediante a ingestão de fibra. A dieta ZF também não acarretou em mudança dos níveis de AGCC no soro. A dieta rica em fibra também aumentou a concentração de acetato no soro. CT (controle); AIN (dieta controle); HF (dieta rica em fibra); ZF (dieta pobre/zero fibra).

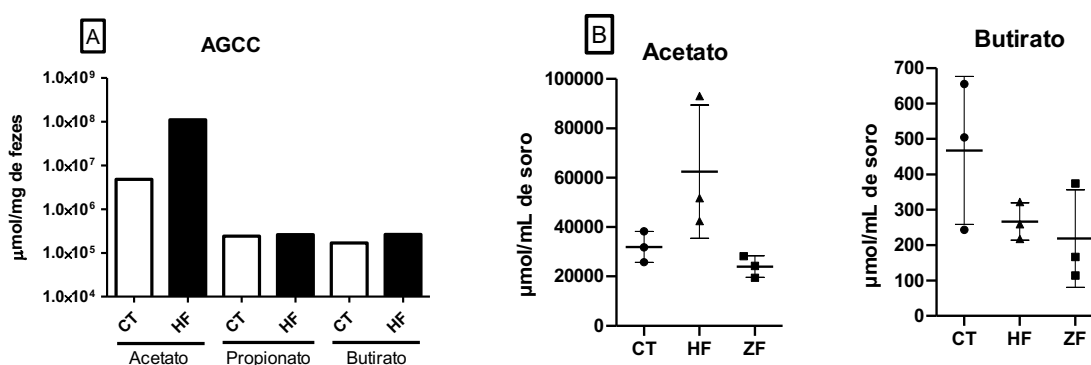
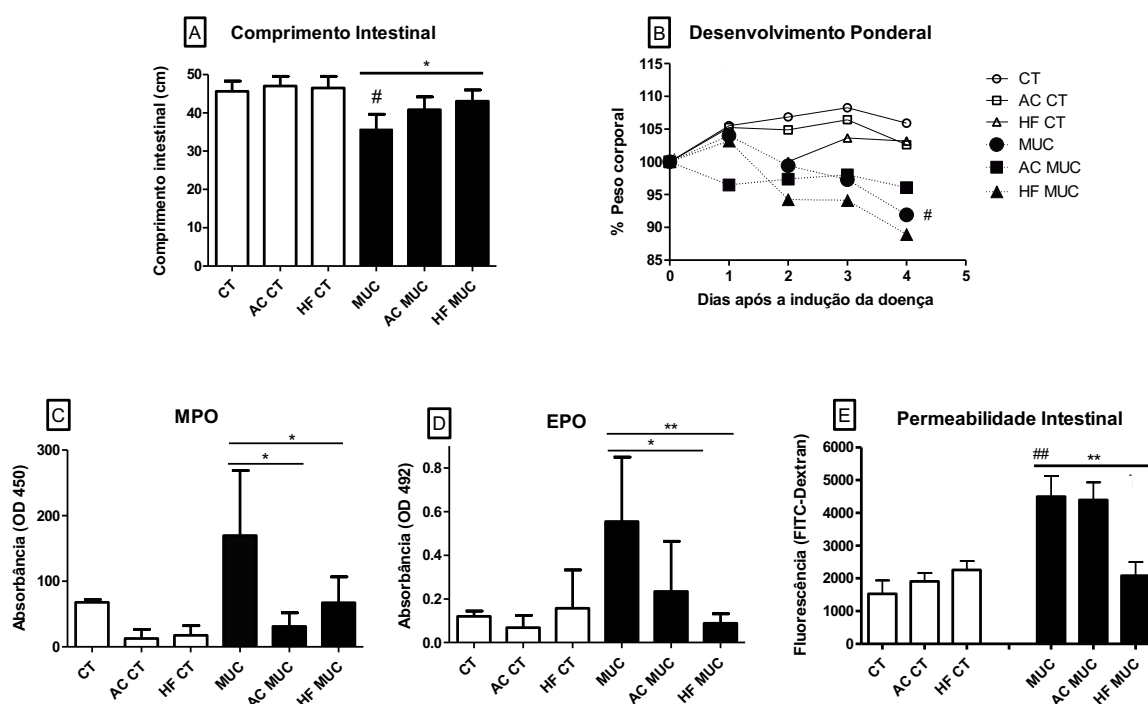


Figura 14. Efeito da dieta HF e do acetato na mucosite induzida por irinotecano. O tratamento com acetato reduziu os parâmetros clínicos induzidos pela mucosite experimental: comprimento do intestino (A), peso corporal (B), MPO (C), EPO (D) e permeabilidade intestinal (E). Os animais receberam três doses diárias de irinotecano (/kg) via i.p. (grupos MUC, AC MUC e HF MUC) e foram tratados com as dietas AIN-93 ou HF ou suplementação oral de acetato. O efeito benéfico da ingestão de fibra pode ser atribuído, em parte, pelo aumento da concentração de acetato, visto que o tratamento oral com acetato melhorou significativamente alguns parâmetros clínicos, como a redução da atividade de MPO e EPO ($p < 0,05$). Parâmetros como o comprimento e permeabilidade intestinal não foram alterados com a suplementação oral de acetato, mas foram melhorados nos grupos tratados com a fibra ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Não houve diferença significativa com relação ao tratamento oral de acetato e ingestão de fibra sobre o desenvolvimento ponderal dos animais. Análise estatística foi feita pelo teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. * e ** indicam diferença significativa entre os grupos com $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente. # e ## indicam diferença estatística com relação ao grupo controle com $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente. CT (controle); AIN (dieta controle); HF (dieta rica em fibra); MUC (grupo mucosite não tratado); HF CT (grupo controle da dieta rica em fibra); HF MUC (grupo mucosite tratado com a dieta rica em fibra); AC CT (grupo controle da suplementação oral de acetato); AC MUC (grupo mucosite tratado com acetato).

20



6. DISCUSSÃO

A mucosite intestinal é um efeito colateral comum em pacientes sob o tratamento quimioterápico devido à alta toxicidade do fármaco, acometendo 40% dos pacientes que receberam dose padrão de quimioterapia e até 100% dos pacientes que receberam altas doses de quimioterápico (GIBSON et al., 2013). O desenvolvimento da mucosite acarreta em danos da mucosa gastrointestinal gerando diversos sintomas, como a perda de peso e falta de apetite. Em nosso estudo não observamos diferenças significativas em relação à perda de peso e o consumo de alimento. Esse resultado pode explicado devido ao tempo de duração do modelo ou as lesões intestinais não foram suficientes para alterar esses parâmetros fisiológicos. Vale ressaltar que o desenvolvimento da mucosite está associado ao tratamento oncológico, dessa forma, esses parâmetros podem estar mais evidentes em humanos devido ao maior grau de imunossupressão em que se encontram.

As fibras solúveis podem ser fermentadas por bactérias da microbiota intestinal, principalmente no ceco e cólon, produzindo AGCC como o butirato, acetato e propionato. O aumento observado na concentração de acetato no cólon e no sangue mediante a ingestão de pectina pode estar associado ao efeito benéfico observado nos animais com mucosite tratados com a dieta rica em fibra, como diminuição da permeabilidade intestinal e do influxo de neutrófilos e eosinófilos. Um estudo conduzido por Vieira e colaboradores (2017) mostrou o efeito benéfico do acetato ao promover a resolução da inflamação em modelo experimental de artrite gotosa por meio da indução da apoptose nos neutrófilos e aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10, TGF- β e anexina A1. Em outro estudo, a administração oral de acetato também foi capaz de melhorar os sintomas da colite induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS) em camundongos via redução do infiltrado inflamatório, redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento da produção de IL-10 (MASUI et al., 2013).

A mielossupressão é um sintoma bastante comum em pacientes realizando quimioterapia ou radioterapia. Ela consiste na diminuição da produção de glóbulos brancos pela medula óssea devido à alta toxicidade do quimioterápico, que acarreta a inibição do crescimento e/ou gera efeito citotóxico nas células tronco que darão origem às células hematopoiéticas. Nosso trabalho observou que a ingestão de fibra teve a capacidade de minimizar o efeito citotóxico do irinotecano suavizando o quadro de mielossupressão. Nossos achados corroboram os de Song e colaboradores (2016),

onde eles observaram que suplementação da dieta com abaridoxilana, um tipo de hemicelulose proveniente do farelo de trigo, foi capaz de atenuar os sintomas da mucosite e reverter o quadro de mielossupressão ocasionado pelo uso de 5-FU. Outro estudo conduzido por Trompette e colaboradores (2018) mostrou que a ingestão de fibra apresentava efeito protetor em modelo de infecção por influenza vírus; os AGCC provenientes do metabolismo de bactérias da microbiota atuam sobre as percussoras de macrófagos na medula óssea e as diferenciam em monócitos patrulheiros (Ly6c⁻), que migram para o pulmão e se diferenciam em macrófagos contribuindo para a proteção e reparo do tecido pulmonar por consequência da infecção viral. Isso demonstra a importância da atuação da fibra e seus metabólitos sobre a medula óssea e como eles podem contribuir para modulação da resposta imune sistêmica e extra-intestinal.

No contexto da mucosite, os AGCC também apresentam efeito protetor sobre a mucosa intestinal mediante o tratamento quimioterápico. Um estudo conduzido por Ferreira e colaboradores (2012) mostrou que suplementação oral de butirato reduziu a inflamação da mucosa em modelo de mucosite induzida por 5-FU por meio da redução da produção de TNF e IL-6, bem como a redução do influxo de eosinófilos; a administração de butirato também apresentou efeito protetor sobre a barreira epitelial via diminuição da permeabilidade intestinal.

Diversas doenças intestinais e extra-intestinais estão associadas com alterações da barreira epitelial e aumento da permeabilidade intestinal (BISCHOFF et al., 2014) e as dietas ricas em fibra e os AGCC têm demonstrado importante papel na proteção da mucosa e fortalecimento da barreira epitelial. Sun e colaboradores (2017) observaram que a ingestão de pectina cítrica atenuava o quadro de pancreatite e restaurava a barreira intestinal por meio do aumento da expressão de genes moduladores da ZO, como ocludinas e zonula occludens-1 (ZO-1). Em outro estudo conduzido por Hung e Suzuki (2016) foi observado que a suplementação da dieta com fibra solúvel protegeu a mucosa intestinal de camundongos em modelo de colite induzida por DSS diminuindo a permeabilidade intestinal por meio do aumento da expressão de ocludinas, claudinas, ZO-1 e ZO-2; os autores acreditam que pelo menos parte desse efeito benéfico se deve à produção de acetato, que apresentou grandes concentrações nos grupos tratados com a fibra. Nossos achados corroboram os estudos citados, uma vez que a ingestão de fibra acarretou na diminuição da permeabilidade intestinal. Interessantemente, a ausência da fibra na dieta agravou o

efeito deletério do quimioterápico sobre a barreira epitelial aumentando a permeabilidade intestinal. Com base nisso, podemos ressaltar os benefícios atribuídos a uma dieta rica em fibra e como sua ausência ou baixo consumo pode afetar negativamente a fisiologia do indivíduo.

5 A *Westernized diet* é caracterizada pelo alto teor de proteína de origem animal, de gordura saturada, de açúcar, de álcool e de sal, e baixos teores de fibras, frutas e vegetais, contribuindo para o desenvolvimento de doenças inflamatórias, obesidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (STATOVCI et al., 2017). O consumo de dietas ricas em gordura e açúcar e pobre em fibras favorece a
10 colonização da mucosa intestinal por enterobactérias e a torna mais propensa à inflamação e mais susceptível à colite, apresentando resposta inflamatória exacerbada com produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e CXCL-1/KC (AGUS et al., 2016).

Por outro lado, a dieta mediterrânea que é caracterizada pelo alto consumo de
15 frutas, vegetais, legumes, cereais, nozes, peixe e azeite de oliva, está associada à diminuição do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e síndrome metabólica, bem como a diminuição de marcadores inflamatórios no soro (CHRIST; LAUTERBACH; LATZ, 2019). Os efeitos benéficos dessa dieta se devem ao alto teor de fibras e ácidos graxos insaturados que contribui para a homeostase do sistema
20 imune e da microbiota intestinal (CHRIST; LAUTERBACH; LATZ, 2019).

A mucosite é uma inflamação que se desenvolve a partir da ativação de NF- κ B, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF e IL-6. Dessa forma, uma estratégia para diminuir os efeitos danosos da inflamação seria a diminuição da ativação dessas citocinas por meio de uma dieta rica em fibra. Os
25 AGCC, provenientes da fermentação das fibras pela microbiota intestinal, são capazes de inibir as histonas deacetilases e, conseqüentemente, inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos. Com relação à IL-6, a indução da mucosite acarretou em uma maior expressão dessa citocina, e a ingestão de fibra diminuiu essa expressão demonstrando seu efeito imunomodulador. Nossos achados corroboram
30 os de Song e colaboradores (2016) onde a ingestão de farelo de trigo reduziu a expressão de IL-6, IL-1 β e TNF em modelo murino de mucosite induzida por 5-FU.

Apesar da ingestão de fibras estar associada à diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, em nosso estudo não houve diferença significativa na expressão de IL-1 β e TNF, embora houvesse uma tendência de uma menor expressão

de IL-1 β no grupo mucosite tratado com a dieta rica em fibra. Esse resultado pode ser explicado pela estrutura da fibra utilizada. As diferenças da estrutura molecular da pectina são atribuídas ao peso molecular, ao grau de esterificação, à distribuição de grupos carboxila no ácido galactalurônico presente no carboidrato e ao conteúdo de açúcares na molécula; e vale ressaltar que pectinas derivadas de diferentes tipos vegetais podem apresentar diferentes propriedades funcionais (FLUTTO, 2003; LARSEN et al., 2019).

Um estudo conduzido por Do Nascimento e colaboradores (2017) observou o efeito *in vitro* de duas pectinas, uma nativa e outra modificada, sobre a secreção de citocinas por macrófagos THP-1. Eles testaram diferentes concentrações e observaram que a secreção de citocinas estava relacionada com a concentração e a estrutura do polissacarídeo. A pectina nativa aumentou a secreção de TNF na maior concentração (300 μ g/mL) e diminuiu a secreção dessa citocina quando LPS (lipopolissacarídeo) era adicionado ao meio; já em relação à pectina modificada, não houve diferença na secreção de TNF e IL-1 β na presença ou na ausência do estímulo. Uma revisão feita por Popov e Ovodov (2013), mostrou que estruturas diferentes de pectina apresentavam diferentes respostas com relação a secreção de TNF mediante a um estímulo, onde a presença ou a ausência dessa secreção dependia diretamente da estrutura da fibra.

A inflamação é caracterizada pela interação entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A IL-10 é uma das principais citocinas anti-inflamatórias podendo suprimir citocinas pró-inflamatórias, limitando rompimentos do tecido causados pela inflamação (BOSHTAM et al., 2017). Nesse estudo, a expressão de IL-10 estava exacerbada no grupo mucosite não tratado e diminuída nos demais grupos. O aumento de IL-10 pode ser explicado como um mecanismo de compensação para alcançar a homeostase do sistema imune; com o aumento de IL-1 β e IL-6 observado no grupo mucosite não tratado, uma forma que o organismo teria de equilibrar a atividade pró-inflamatória dessas citocinas seria superexpressar a IL-10, uma citocina anti-inflamatória.

Sob o contexto inflamatório da mucosite, a atividade de MPO e EPO está relacionada ao infiltrado de células do sistema imune para o tecido inflamado. MPO é encontrada no compartimento secretório de neutrófilos e monócitos, enquanto que a EPO é encontrada nos granulócitos de eosinófilos (BOZEMAN; LEARN; THOMAS, 1990). Em nosso estudo, a indução da mucosite acarretou no aumento da atividade

de EPO e a ingestão de fibra solúvel foi capaz de diminuir tanto a atividade de EPO quanto a de MPO. Um estudo conduzido por Galdino e colaboradores (2018) demonstrou que a ingestão de FOS reduziu o infiltrado inflamatório do tecido intestinal de camundongos em modelo de mucosite; a fibra foi capaz de reduzir a atividade de EPO e MPO exercendo efeito anti-inflamatório na mucosa intestinal. Em outro estudo, conduzido por Sahasrabudhe e colaboradores (2018), foi observado que a ingestão de pectina foi capaz de reduzir o infiltrado de neutrófilo em camundongos em modelo de ileíte induzida por doxorribucina. Outro estudo utilizando goma de cajueiro no tratamento da mucosite induzida por 5-FU demonstrou o efeito benéfico do polissacarídeo na redução da atividade de MPO e, conseqüentemente, redução do influxo de neutrófilo para o tecido (DE MIRANDA et al., 2019). O infiltrado inflamatório durante a mucosite é caracterizado pelo influxo de neutrófilos e eosinófilos que aumenta o dano tecidual na mucosa e a resposta inflamatória; a ingestão de pectina, por sua vez, preveniu o influxo dessas células para o tecido exercendo ação anti-inflamatória.

A microbiota intestinal é um dos principais fatores que contribuem para a manutenção da homeostase intestinal e promoção da saúde no hospedeiro (DE LA FUENTE; MACDONALD; HERMOSO, 2019). A dieta é um dos diversos fatores que podem causar a ruptura da homeostase intestinal, levando a alterações na composição da microbiota e, conseqüentemente, disbiose. A dieta pobre em fibra não fornece determinados nutrientes necessários para o metabolismo de determinados grupos bacterianos, levando a uma diminuição da população de bactérias produtoras de AGCC, que desempenham papel importante na fisiologia e no sistema imune do hospedeiro (LI; LI; MA et al., 2017). A suplementação da dieta com fibra pode ser uma estratégia terapêutica para reversão da disbiose e o restabelecimento da homeostase intestinal por meio do aumento da população de bactérias produtoras de AGCC (SIRACUSA et al., 2019).

No nosso estudo, as análises microbiológicas demonstraram que a indução da mucosite acarretou em disbiose, caracterizada pelo aumento da população de *Enterobacteriaceae* e *Enterococcus* spp., e a suplementação da dieta com fibra reverteu esse quadro diminuindo a contagem desses grupos. Um estudo conduzido por Maharshak e colaboradores (2015), mostrou que *Enterococcus faecalis*, uma bactéria da microbiota indígena, quando em disbiose, aumentava a permeabilidade intestinal por meio da expressão de gelatinase e ativação do receptor ativado por

protease 2 (PAR2) em modelo *in vitro* e *ex vivo*. Outro estudo realizado por Steck e colaboradores (2011), também mostrou o papel de *E. faecalis* e a expressão de gelatinase no aumento da permeabilidade intestinal em modelo murino. As gelatinases são metaloproteases que podem romper a barreira intestinal por meio da degradação de E-caderinas, proteínas da ZO responsáveis por regular a barreira epitelial e promover a adesão célula-célula.

As enterobactérias são normalmente encontradas em níveis baixos no intestino e localizadas próximas à mucosa intestinal devido à sua tolerância ao oxigênio difundido do epitélio, dessa forma o aumento da população de enterobactérias está frequentemente associado ao desequilíbrio da microbiota intestinal e desenvolvimento do quadro de disbiose (ZENG; INOHARA; NUÑEZ, 2017). No presente estudo, não somente a indução da mucosite como também o consumo de uma dieta pobre em fibra, acarretaram em disbiose indicada pelo aumento exacerbado da população de *Enterobacteriaceae* tanto no grupo mucosite tratado com a dieta ZF quanto no grupo controle da dieta ZF. Um estudo conduzido por Desai e colaboradores (2016) demonstrou que uma dieta pobre em fibra leva à degradação da camada de muco, devido ao aumento de bactérias degradadoras de muco, e deixando o epitélio propenso à colonização por bactérias, como *Citrobacter rodentium*, uma *Enterobacteriaceae* que possui mecanismos de patogênese similar à linhagens patogênicas de *Escherichia coli* em humanos.

A ingestão de pectina levou ao aumento de *Bacteroides* sp. e BAL. Esses grupos são conhecidos por conferirem benefícios à saúde do hospedeiro; o primeiro por conter bactérias produtoras de AGCC e o segundo, por conter espécies probióticas. Um estudo conduzido por Hu e colaboradores (2019) mostrou que a suplementação da dieta com pectina favorecia o crescimento de bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Bacteroides* em camundongos C57BL/6, demonstrando a capacidade da fibra de modular a microbiota e manter a homeostase. Em outro estudo, conduzido por Larsen e colaboradores (2019), foi observado também que a concentração de *Bacteroides* aumentou na presença de pectina. O aumento da população de bactérias, supostamente do gênero *Bacteroides*, pode ser explicada pelo fato de que esse gênero são os degradadores primários de pectina no cólon, levando ao aumento da concentração de AGCC, e também porque a pectina possui em sua composição ácido galactalurônico e galactose e a maioria das espécies da filo Bacteroidetes é conhecida por crescerem na presença desses compostos.

A camada de muco que reveste a mucosa intestinal é composta, principalmente, por mucinas que são secretadas pelas células caliciformes e é uma importante barreira física para evitar que bactérias do lúmen intestinal entrem em contato direto com o epitélio, evitando quadros inflamatórios e infecções (HINO et al., 2013). Diversos genes estão associados à formação e regulação da barreira de muco, como *Muc5a*, *Tff1*, *Tff3*, *Klf3* e *Muc2* (DESAI et al., 2016). Por ser o gene de maior relevância para a manutenção da camada de muco, buscamos analisar a expressão de *Muc2* na mucosite. Nossos resultados não foram significativos para a expressão de *Muc2* no íleo. Um estudo realizado por Hino e colaboradores (2013) observou o efeito da ingestão de diversas fibras alimentares, dentre elas a pectina. A ingestão de pectina foi capaz de aumentar a expressão de genes, como *Muc2*, no intestino delgado de ratos; porém, o aumento da expressão de *Muc2* foi observado somente no jejuno. No íleo não houve diferença da expressão desse gene entre os grupos, corroborando nossos achados.

Embora nossos resultados não sejam significativos para a expressão de *Muc2*, observamos uma tendência de uma maior expressão desse gene no grupo mucosite tratado com a dieta pobre em fibra quando comparado ao grupo mucosite não tratado. Um estudo conduzido por Desai e colaboradores (2016) mostrou que a dieta pobre em fibra está associada à diminuição da espessura da camada de muco, pois bactérias da microbiota passam a utilizar as glicoproteínas da mucina como alternativa à falta de nutrientes atribuída à dieta pobre em fibra. Eles observaram que a expressão de *Muc2* estava levemente aumentada nesse grupo como um mecanismo compensatório para a degradação de mucina.

Assim como a mucina, sIgA contribui para a manutenção da homeostase e regulação da microbiota intestinal. A sIgA é um anticorpo secretado por membranas mucosas, principalmente o intestino delgado, altamente responsivo para a presença de bactérias da microbiota e patógenos (FAGARASAN; MACPHERSON, 2015). Em nosso estudo foi realizado a quantificação de sIgA no fluido do intestino delgado. Observamos que a ingestão de pectina, bem como a dieta pobre em fibra, não influenciou na secreção de sIgA; porém, foi observado que a indução da mucosite diminuiu a secreção de sIgA em todos os grupos. Um estudo conduzido por Wilms e colaboradores (2019) mostrou que a suplementação de fibra em adultos jovens e idosos saudáveis não acarretou em mudança dos níveis de sIgA. Em contraste, um estudo realizado por Zhang e colaboradores (2019) e outro por Lim e colaboradores

(1997) mostraram que oligossacarídeos derivados da pectina e a pectina aumentavam as concentrações de sIgA no intestino delgado de camundongos e ratos saudáveis.

As discrepâncias de resultados relacionados à suplementação da dieta com pectina e a secreção de IgA pelas células do intestino podem ser explicadas por, pelo menos, três fatores: (i) estrutura da molécula de pectina, (ii) composição da microbiota intestinal e (iii) produção de AGCC. Primeiro, os diferentes tipos de pectina estão associados a diferentes efeitos no organismo e o tipo de resposta à ingestão da pectina depende da estrutura molecular do polissacarídeo. Segundo, a modulação da microbiota intestinal e o favorecimento do crescimento de determinados grupos bacterianos depende diretamente da estrutura da pectina; pectinas com baixo grau de esterificação estimulam o crescimento de bifidobactérias e *Prevotella* spp., enquanto pectinas com alto grau de esterificação diminuem a concentração do gênero *Bacteroides* (LARSEN et al., 2019). O estudo de Zhang e colaboradores (2019) mostrou a correlação da microbiota com o aumento da concentração de imunoglobulinas; *Bacteroides* é capaz de induzir a produção de sIgA aumentando a ativação de genes nas células B, que são as células que se diferenciam em células plasmáticas e estas, por sua vez, produzem anticorpos, como IgA. Terceiro, além de participar diretamente da secreção de IgA, a microbiota pode participar indiretamente por meio da produção de AGCC. Os AGCC podem promover a produção de sIgA via GPR43, um receptor expresso tanto em células epiteliais quanto células imunes. Tan e colaboradores (2016), observaram que a dieta rica em fibra aumentava a concentração de AGCC e, conseqüentemente, de sIgA, e diminuía a alergia alimentar em camundongos. Esse feito dependia de GPR43, uma vez que o modelo *knockout* para esse receptor agravava o quadro de alergia mediante a diminuição da concentração de sIgA no intestino.

7. CONCLUSÃO

A suplementação da dieta com fibra acarretou em melhora dos parâmetros clínicos da mucosite por meio da diminuição da permeabilidade intestinal, proteção da medula óssea e reversão do quadro de disbiose. A ausência de fibras, por sua vez, exacerbou a população de bactérias patobiômicas, diminuindo a diversidade de bactérias da microbiota intestinal, e acentuou o efeito deletério do quimioterápico sobre a barreira intestinal, por meio do aumento da permeabilidade. A produção de AGCC devido a ingestão de pectina é responsável, em parte, pelo efeito benéfico da dieta rica em fibra visto que a administração oral de acetato melhorou apenas alguns parâmetros clínicos da mucosite, como EPO e MPO. Dessa forma, nossos resultados sugerem a importância da ingestão de fibras na composição da microbiota e manutenção da homeostase, bem como o entendimento dos riscos que uma dieta deficiente em fibra pode trazer durante o tratamento quimioterápico.

8. REFERÊNCIAS

- AGUS, A. et al. Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive E. coli infection and intestinal inflammation. **Scientific Reports**, v. 6, 8 jan. 2016.
- 5 ANTUNES, K. H. et al. Microbiota-derived acetate protects against respiratory syncytial virus infection through a GPR43-type 1 interferon response. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2019.
- BISCHOFF, S. C. et al. Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. **BMC Gastroenterology**, v. 14, n. 1, 18 nov. 2014.
- 10 BOSHTAM, M. et al. Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. **Inflammation**, 1 fev. 2017.
- BOZEMAN, P. M.; LEARN, D. B.; THOMAS, E. L. Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. **Journal of Immunological Methods**, v. 126, n. 1, p. 125–133, 24 jan. 1990.
- 15 CANESSO, M. C. C. et al. Comparing the effects of acute alcohol consumption in germ-free and conventional mice: The role of the gut microbiota. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 240, 16 set. 2014.
- CARDING, S. et al. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 26, n. 0, 2015.
- 20 CHUNG, W. S. F. et al. Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 11, 1 nov. 2017.
- CHRIST, A.; LAUTERBACH, M.; LATZ, E. Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. **Immunity**, v. 51, n. 5, p. 794–811, nov. 2019.
- 25 DALILE, B. et al. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 8, p. 461–478, 1 ago. 2019.
- DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the**
- 30 **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14691–14696, 2010.
- DE LA FUENTE, M.; MACDONALD, T. T.; HERMOSO, M. A. Editorial: Intestinal Homeostasis and Disease: A Complex Partnership Between Immune Cells,

- Non-Immune Cells, and the Microbiome. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 13 dez. 2019.
- DE MIRANDA, J. A. L. et al. Protective Effect of Cashew Gum (*Anacardium occidentale* L.) on 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 2, p. 51, 3 abr. 2019.
- DESAL, M. S. et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. **Cell**, v. 167, n. 5, p. 1339- 1353.e21, 17 nov. 2016.
- DHINGRA, D. et al. Dietary fibre in foods: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 255–266, 2012.
- DO NASCIMENTO, G. E. et al. The influence of sweet pepper pectin structural characteristics on cytokine secretion by THP-1 macrophages. **Food Research International**, v. 102, p. 588–594, 1 dez. 2017.
- DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 20–32, 2015.
- ELIAZ, I.; RAZ, A.. Pleiotropic effects of modified citrus pectin. **Nutrients**, v. 11, n. 11, 2019.
- ENGEN, P. A; et al. The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. **Alcohol research : current reviews**, v. 37, n. 2, p. 223–36, 2015.
- FAGARASAN, S.; MACPHERSON, A. J. The Regulation of IgA Production. *In: Mucosal Immunology: Fourth Edition*. [s.l.]: Elsevier Inc., 2015, v. 1–2, p. 471–484.
- FALZONE, L.; SALOMONE, S.; LIBRA, M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. NOV, p. 1300, 13 nov. 2018.
- FERNANDES, A. G.; MAFRA, D. Zinco e câncer: uma revisão. **Revista Saúde.Com**, v. 1, n. 2, p. 144–156, 2005.
- 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, jul. 2012.

- FLUTTO, L. PECTIN | Properties and Determination. In: **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. [s.l.] Elsevier, 2003. p. 4440–4449.
- FROST, G. et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. **Nature Communications**, v. 5, 29 abr. 2014.
- 5 FUJITA, K. I. et al. Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, p. 12234-12248, 21 nov. 2015.
- GALDINO, F. M. P. et al. Pretreatment and treatment with fructo-oligosaccharides attenuate intestinal mucositis induced by 5-FU in mice. **Journal of Functional**
10 **Foods**, v. 49, p. 485–492, 1 out. 2018.
- 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.
- 15 GIBSON, R. J. et al. Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. **Supportive Care in Cancer**, v. 21, n. 1, p. 313–326, 2013.
- GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the
20 definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491-502, 1 ago. 2017.
- GIFONI, M. A. C. **Mucosite e alterações de permeabilidade intestinal em pacientes portadores de câncer colorretal metastático tratados com 5-Fluorouracil (5-FU) e Irinotecano (CPT-11)**. Tese (Doutorado) - Curso de
25 Ciências Biológicas, Fundação Antônio Prudente, Fortaleza, 2012.
- HINO, S. et al. Low-Methoxyl Pectin Stimulates Small Intestinal Mucin Secretion Irrespective of Goblet Cell Proliferation and Is Characterized by Jejunum Muc2 Upregulation in Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 143, n. 1, p. 34–40, 2013.
- HOLDMAN, L. V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. C. *Anaerobe Laboratory Manual*.
30 Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, p. 156, 1977.

- HOLSCHER, H. D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. **Gut Microbes**, v. 8, n. 2, p. 172–184, 2017.
- HU, H. et al. Role of the Gut Microbiota and Their Metabolites in Modulating the Cholesterol-Lowering Effects of Citrus Pectin Oligosaccharides in C57BL/6 Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2019.
- HUNG, T. VAN; SUZUKI, T. Dietary Fermentable Fiber Reduces Intestinal Barrier Defects and Inflammation in Colitic Mice. **The Journal of Nutrition**, v. 146, n. 10, p. 1970–1979, 1 out. 2016.
- JR, P.; W, Y. A Review of Physiological Effects of Soluble and Insoluble Dietary Fibers. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 06, n. 02, 2016.
- KUNIMOTO, T. et al. Antitumor Activity of 7-Ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin, a Novel Water-Soluble Derivative of Camptothecin, against Murine Tumors. **Cancer Research**, v. 47, n. 22, p. 5944–5947, 1987.
- LARA-ESPINOZA, C. et al. Pectin and pectin-based composite materials: Beyond food texture. **Molecules**, v. 23, n. 4, 2018.
- LARSEN, N. et al. Potential of pectins to beneficially modulate the gut microbiota depends on their structural properties. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, 2019.
- LECLERE, L.; CUTSEM, P. VAN; MICHIELS, C. Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, 2013.
- LEOCÁDIO, Paola Caroline Lacerda. **EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM L-ARGININA NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS**. 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
- LI, D. et al. Dietary Fiber Gap and Host Gut Microbiota. 2017. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/313889390>>. Acesso em: 28 dez. 2019.
- LI, W.; ZHANG, K.; YANG, H. Pectin Alleviates High Fat (Lard) Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice: Possible Role of Short-Chain Fatty Acids and Gut Microbiota Regulated by Pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 30, p. 8015–8025, 2018.
- LIM, B. O. et al. Dietary Fibers Modulate Indices of Intestinal Immune Function in Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 5, p. 663–667, 1997.

- LIMA, V. **EVIDÊNCIAS DA PARTICIPAÇÃO DE TNF- α E COX-2 NAS MUCOSITES ORAL E INTESTINAL INDUZIDAS POR 5-FLUOROURACIL E METOTREXATO EM ANIMAIS**. 2004. 212 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.
- 5 LIVINGSTON, S. J.; KOMINOS, S. D.; YEE, R. B. New medium for selection and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 448-453, 1978.
- MAHARSHAK, N. et al. Enterococcus faecalis gelatinase mediates intestinal permeability via protease-activated receptor 2. **Infection and Immunity**, v. 83, 10 n. 7, p. 2762–2770, 2015.
- MAKKI, K. et al. Cell Host & Microbe The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. 2018.
- MARKOWIAK, P.; ŚLIZEWSKA, K.. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, 2017.
- 15 MASUI, R. et al. G protein-coupled receptor 43 moderates gut inflammation through cytokine regulation from mononuclear cells. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, n. 13, p. 2848–2856, dez. 2013.
- MCRORIE, J. W; MCKEOWN, N. M. Understanding the Physics of Functional Fibers in the Gastrointestinal Tract: An Evidence-Based Approach to Resolving 20 Enduring Misconceptions about Insoluble and Soluble Fiber. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 117, p. 251–264, 2017.
- MENEZES, Zélia. **Colonização de *Enterobacteriaceae* e seu papel crucial na resposta inflamatória aguda através da regulação da produção de corticosterona**. 2014. 109 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, 25 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014
- NICOLUCCI, A. C. et al. Prebiotics Reduce Body Fat and Alter Intestinal Microbiota in Children Who Are Overweight or With Obesity. **Gastroenterology**, v. 153, n. 3, p. 711–722, 2017.
- 30 NIELSEN, D. L. et al. Implications of ABCG2 expression on irinotecan treatment of colorectal cancer patients: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1926, 7 set. 2017.

- O'GRADY, J.; O'CONNOR, E. M.; SHANAHAN, F. Review article: dietary fibre in the era of microbiome science. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 49, n. 5, p. 506–515, 2019.
- OYAGA-IRIARTE, E. et al. Prediction of irinotecan toxicity in metastatic colorectal cancer patients based on machine learning models with pharmacokinetic parameters. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 140, n. 1, p. 20–25, 1 maio 2019.
- PAIXÃO, L. A.; CASTRO, F. F. dos S.. Colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro - doi: 10.5102/ucs.v14i1.3629. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 85–96, 2016.
- PANDEY, K. R.; NAIK, S. R.; VAKIL, B. V. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7577–7587, 2015.
- PEDROSO, Silvia Helena Sousa Pietra. **PAPEL DA MICROBIOTA INTESTINAL NO DESENVOLVIMENTO E GRAVIDADE DE MUCOSITE INDUZIDA POR IRINOTECANO EM MODELO MURINO**. 2014. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014
- PEDROSO, S. et al. Evaluation of mucositis induced by irinotecan after microbial colonization in germ-free mice. **Microbiology**, v. 161, n. 10, p. 1950–1960, 1 out. 2015.
- POPOV, S. V.; OVODOV, Y. S. Polypotency of the immunomodulatory effect of pectins. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 7, p. 823–835, 2013.
- RODRÍGUEZ, J. M. et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life, 2015.
- RUBIRA, E. A. et al. Sobrecarga e qualidade de vida de cuidadores de criança e adolescentes com câncer em tratamento quimioterápico. **ACTA Paulista de Enfermagem**, v. 25, n. 4, p. 567–573, 2012.
- SAHASRABUDHE, N. M. et al. Dietary fiber pectin directly blocks toll-like receptor 2-1 and prevents doxorubicin-induced ileitis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, 2018.
- SIRACUSA, F. et al. Dietary habits and intestinal immunity: From food intake to CD4+TH cells. **Frontiers in Immunology**, v. 10 , 2019.
- SLAVIN et al. A review of the role of soluble fiber in health with specific reference to

- wheat dextrin. **Journal of International Medical Research**, v. 37, n. 1, p. 1–17, 2009.
- SOARES, P. M. G. **MUCOSITE INTESTINAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL**: Papel de IL-1, IL-4, PAF, e avaliação das alterações da motilidade digestiva. 2008. 142 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- SONG, M. et al. Wheat bran arabinoxylan supplementation alleviates 5-fluorouracil induced mucositis and myelosuppression in BALB/c mice. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 312–320, 2016.
- 10 SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 4, n. 4, p.277-284, abr. 2004. Springer Nature.
- STATOVCI, D. et al. The impact of western diet and nutrients on the microbiota and immune response at mucosal interfaces. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUL, 2017.
- 15 STECK, N. et al. Enterococcus faecalis metalloprotease compromises epithelial barrier and contributes to intestinal inflammation. **Gastroenterology**, v. 141, n. 3, p. 959–971, 2011.
- STRATH, M.; WARREN, D. J.; SANDERSON, C. J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **Journal of Immunological Methods**, v. 83, n. 2, p. 209–215, 7 nov. 20 1985.
- STRINGER, A. Interaction between Host Cells and Microbes in Chemotherapy-Induced Mucositis. **Nutrients**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.1488-1499, 29 abr. 2013.
- SUN, Y. et al. Low-methoxyl lemon pectin attenuates inflammatory responses and improves intestinal barrier integrity in caerulein-induced experimental acute 25 pancreatitis. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 61, n. 4, 2017.
- TAN, J. et al. Dietary Fiber and Bacterial SCFA Enhance Oral Tolerance and Protect against Food Allergy through Diverse Cellular Pathways. **Cell Reports**, v. 15, n. 12, p. 2809–2824, 2016.
- 30 THURSBY, E.; JUGE, N.. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 11, p. 1823–1836, 2017.

- TROMPETTE, A. et al. Dietary Fiber Confers Protection against Flu by Shaping Ly6c- Patrolling Monocyte Hematopoiesis and CD8+ T Cell Metabolism. **Immunity**, v. 48, n. 5, p. 992- 1005.e8, 15 maio 2018.
- TUNGLAND, B. Dysbiosis of the Microbiota: Therapeutic Strategies Utilizing Dietary Modification, Pro- and Prebiotics and Fecal Transplant Therapies in Promoting Normal Balance and Local GI Functions. In: **Human Microbiota in Health and Disease**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 381–419.
- VAN VLIET, M. J. et al. The Role of Intestinal Microbiota in the Development and Severity of Chemotherapy-Induced Mucositis. **Plos Pathogens**, [s.l.], v. 6, n. 5, p.1-7, 27 maio 2010. Public Library of Science (PLoS).
- VIEIRA, A. T. et al. Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. **American Journal of Pathology**, v. 175, n. 6, p. 2382–2391, dez. 2009.
- VIEIRA, A. T. et al. Dietary fiber and the short-chain fatty acid acetate promote resolution of neutrophilic inflammation in a model of gout in mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 101, n. 1, p. 275–284, jan. 2017.
- WANG, Z et al. Effect of pectin oligosaccharides and zinc chelate on growth performance, zinc status, antioxidant ability, intestinal morphology and short-chain fatty acids in broilers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 103, n. 3, p. 935–946, 2019.
- WILKINS, Lamont J.; MONGA, Manoj; MILLER, Aaron W. Defining Dysbiosis for a Cluster of Chronic Diseases. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.
- WILMS et al. The Impact of Pectin Supplementation on Intestinal Barrier Function in Healthy Young Adults and Healthy Elderly. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1554, 2019.
- XU, Y.; VILLALONA-CALERO, M. A. Irinotecan: Mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. **Annals of Oncology**, v. 13, p. 1841-1851, 1 dez. 2002.
- YANG, J. et al. Soluble Dietary Fiber Ameliorates Radiation-Induced Intestinal Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Fibrosis. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 41, n. 8, p. 1399–1410, 2017.
- YANG, Y.; MA, S.; WANG, X.; et al. Modification and Application of Dietary Fiber in Foods. **Journal of Chemistry**, v. 2017, p. 1–8, 2017.

ZENG, M. Y.; INOHARA, N.; NUÑEZ, G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. **Mucosal Immunology**, 1 jan. 2017.

ZHANG, S. et al. Regulatory Roles of Pectin Oligosaccharides on Immunoglobulin Production in Healthy Mice Mediated by Gut Microbiota. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 63, n. 14, 2019.

9. FINANCIAMENTO

Este projeto foi financiado pelo Programa de Apoio a Núcleos Emergentes / Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (PRONEM/Fapemig), “Estratégias bioterapêuticas de imuno-modulação da mucosite”, no valor global de R\$ 5 567.086,86, sob coordenação do Prof. Flaviano dos Santos Martins.

10. ANEXO



Universidade Federal de Minas Gerais

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CERTIFICADO/CERTIFICATE

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

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

We hereby certify that the Protocol nº. 186/2012, related to the Project entitled “*Study of intestinal disorders associated with the use of chemotherapy and the therapeutic action of probiotics in animal experiments*”, under the supervision of **Flaviano dos Santos Martins**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 07/04/2012. This certificate expires in 07/03/2017.

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

Belo Horizonte, 05/12/2018.

Prof. Marcelo Resende de Souza

Coordenador da CEUA/UFMG