

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

Fernanda Carvalho de Souza

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM Probiatop® NA
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-fluorouracil EM
CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte/MG

2023

Fernanda Carvalho de Souza

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM Probiatop® NA
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-fluorouracil EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Belo Horizonte/MG

2023

043

Souza, Fernanda Carvalho de.

Avaliação do tratamento com Probiatop® na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos [manuscrito] / Fernanda Carvalho de Souza. – 2023.

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

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins.

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

1. Microbiologia. 2. Probióticos. 3. Mucosite. 4. Inflamação. 5. Fluoruracila. I. Martins, Flaviano dos Santos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



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

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **FERNANDA CARVALHO DE SOUZA**

Nº REGISTRO: **2021662343**

Às 13:30 horas do dia **19 de abril de 2023**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Mônica Larucci Vieira (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Fabiana da Conceição Pereira Tiago (Centro de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG) e o Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins (Orientador), para julgar o trabalho final "**Avaliação do tratamento com Probiatop® na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos**", da aluna **Fernanda Carvalho de Souza**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins - orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata 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. A candidata 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.

Belo Horizonte, 19 de abril de 2023

Membros da banca:

Profa. Dra. Mônica Larucci Vieira

Dra. Fabiana da Conceição Pereira Tiago

De acordo:

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

(Orientador)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana da Conceição Pereira Tiago, Usuário Externo**, em 20/04/2023, às 07:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Monica Larucci Vieira, Professora do Magistério Superior**, em 20/04/2023, às 09:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flaviano dos Santos Martins, Professor do Magistério Superior**, em 20/04/2023, às 09:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 20/04/2023, às 15:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2174720** e o código CRC **CE70DEB5**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus e nossa senhora, por ter me dado forças para enfrentar mais esse desafio e, com sucesso, terminá-lo.

Agradeço aos meus pais, que sempre me apoiaram, e à minha família, que sempre estiveram presentes, especialmente a minha irmã Fátima, por seu apoio incondicional a todo momento! Eu amo muito todos vocês!

Aos meus amigos de Uberlândia e Belo Horizonte que estiveram ao meu lado nas horas mais felizes e nas mais difíceis, amo vocês! Obrigada por todo apoio!

Ao meu namorado e parceiro pelo incentivo para trilhar essa caminhada, pelo ombro amigo nas horas necessárias e por sempre me ajudar quando preciso. Eu amo você!

Aos amigos do laboratório que tanto contribuíram para a realização deste trabalho, obrigada por toda ajuda, por me acolherem e pelo carinho que tiveram comigo ao longo desse processo.

Obrigada aos laboratórios envolvidos na execução deste trabalho, foi muito importante para sua finalização.

E, por último, e muito importante, obrigada ao Prof. Flaviano, por ter me aceitado nessa jornada e me ajudado a finalizar este trabalho, obrigada pelo apoio e amizade!

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

RESUMO

A mucosite gastrointestinal é uma condição inflamatória que afeta a mucosa do trato gastrointestinal e pode ocorrer como um efeito colateral comum do tratamento com quimioterápicos, incluindo o uso de medicamentos como o 5-fluorouracil (5-FU). Até o momento, não existem tratamentos curativos, mas apenas intervenções paliativas que buscam melhorar a qualidade de vida desses pacientes. Nesse contexto, microrganismos probióticos são cada vez mais utilizados como alternativas para proteção da mucosa gastrointestinal contra este efeito colateral e distúrbios associados. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com Probiatop®, composto por *Lactobacillus acidophilus* SD5221, *Lacticaseibacillus rhamnosus* SD5675, *Lacticaseibacillus paracasei* SD5275 e *Bifidobacterium lactis* SD5674, na mucosite intestinal experimental induzida por 5-FU. Para a execução do protocolo, utilizou-se camundongos fêmeas Balb/c (6-8 semanas) e mucosite induzida em dose única intraperitoneal de 5-FU (300 mg/Kg i.p). Foram analisados parâmetros clínicos, microbiológicos, imunológicos, histológicos e fisiológicos. Em nossos resultados, observou-se que Probiatop® diminuiu a perda de peso induzida por 5-FU, melhorou a integridade da barreira epitelial, diminuindo a permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana. Além disso, melhorou os escores histológicos, diminuiu o infiltrado de células inflamatórias e expressão de citocinas pró-inflamatórias amenizando a resposta inflamatória, mas não foi capaz de melhorar os parâmetros clínicos mensurados por meio do índice de atividade da doença (DAI) dos animais em comparação ao grupo controle mucosite e não induziu aumento de sIgA. Diante do exposto, conclui-se que Probiatop® foi capaz de diminuir os danos causados pela mucosite induzida pelo 5-FU.

Palavras chaves: Probiótico; Probiatop®; mucosite; inflamação intestinal; 5-fluorouracil.

ABSTRACT

Gastrointestinal mucositis is an inflammatory condition that affects the mucosa of the gastrointestinal tract and can occur as a common side effect of chemotherapy treatment, including the use of drugs such as 5-fluorouracil (5-FU). Currently, there are no curative treatments, but only palliative interventions that seek to improve the quality of life of these patients. In this context, probiotic microorganisms are increasingly used as alternatives to protect the gastrointestinal mucosa against this side effect and associated disorders. This study aimed to evaluate the effect of treatment with Probiatop®, composed of *Lactobacillus acidophilus* SD5221, *Lacticaseibacillus rhamnosus* SD5675, *Lacticaseibacillus paracasei* SD5275 and *Bifidobacterium lactis* SD5674, on experimental intestinal mucositis induced by 5-FU. For the protocol execution, female Balb/c mice (6-8 weeks) and mucositis induced in a single intraperitoneal dose of 5-FU (300 mg/Kg i.p) were used. Clinical, microbiological, immunological, histological and physiological parameters were analyzed. In our results, it was observed that Probiatop® decreased the weight loss induced by 5-FU, improved the integrity of the epithelial barrier, reducing intestinal permeability and bacterial translocation. In addition, it improved histological scores, decreased the inflammatory cell infiltrate and expression of pro-inflammatory cytokines, mitigating the inflammatory response, but was unable to improve the clinical parameters measured by the disease activity index (DAI) of the animals compared to the mucositis control group and did not induce an increase in sIgA. Therefore, it is concluded that Probiatop® was able to decrease the damage caused by mucositis induced by 5-FU.

Keywords: Probiotic; Probiatop®; mucositis; intestinal inflammation; 5-fluorouracil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da barreira intestinal e seus componentes.	14
Figura 2: Visão geral dos complexos juncionais epiteliais intestinais.	15
Figura 3: Estrutura química do 5-Fluoruracil.	18
Figura 4: Mecanismo de ação do 5-Fluoruracil.	19
Figura 5: Estágio da patologia da mucosite.	20
Figura 6: Potenciais mecanismos de ação dos probióticos no epitélio intestinal.	23
Figura 7: Desenho experimental do modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-Fluoruracil.	30
Figura 8: Avaliação do consumo de ração por gaiola, tamanho intestinal e perda de peso.	37
Figura 9: Índice de atividade da doença após indução da mucosite.	39
Figura 10: Avaliação de MPO e EPO no fluido íleo.	41
Figura 11: Avaliação da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana.	44
Figura 12: Avaliação dos níveis de sIgA no fluido intestinal.	47
Figura 13: Avaliação da expressão gênica de citocinas em amostras de íleo de camundongos.	48
Figura 14: Análise histológica do íleo de camundongos submetidos ao modelo murino de mucosite intestinal.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência de primers usados na qPCR.	34
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento
±	Mais ou menos
°C	Graus Celsius
5-FU	5-Fluorouracil
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AMPs	Proteínas antimicrobianas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAL	Bactérias ácido-láticas
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEBIO	Centro de Bioterismo
Célula M	<i>Microfold</i>
cm	Centímetros
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DAI	Índice de Atividade da Doença
DCs	Células dendríticas (do inglês <i>Dendritic cells</i>)
DII	Doença inflamatória intestinal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPD	Dehidropirimidina-dehidrogenase
DTPA	Dietileno-triaminopentaacetato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de Absorção Imunoenzimático (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EPO	Peroxidase eosinofílica (do inglês <i>eosinophil peroxidase</i>)
FAO	Organização das Nações Americanas de Alimento e Agricultura (do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FdUMP	Fluorodeoxiuridina monofosfato
FdUTP	Fluorodeoxiuridina trifosfato
FOS	Frutooligossacarídeo
FUTP	5-fluouridina trifosfato

<i>g</i>	Giros força gravitacional
g	Gramas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina e Eosina
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
i.p.	Intraperitoneal
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IEC	Células epiteliais intestinais (do inglês <i>intestinal epithelial cell</i>)
IL	Interleucina
LP	Lâmina própria
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
mL	Mililitros
MLN	Linfonodo mesentérico próximo (do inglês <i>Mesenteric lymph nodes</i>)
mm	Milímetro
MUC2	Mucina 2
NB-2	Nível de biossegurança 2
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa B
nm	Nanômetro
OPD	<i>o</i> -fenilenodiamina
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Permeabilidade intestinal
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Rotação por minuto
slgA	Imunoglobulina do tipo A secretória

SII	Síndrome do intestino irritável
TB	Translocação Bacteriana
Tc	Tecnécio
TGI	Trato gastrointestinal
TLR	Receptor do tipo Toll (do inglês <i>Toll-like receptor</i>)
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês <i>tumor necrosis factor</i>)
TS	Timidilato sintase
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
WHO	Organização Mundial de Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i>)
α	Alfa
μL	Microlitros
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 O trato gastrointestinal	13
1.2 Microbiota intestinal	16
1.3 5-Fluorouracil	17
1.4 Mucosite gastrointestinal.....	19
1.5 Probiótico	22
1.5.1 Efeitos benéficos de probióticos em doenças do TGI	24
2 JUSTIFICATIVA.....	26
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Probiótico	28
4.2 Animais	28
4.3 Indução da mucosite	28
4.4 Desenho experimental	29
4.5 Avaliação clínica dos animais, consumo de ração e comprimento intestinal ..	30
4.6 Medida da atividade da MPO e EPO	31
4.7 Avaliação da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana	32
4.8 Dosagem de sIgA no conteúdo intestinal	32
4.9 Análises histológicas.....	33
4.10 Análise de expressão gênica por qPCR.....	33
4.11 Análises estatísticas.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Avaliação da dose comercial.....	35

5.2 Avaliação do consumo alimentar e perda de peso.....	36
5.3 Avaliação do índice de atividade da doença (DAI).....	38
5.4 Avaliação de MPO e EPO	40
5.5 Avaliação da permeabilidade e translocação bacteriana	41
5.6 Avaliação dos níveis intestinais de sIgA	46
5.7 Avaliação da expressão de citocinas por qPCR.....	47
5.8 Avaliação do escore histológico	49
7 REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

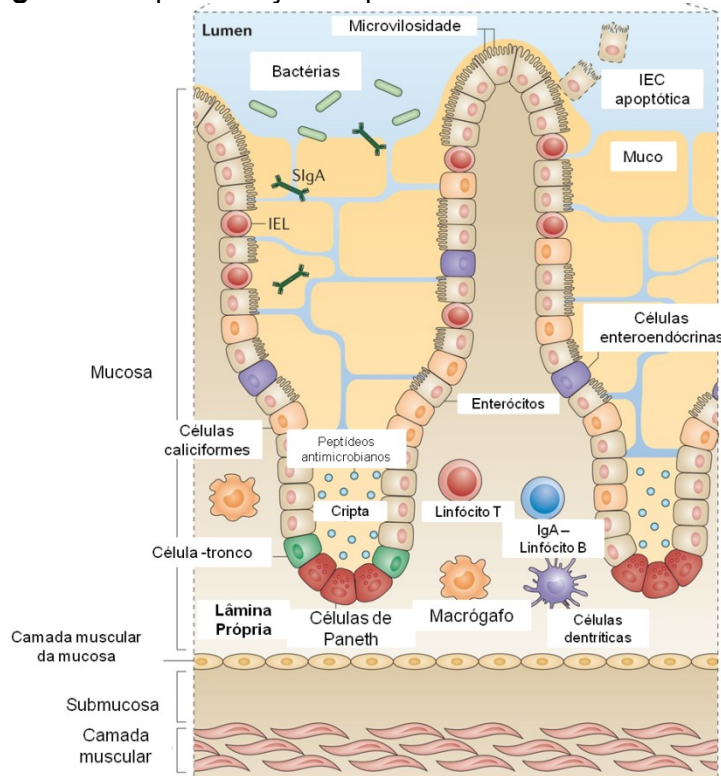
1.1 O trato gastrointestinal

O trato gastrointestinal (TGI) é conhecido por exercer funções importantes e primárias para a saúde do hospedeiro, dentre estas incluem digestão, absorção, excreção e proteção (WELLS; SPENCE, 2014). Estas funções são alcançadas por meio de um conjunto de órgãos com papéis distintos que estão dispostos desde a cavidade bucal, tendo como segmento terminal o ânus (CHENG et al., 2010). Além disso, o TGI é considerado o maior compartimento do sistema imunológico, revestido por uma camada mucosa que é continuamente exposta a agentes imunomoduladores provenientes da dieta, antígenos da microbiota indígena e patógenos externos (DUCARMON et al., 2019; MCCRACKEN; LORENZ, 2001). A camada mucosa compreende o epitélio, a lâmina própria (LP) e a muscular da mucosa, que é uma fina camada muscular abaixo da LP (MOWAT; AGACE, 2014) (Figura 1).

A LP é um tecido conjuntivo frouxamente compactado onde residem as células imunes inatas e adaptativas, como células T, células B, macrófagos e células dendríticas. Sobrejacente à LP, encontra-se a camada epitelial intestinal e, associado ao epitélio, a camada de muco, um revestimento semelhante a um gel que recobre essa superfície (VANCAMELBEKE; VERMEIRE, 2017). A camada de muco evita que agentes nocivos ao organismo entrem em contato diretamente com as células epiteliais, e as mucinas são os principais componentes desta camada, sendo a mucina 2 (MUC2) a proteína mais abundante (VAN DER SLUIS et al., 2006). Reguladores imunológicos, como peptídeos antimicrobianos (AMPs) e imunoglobulina A secretória (sIgA), são liberados no gel de muco para reforçar a separação física entre a microbiota e o epitélio intestinal (VANCAMELBEKE; VERMEIRE, 2017).

Subjacente à camada muscular da mucosa, encontra-se a submucosa, uma camada de tecido conjuntivo que sustenta a mucosa, composta por vasos sanguíneos, vasos linfáticos e glândulas submucosas (REED; WICKHAM, 2009). A submucosa é revestida por uma camada muscular mais espessa e, finalmente, a serosa fornece a cobertura fibrosa espessa que separa o intestino da cavidade peritoneal circundante (REED; WICKHAM, 2009).

Figura 1: Representação esquemática da barreira intestinal e seus componentes.



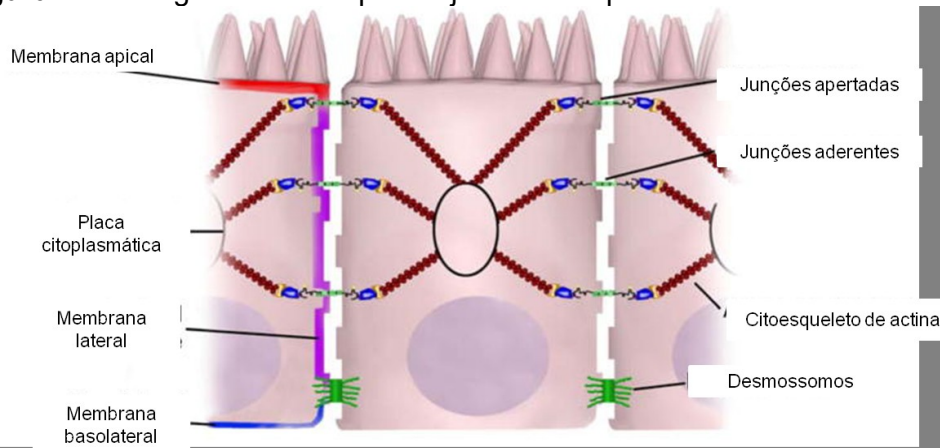
Fonte: Adaptado de Mowat e Agace (2014).

As funções desempenhadas pelo epitélio intestinal estão relacionadas ao conjunto de células que o compõem. Aqui estão presentes as células-tronco que residem nas criptas e dão origem a outros tipos celulares distintos, incluindo enterócitos absorptivos, células caliciformes, células enteroendócrinas, células de *Paneth* e células M (*Microfold*) (VANCAMELBEKE; VERMEIRE, 2017). Os enterócitos são o tipo de célula mais proeminente do epitélio intestinal e são especializadas na absorção de moléculas e estão organizadas entre as vilosidades e criptas intestinais; as células caliciformes são responsáveis pela produção e secreção de mucinas e peptídeos que são requeridos para a função de crescimento epitelial e reparo da mucosa; as células de *Paneth* possuem a capacidade de secretar substâncias antimicrobianas que atuam no controle da microbiota intestinal e na proteção das células-tronco próximas à base das criptas do intestino delgado; as células enteroendócrinas têm como principal função a produção de diferentes hormônios, como a serotonina que atua no eixo cérebro-intestino (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006; GEHART; CLEVERS, 2018; GRIBBLE; REIMANN, 2016; JOHANSSON; HANSSON, 2016). Por último, as células M atuam no direcionamento de antígenos do lúmen para a LP, que são essenciais para a

captação e eventual apresentação de antígenos ao sistema imunológico (OHNO, 2016).

As células que compõem o epitélio intestinal estão conectadas por meio de complexos proteicos denominados *tight junctions* (HU et al., 2015). Tais conexões são formadas principalmente por três complexos juncionais: desmossomos, junções aderentes e junções apertadas (GROSCHWITZ; HOGAN, 2009) (Figura 2). Os desmossomos são placas densas conectadas a filamentos de queratina; as junções aderentes e apertadas consistem em proteínas transcelulares conectadas intracelularmente por meio de proteínas adaptadoras ao citoesqueleto de actina (GROSCHWITZ; HOGAN, 2009) As *tight junctions* funcionam como uma vedação entre as células epiteliais adjacentes, regulando o fluxo transepitelial de íons e solutos entre as células e bloqueando a passagem paracelular de agentes exógenos (HU et al., 2015).

Figura 2: Visão geral dos complexos juncionais epiteliais intestinais.



Fonte: Adaptado de Groschwitz e Hogan (2009).

Dada a complexidade celular e funcional do intestino, não é de admirar que haja um número impressionante de pessoas afetadas por distúrbios intestinais, causando desequilíbrio na homeostase do organismo, como infecções, síndrome do intestino irritável (SII), má absorção e incontinência fecal. Outras doenças debilitantes incluem as doenças inflamatórias intestinais (DII), câncer de cólon e doenças que, em alguns casos, têm base genética, como a doença de Hirschsprung (WELLS; SPENCE, 2014). Além disso, como a maioria dos medicamentos orais são absorvidos no intestino, os efeitos colaterais mais comuns são intestinais (WELLS; SPENCE, 2014).

Como forma de manter os processos de homeostase do organismo, o intestino conta com uma série de mecanismos além de toda estrutura já mencionada. Um deles é a presença da microbiota, que auxilia nas linhas de defesa do organismo e manutenção desses processos (DETHLEFSEN et al., 2008; MILANI et al., 2017). Para isso, o corpo humano abriga trilhões de células microbianas cujas ações coordenadas são consideradas importantes para a vida humana (MILANI et al., 2017). Essas populações de células microbianas atingem sua maior densidade no compartimento intestinal, onde formam coletivamente uma comunidade microbiana complexa conhecida como microbiota intestinal (LOZUPONE et al., 2012) que se desenvolve ao longo da infância do hospedeiro para, eventualmente, atingir sua estabilidade no adulto (BOKULICH et al., 2016; YATSUNENKO et al., 2012).

1.2 Microbiota intestinal

As comunidades microbianas colonizam o neonato imediatamente após o nascimento, isso inclui várias populações microbianas que são estabelecidas e mantidas ao longo do TGI (THOMAS et al., 2017). A microbiota intestinal é composta por bactérias, fungos, vírus e protozoários que vivem em simbiose com o hospedeiro e, para isso, o desenvolvimento e a maturação da microbiota constituem um processo dinâmico e não aleatório (AVERSHINA et al., 2016).

O perfil microbiano do neonato é influenciado pelo tipo de parto, uma vez que a transmissão vertical de microrganismos da mãe para o bebê é reconhecido como um fator preponderante para iniciar uma simbiose microrganismo-hospedeiro ao longo da vida (KORPELA et al., 2018). No parto normal, os recém-nascidos tendem a abrigar uma microbiota que normalmente é encontrada no trato reprodutivo feminino, como espécies de *Lactobacillus*; em contraste, a cesariana é tipicamente associada à presença de *Staphylococcus* spp. e outras bactérias associadas à pele da mãe e ao ambiente hospitalar (THOMAS et al., 2017). Independentemente do método de nascimento, em geral, é sabido que a colonização inicial do TGI do neonato se dá por um grande número de anaeróbios facultativos. Com a idade, a introdução de alimentos sólidos, e, mais tarde, o influxo de hormônios sexuais associados à puberdade, a microbiota intestinal sofre alterações convergindo para uma microbiota intestinal funcionalmente mais madura (KUNDU et al., 2017). Este processo leva a um declínio da população de anaeróbios facultativos e maior

prevalência por anaeróbios obrigatórios, incluindo *Bacteroides* e espécies do gênero *Clostridium*. Portanto, em adultos, a microbiota intestinal é considerada mais estável em relação aos primeiros anos de vida (HOOPER, 2004; KUNDU et al., 2017).

Na fase adulta, a microbiota intestinal é predominantemente composta por bactérias dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, enquanto *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* encontram-se em menor quantidade (TAP et al., 2009). Essa composição ainda pode sofrer alterações em resposta a uma variedade de fatores, incluindo dieta, ambiente, administração de medicamentos, contato com animais de estimação, antibióticos e estados de doenças, podendo acarretar em disbiose (DETHLEFSEN et al., 2008; MILANI et al., 2017). A disbiose microbiana, por exemplo, tem sido associada a várias doenças metabólicas e inflamatórias, como diabetes, hipertensão, DII e obesidade (AARNOUTSE et al., 2019; ALEXANDER et al., 2017).

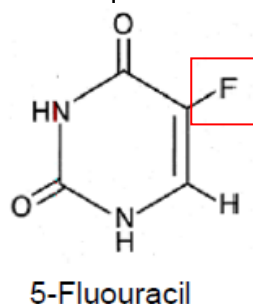
Neste contexto, alguns estudos indicam que quimioterápicos usados no tratamento de câncer afetam a composição microbiana intestinal, influenciando as interações entre a microbiota e o sistema imunológico do hospedeiro (CHANG et al., 2020; STRINGER et al., 2009). A disbiose causada pelo uso de quimioterápicos, como o 5-Fluorouracil (5-FU), pode levar ao desenvolvimento de mucosite intestinal, que é um dos principais contribuintes para a redução da qualidade de vida desses pacientes durante o tratamento e está intimamente associada ao aumento da duração da hospitalização e do risco de infecções (SOUGIANNIS et al., 2021).

1.3 5-Fluorouracil

O 5-FU é um quimioterápico amplamente utilizado em terapias antineoplásicas, com aplicações no tratamento de vários tipos de tumores, como mama, TGI, pâncreas, cabeça, pescoço, ovário e, principalmente, cólon e reto (MURESAN-POP et al., 2020; WANG; HAN; ZHANG, 2019). Este quimioterápico foi desenvolvido na década de 1950 após observações de que as células de hepatocarcinoma de ratos utilizavam a uracila de maneira mais rápida do que as células normais, indicando que o metabolismo da uracila poderia ser um alvo potencial para a quimioterapia antimetabólica (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; RUTMAN; CANTAROW; PASCHKIS, 1954).

A estrutura química do 5-FU é um análogo à estrutura da uracila, sintetizado a partir da substituição por um átomo de flúor na posição C-5 do átomo de hidrogênio da uracila (Figura 3). A molécula sintetizada entra rapidamente na célula pelo mesmo mecanismo de transporte facilitado da uracila e é convertida intracelularmente em três metabólitos ativos: monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluorouridina (FUTP) (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003). Aproximadamente 20% da dose administrada no tratamento é convertida nesses metabólitos ativos, e o restante, 80% da dose, é catabolizado no fígado pela enzima di-hidropirimidina desidrogenase (DPD) em di-hidrofluorouracil (DHFU) (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; WOHLHUETER; MCIVOR; PLAGEMANN, 1980).

Figura 3: Estrutura química do 5-Fluoruracil.



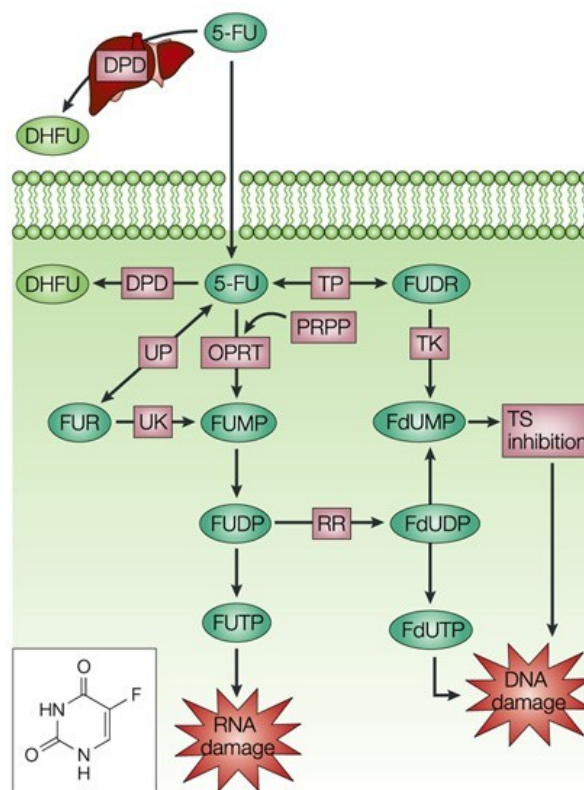
Fonte: Adaptado de Longley et al., (2003).

Cada metabólito ativo atua em uma via de ação do 5-FU. O FUTP causa alterações no processamento e função do RNA, gerando danos à sua composição; FdUTP e FdUMP causam danos ao DNA, diretamente e por meio da inibição da enzima timidilato sintase (TS), respectivamente. Os danos causados pelo 5-FU ao RNA e DNA levam aos efeitos citotóxicos em células tumorais e também células normais, resultando em apoptose (Figura 4) (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

Em geral, os medicamentos quimioterápicos como o 5-FU, que agem retardando ou interrompendo o crescimento das células tumorais, bem como células normais que estão se dividindo rapidamente, resultam em efeitos colaterais graves, como náusea, cardiotoxicidade, leucopenia, alopecia, diarreia, mielossupressão e mucosite (SARA et al., 2018; SONG et al., 2016; SOUGIANNIS et al., 2021; THOMAS et al., 2016; WANG; HAN; ZHANG, 2019). As células do epitélio intestinal

têm ciclos celulares curtos e devido à apoptose induzida pela exposição a drogas anticancerígenas é possível observar o desenvolvimento de efeitos colaterais, como a mucosite (SONG; PARK; SUNG, 2013).

Figura 4: Mecanismo de ação do 5-Fluoracil. Após administrado, o 5-FU entra nas células e aproximadamente 80% do composto é detoxificado no fígado à um composto inativo. O restante é metabolizado e convertido em três principais metabólitos ativos: fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) e 5-fluorouridina trifosfato (FUTP). FdUMP inibe a enzima timidilato sintase. Com o aumento da concentração de FdUTP, este metabólito incorpora-se ao DNA, bloqueando sua síntese. Por outro lado, FUTP é incorporado ao RNA, resultando em perda de função com consequente morte celular.



Nature Reviews | Cancer

Fonte: Longley et al.,(2003).

1.4 Mucosite gastrointestinal

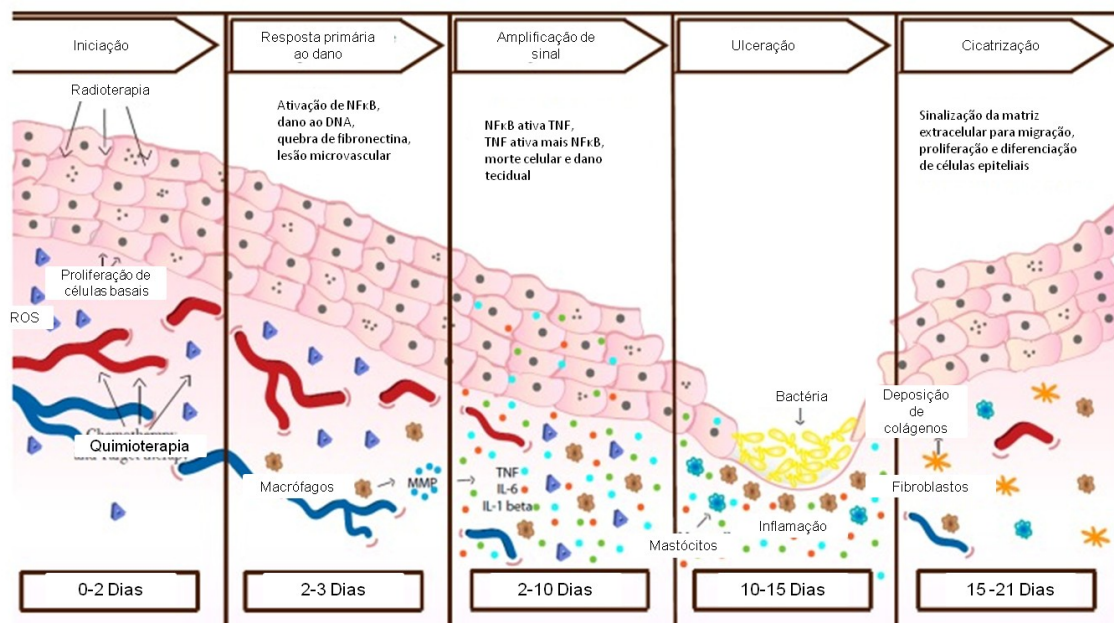
A mucosite intestinal é definida como inflamação das membranas mucosas que revestem o TGI levando a alterações estruturais, funcionais e imunológicas; é um processo fisiológico que envolve a comunicação cruzada entre o agente quimioterápico específico, o sistema imunológico e os microrganismos intestinais (SOUGIANNIS et al., 2021). O quadro clínico causado pela doença tem um impacto

grave na qualidade de vida do paciente e influencia negativamente o resultado do tratamento (SOUGIANNIS et al., 2021).

Durante o tratamento do câncer, aproximadamente 40% dos pacientes que recebem dose padrão de quimioterapia, e quase 100% dos pacientes que recebem alta dose, apresentam dor, ulceração, inchaço, vômito e diarreia associados à mucosite (SHARMA; TOBIN; CLARKE, 2005). Por isso, os efeitos debilitantes da mucosite podem resultar em interrupções não planejadas ou prematuras do tratamento e o risco de infecções sistêmicas por patógenos é aumentado em pacientes com a doença (LOGAN et al., 2007; ZHENG et al., 2019).

Segundo Sonis e colaboradores (2004), o desenvolvimento da mucosite induzida por quimioterapia envolve um conjunto complexo e dinâmico de eventos biológicos que ocorrem em cinco fases interconectadas: (1) iniciação, (2) resposta primária ao dano, (3) amplificação de sinal, (4) ulceração e (5) cicatrização (Figura 5).

Figura 5: Estágio da patologia da mucosite.



Fonte: Adaptado de Basile et al., (2019)

A fase de iniciação é caracterizada por danos às moléculas de DNA desencadeada pela exposição a agentes quimioterápicos ou radioterápicos. Além disso, alterações no RNA levam à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que suprimem a renovação celular, ocasionando dano tecidual (BASILE et al., 2019; SONIS, 2004).

Em seguida, devido aos danos acometidos ao RNA e DNA, inicia-se a fase de resposta primária ao dano. Nesta fase ocorre a ativação de fatores nucleares de transcrição, como fator nuclear kappa B (NF- κ B), regulação positiva da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e genes associados à produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL), como IL1 β e IL6 (SONIS, 2004). Estas citocinas estimulam enzimas pró-apoptóticas, como da família BCL2 (B-cell lymphoma 2), alterando os mecanismos de crescimento e diferenciação celular, acarretando em danos teciduais (SONIS, 2002, 2004).

Na fase de amplificação de sinal, citocinas pró-inflamatórias fornecem um loop de *feedback* positivo para amplificar o dano primário iniciado pela radiação ou quimioterapia, induzindo as vias que aumentam a produção de citocinas e o estresse oxidativo (SONIS, 2004). Em consequência a esta autorregulação, há um aumento de reações inflamatórias que resultam na amplificação de sinais pró-apoptóticos, que por sua vez levam a danos teciduais adicionais (SONIS, 2004).

Na fase ulcerativa aparecem profundas úlceras clinicamente sintomáticas devido à dor e, possivelmente, sintomas abdominais. É observado atrofia das criptas e vilosidades, com depleção de células caliciformes, acompanhados pelo enfraquecimento das *tight junctions* entre as células intestinais, além da presença de um infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, que chegam ao local da lesão via quimiotaxia. Essas alterações na homeostase do TGI resultam em lesões extremamente dolorosas e propensas à colonização por bactérias patobiontes (BLIJLEVENS; SONIS, 2007; SONIS, 2004).

A última etapa é a cicatrização, ao cessar a quimioterapia, que é estimulada por moléculas sinalizadoras provenientes da matriz extracelular e que induzem a proliferação, migração e diferenciação celular no epitélio ulcerado, resultando na restauração da mucosa (SONIS, 2004). Este modelo foi baseado em dados observacionais da mucosite oral, uma vez que pouco se conhece sobre a fisiologia da mucosite intestinal devido às dificuldades em se acessar as lesões (SUKHOTNIK et al., 2014). Sendo assim, hipóteses têm sido levantadas baseadas em estudos pré-clínicos com animais (FIJLSTRA et al., 2011).

Neste contexto, estudar a patologia da mucosite pode possibilitar alterações no tratamento, podendo almejar melhora na qualidade de vida, durante, e após o tratamento quimioterápico em pacientes oncológicos. A partir desta perspectiva,

alternativas terapêuticas têm sido sugeridas como forma de prevenir ou amenizar os danos causados pela mucosite intestinal, sendo o uso de probióticos a sugestão como tratamento adjuvante para atenuar os sintomas da patologia (BATISTA et al., 2020).

1.5 Probiótico

De acordo com Sanders (2000), o conceito de probiótico foi introduzido pela primeira vez pelo cientista russo Elie Metchnikoff em 1908, com base em observações de que indivíduos que viviam na Bulgária apresentavam uma expectativa de vida mais longa que o restante da Europa, e que isso era resultado da ingestão de coalhada pelos búlgaros. A última e atual definição do termo “probióticos” por Hill et al. (2014), manteve o que a Organização Mundial da Saúde (OMS) havia estabelecido em 2001, em que probióticos são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”.

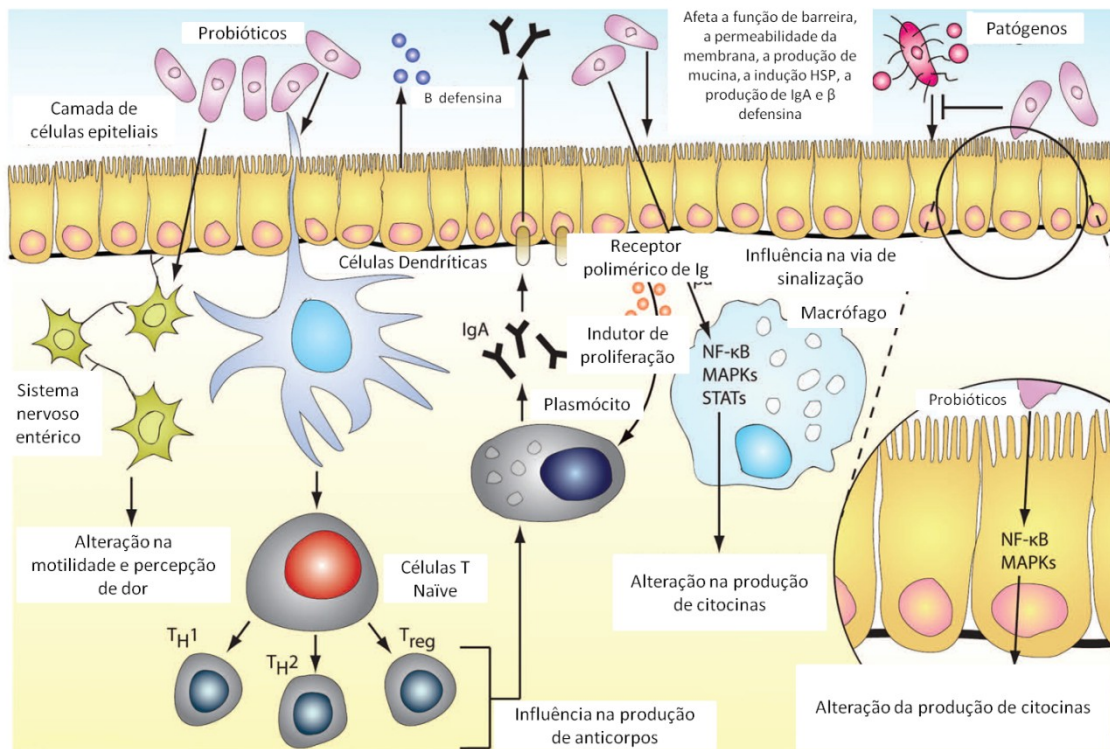
A ideia de administrar probióticos em distúrbios gastrointestinais fundamenta-se no fato de que estes podem auxiliar na recuperação da microbiota e reestabelecimento da homeostase (SANDERS et al., 2018). Comumente, bactérias produtoras de ácido láctico (BAL), como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, são usados como probióticos, além de outros microrganismos não bacterianos, como algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* entre as quais se destaca *S. cerevisiae* var. *boulardii* (MARTINS et al., 2005, 2007). As leveduras enquanto probióticos se diferem das bactérias em tamanho, composição da parede celular, propriedades metabólicas e resistência a antibacterianos, mas se assemelham quanto a capacidade de promover efeito benéfico no hospedeiro (CZERUCKA; PICHE; RAMPAL, 2007).

Existem características gerais que os microrganismos precisam ter para que possam ser usados como probióticos, como tolerância a variações de temperatura e aos sais biliares, resistência ao pH ácido, sobreviver no meio competitivo do TGI e serem de fácil comercialização (FIETTO et al., 2004; GRAFF et al., 2008). Apesar dessa generalidade, de acordo com Gilliland e Walker (1990), conforme revisado por (MARTINS et al., 2009), os efeitos promovidos pelos probióticos só podem ser

atribuídos à linhagem testada, uma vez que a ação probiótica é linhagem dependente, e a escolha de um microrganismo deve ser adaptada a cada finalidade.

Diferentes mecanismos foram propostos para explicar como os probióticos podem melhorar a saúde intestinal, sendo eles: modulação das *tight junctions* das células epiteliais intestinais (IEC, do inglês intestinal epithelial cell) resultando em melhora da função de barreira; indução da produção de mucina; atenuação do crescimento de patógenos via estimulação da produção de defensinas β pelas IECs e aumento da produção de IgA por plasmócitos; modulação da secreção de citocinas pelas células epiteliais, macrófagos e células dendríticas; atuação na motilidade intestinal e percepção de dor por meio das células do sistema nervoso entérico e produção de compostos microbianos (Figura 6) (CASTAGLIUOLO et al., 1999; CHEN et al., 2006; MACK et al., 2003; SCHLEE et al., 2008; THOMAS; VERSALOVIC, 2010; WEHKAMP et al., 2004).

Figura 6: Potenciais mecanismos de ação dos probióticos no epitélio intestinal.



Fonte: Adaptado de Versalovic (2010).

Desta forma, observa-se que os probióticos apresentam diferentes mecanismos que resultam num efeito benéfico sobre o sistema imunológico e sobre

o epitélio intestinal que, por sua vez, podem prevenir ou diminuir a inflamação e o dano tecidual, que são comuns em quadros de mucosite gastrointestinal.

1.5.1 Efeitos benéficos de probióticos em doenças do TGI

As linhagens avaliadas no presente estudo, *Lactobacillus acidophilus* SD5221, *Lacticaseibacillus rhamnosus* SD5675, *Lacticaseibacillus paracasei* SD5275, *Bifidobacterium lactis* SD56749, fazem parte da formulação do probiótico comercial Probiatop®. As espécies que o compõe foram ferramentas de pesquisa que investigaram seus efeitos frente a estímulos nocivos que mimetizam condições de doenças inflamatórias do TGI.

Ren e colaboradores (2022) avaliaram o potencial da bactéria *L. paracasei* em diarreia induzida por *Escherichia coli* em modelo animal murino. Neste estudo, *L. paracasei* demonstrou excelente eficácia terapêutica contra diarreia elevando os níveis de proteínas da junção apertada, inibindo a ativação NF-κB e aumentando a abundância bactérias da microbiota intestinal que podem produzir ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (REN et al., 2022).

Em modelo de colite experimental, *B. Lactis* promoveu a redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL6) e fatores de transcrição relacionados ao dano tecidual, bem como aumentou a expressão de células T reguladoras (PHILIPPE et al., 2011).

A combinação de microrganismos com prebiótico foi avaliada em modelo murino de mucosite, sendo uma formulação comercial o alvo de estudo do grupo de Trindade e colaboradores (2018). Este estudo avaliou a administração oral de um simbiótico comercial (Simbioflora®), preparação contendo as mesmas bactérias do probiótico Probiatop® e acrescido de frutooligossacarídeo (FOS). O simbiótico foi capaz de diminuir o dano na mucosa causada pela mucosite induzida por 5-FU, resultando em recuperação significativa das lesões e manutenção da camada de muco, redução da perda de peso e da permeabilidade intestinal no grupo tratado com a preparação simbiótica (TRINDADE et al., 2018).

Alguns autores têm demonstrado que probióticos melhoram o quadro de doenças gastrointestinais, como a mucosite intestinal. Justino e colaboradores (2015), associou a administração da bactéria *L. acidophilus* à melhora dos aspectos inflamatórios e funcionais da mucosite intestinal induzida por 5-FU em modelo

murino. Este trabalho observou que o tratamento com o probiótico reverteu significativamente a redução das vilosidades e profundidade das criptas intestinais em comparação com o grupo mucosite induzida e não tratado com *L. acidophilus* (JUSTINO et al., 2015).

Em um estudo semelhante, Jesus e colaboradores (2019) avaliaram os efeitos benéficos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 em modelo murino de mucosite intestinal induzido por 5-FU. Os resultados histopatológicos e de permeabilidade intestinal (PI) mostraram que os animais tratados com o probiótico apresentaram menor permeabilidade intestinal, preservação das vilosidades e criptas intestinais, redução da perda de células caliciformes e de infiltrados inflamatórios em cortes de íleo (DE JESUS et al., 2019).

Em outro trabalho em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU, *Lactocaseibacillus casei* variedade *rhamnosus* (Lcr35) demonstrou ser capaz de diminuir a lesão intestinal pela imunomodulação do processo inflamatório, essa bactéria atuou por meio da inibição de citocinas pró-inflamatória e minimizando o dano tecidual sobre a mucosa (YEUNG et al., 2015).

Estudos clínicos utilizando probióticos em associação a tratamentos quimioterápicos têm demonstrado que essa alternativa terapêutica promove uma atenuação da toxicidade gastrointestinal associada, refletindo em uma diminuição da gravidade dos sintomas relatados por pacientes sob terapia antineoplásica (CIORBA et al., 2015; MEGO et al., 2015), sugerindo que a terapia à base de probiótico pode ser uma estratégia terapêutica eficaz no tratamento de doenças no TGI.

2 JUSTIFICATIVA

A mucosite intestinal é um efeito colateral comum no tratamento quimioterápico com 5-FU, esta condição é responsável por causar inflamações e lesões no revestimento do intestino, resultando em sintomas como diarreia, dor abdominal, náusea e perda de apetite. Decorrente desses sintomas, a mucosite pode levar a uma diminuição da qualidade de vida do paciente, bem como a um aumento dos custos de saúde, devido à necessidade de cuidados adicionais. As atuais diretrizes de tratamento da mucosite se limitam a intervenções paliativas, tornando imprescindível a busca por alternativas terapêuticas capazes de amenizar o desenvolvimento e a gravidade desta doença.

Nesse contexto, a suplementação com probióticos tem sido sugerida como uma forma de atenuar os sintomas da mucosite intestinal induzida por quimioterápicos. Os probióticos são estudados como possíveis ferramentas terapêuticas ao combate de doenças inflamatórias do TGI em modelos experimentais, bem como em estudos clínicos. A combinação de diferentes espécies de microrganismos probióticos também tem sido demonstrada como uma alternativa para a potencialização dos efeitos benéficos dos probióticos frente a situações de distúrbios gastrointestinais.

Com isso, a aplicação terapêutica utilizando Probiatop®, formulação probiótica que contém a combinação de diferentes linhagens bacterianas, em associação ao tratamento quimioterápicos pode ser uma alternativa eficaz no tratamento da mucosite intestinal induzida por 5-FU. Essa abordagem pode proporcionar uma melhora significativa da qualidade de vida dos pacientes, além de reduzir os custos de saúde associados ao tratamento paliativo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do probiótico comercial Probiatop® em modelo experimental de mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico 5-FU.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento do Probiatop® sobre os aspectos clínicos dos animais:
 - Consumo alimentar;
 - Perda de peso;
 - DAI.

- Avaliar o efeito do tratamento do Probiatop® nos parâmetros microbiológicos a partir da quantificação de bactérias do ácido láctico, enterobactérias e translocação bacteriana.

- Avaliar o efeito do tratamento do Probiatop® nos parâmetros imunológicos:
 - Análise do influxo de neutrófilos e eosinófilos (MPO e EPO);
 - Quantificação de sIgA no conteúdo intestinal;
 - Perfil de citocinas no tecido.

- Avaliar o efeito do tratamento do Probiatop® nos parâmetros fisiológicos, analisando a permeabilidade intestinal.

- Avaliar o efeito do tratamento do Probiatop® na histopatologia (escores histopatológicos) em fragmentos do íleo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Probiótico

O probiótico comercial utilizado foi o Probiatop® (FQM, Rio de Janeiro, Brasil) que contém quatro linhagens de microrganismos (*L. acidophilus* SD5221, *L. rhamnosus* SD5675, *L. paracasei* SD5275 e *B. lactis* SD56749). A quantidade total de bactérias foi de 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) em cada pacote contendo o total de 1 g. A embalagem do simbiótico foi diluída em 1 mL de solução salina 0,9% e 0,1 mL da preparação diluída foi administrada diariamente por via intragástrica (gavagem) para cada camundongo. Os animais no grupo controle receberam o mesmo volume de solução salina 0,9%.

4.2 Animais

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

Todos os experimentos propostos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG: 186/2012).

4.3 Indução da mucosite

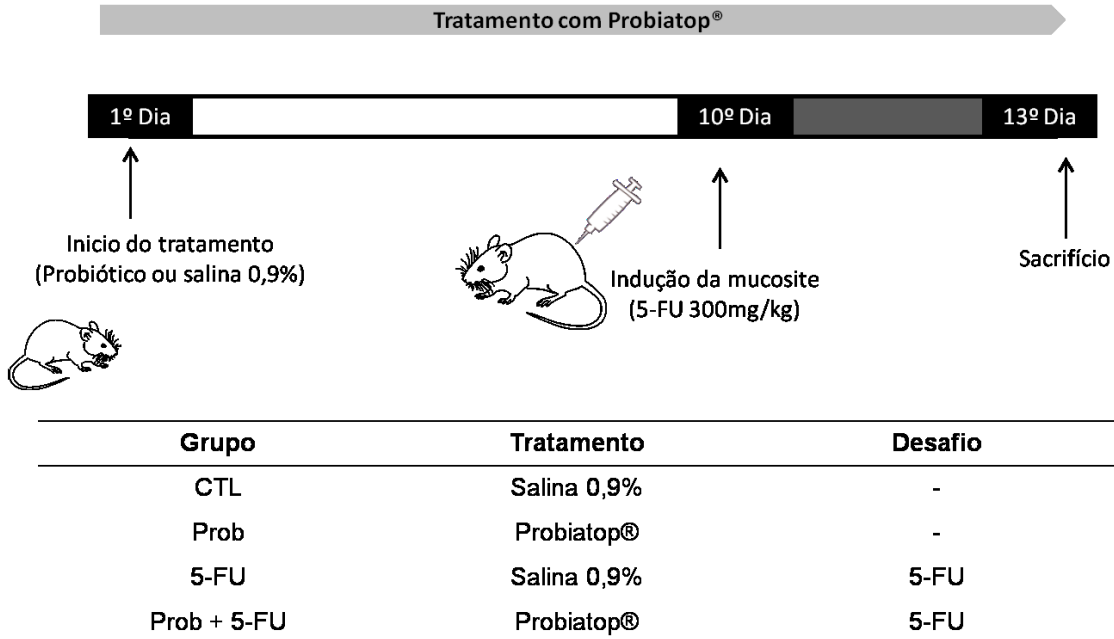
Para indução da mucosite, foi utilizado o quimioterápico 5-FU. Os animais receberam 300 mg/kg de peso corpóreo da droga por via intraperitoneal (i.p.) em

dose única. Os animais foram sacrificados três dias após a indução da mucosite (MAIOLI et al., 2014).

4.4 Desenho experimental

Para avaliar o efeito probiótico do produto, a experimentação animal foi realizada conforme a Figura 7. Os animais foram divididos em 4 grupos, contendo 13 animais por grupo, conforme descrito a seguir: CTL (Controle), Prob (Controle Probiótico), 5-FU (Controle Mucosite) e Prob + 5-FU (tratamento probiótico com mucosite induzida). Os animais foram avaliados a cada dois dias, em horário fixo, quanto à perda de massa corporal e o consumo alimentar. A partir do dia da indução da doença (dia 10) até o final do protocolo experimental (13º dia), as fezes foram coletadas para verificação de sua consistência, bem como a presença ou ausência de sangue oculto, diariamente. Amostras de fezes, apenas do último dia, também foram utilizadas para quantificação de enterobactérias e bactérias do ácido lático na microbiota intestinal. Ao final do experimento os animais foram anestesiados por anestesia geral para coleta de amostras de sangue para avaliação da permeabilidade intestinal (6 animais por grupo) e translocação bacteriana (7 animais por grupo). Em seguida, foram sacrificados por deslocamento cervical, e órgãos como pulmão, baço, fígado, linfonodos mesentéricos e rins também foram excisados para avaliação da translocação bacteriana. Por fim, fragmentos do intestino delgado (íleo) foram coletados para dosagens de mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO) e citocinas, enquanto o conteúdo intestinal (intestino delgado) foi coletado para dosagem de sIgA.

Figura 7: Desenho experimental do modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-Fluoruracil. Camundongos Balb/c fêmeas foram divididos aleatoriamente nos grupos e receberam solução salina estéril (CTL e 5-FU) ou Probiatop® (Prob e Prob + 5-FU) por gavagem oral durante todo o protocolo experimental. A mucosite foi induzida por uma única dose de 5-FU intraperitoneal no dia 10 (5-FU e Prob + 5-FU). No dia 13, os camundongos foram sacrificados e amostras de fezes, sangue, órgãos e tecido foram coletadas para análises.



Fonte: Elaborado pelo autor

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

A avaliação clínica dos animais foi baseada em um escore acumulativo (0 – 9) pela análise de três parâmetros diferentes: (1) consistência das fezes (0 = normal, 1= mole porém ainda formada, 2= muito mole, 3= líquida); (2) avaliação da presença de sangue nas fezes por meio do Kit Feca-Cult (Inlab, São Paulo, SP, Brasil) (0= negativo para presença de sangue oculto, 1= positivo para presença de sangue oculto, 2= sangue visível nas fezes, 3= sangramento retal); e (3) peso dos animais (0 = menos de 1% de perda de peso; 1 = 1 a 5% de perda de peso; 2 = 5 a 10% de perda de peso; 3= 10 a 20% de perda de peso; 4 = mais de 20% de perda de peso em relação ao dia 0 pós desafio). Por questão de ética em experimentação animal, os animais que porventura perdessem 20% ou mais do peso, seriam sacrificados e seus dados excluídos das análises (COUTINHO et al., 2022).

Para o consumo alimentar, a ração foi pesada a cada dois dias antes e diariamente após a indução da doença e os dados foram expressos como média do consumo de ração (grama) por gaiola (SOUZA et al., 2016).

Para mensuração do comprimento intestinal, o intestino delgado, que compreende a porção distal à incisão sobre o piloro até a válvula ileocecal foi removido e medido com uma régua milimétrica, e os resultados expressos em centímetros.

4.6 Medida da atividade da MPO e EPO

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

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

4.7 Avaliação da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana

A permeabilidade intestinal foi determinada medindo a radioatividade do sangue após administração oral do ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) marcado com tecnécio-99m (^{99m}Tc). Ao final do protocolo experimental, todos os animais receberam 0,1 mL de DTPA marcado com 18,5 MBq de ^{99m}Tc por via oral 4 h antes do sacrifício. O sangue foi coletado, pesado e colocado em tubos apropriados para determinação da radioatividade. Os resultados foram calculados como uma porcentagem da dose/g de sangue pela seguinte equação: % dose/g sangue = (cpm em g de sangue/cpm dose de padrão) \times 100 cpm (contagens de radioatividade por minuto) (DE BARROS et al., 2018).

A avaliação da translocação bacteriana utilizou *E. coli* não patogênica radiomarcada com ^{99m}Tc ($^{99m}\text{Tc-E.coli}$). O procedimento de radiomarcagem das células bacterianas foi descrito anteriormente por Diniz e colaboradores (1999). Setenta e duas horas após a indução da mucosite, 0,1 mL de uma suspensão contendo 1,8 MBq $^{99m}\text{Tc-E. coli}$ foi administrado por gavagem a todos os animais. Após quatro horas, o sangue, linfonodos mesentéricos (MLN), fígado, baço e pulmões foram removidos, pesados e colocados em tubos apropriados para determinação da radioatividade (DE BARROS et al., 2018).

4.8 Dosagem de sIgA no conteúdo intestinal

Os níveis de sIgA no fluido intestinal foram determinadas por método imunoenzimático (ELISA), conforme descrito por MARTINS e colaboradores (2009). Após o sacrifício dos animais, o intestino delgado foi removido e seu conteúdo coletado, pesado e ressuspenso em PBS (pH 7,2) previamente suplementado com um coquetel anti-protease (1 μM de aprotinina, 25 μM de leupeptina, 1 μM de pepstatina e 1 mM de PMSF), na proporção de 500 mg de conteúdo intestinal por 2,0 mL de PBS. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (9.000 rpm, 30 minutos, 4°C) (Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific, Osterode am Harz Alemanha), e o sobrenadante recolhido. Para o revestimento das microplacas foi utilizado o anticorpo IgA anti-camundongo desenvolvido em cabra, enquanto que para a detecção foi utilizado o IgA anti-camundongo biotilado. Para o desenvolvimento de cor, utilizou-se o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e a absorbância a 492 nm foi determinada em espectrofotômetro de microplaca (Epoch). Um padrão

de IgA de camundongo purificado (Southern Biotechnology, Birmingham, EUA) foi usado para determinar as concentrações da imunoglobulina, e os resultados expressos em $\mu\text{g/g}$ de fluido intestinal.

4.9 Análises histológicas

Seguindo a metodologia descrita por Arantes e Nogueira (1997), sessões de íleo foram coletadas, abertas longitudinalmente sobre um papel filtro, cuidadosamente lavadas e processadas por microtomia. Resumidamente, os tecidos foram pré-fixados em formaldeído tamponado a 4% por 24 horas. As amostras foram processadas para inclusão em parafina e submetidas à microtomia para obtenção de cortes histológicos de 4 μm de espessura. As lâminas resultantes foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). As alterações na arquitetura da mucosa e o infiltrado de células polimorfonucleares foram avaliadas nas lâminas de coloração HE, usando um sistema de classificação histopatológica de Howarth e colaboradores (1996). As imagens utilizadas foram capturadas em aumento de 10 e 40x, usando um microscópio óptico BX43 (Olympus QColor5), e processadas usando o programa de captura QCapture Pro 6.0. A análise foi realizada por um único patologista que desconhecia as condições experimentais de cada amostra.

4.10 Análise de expressão gênica por qPCR

Amostras de íleo foram coletadas e armazenadas em RNA later (100 μL) (Invitrogen). O RNA total foi extraído usando o RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, a qualidade e quantidade de RNA foram avaliados em gel de agarose 1,5% e por meio do espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific), respectivamente. Em seguida, o cDNA foi gerado a partir de 2 μg de RNA seguindo as instruções do kit Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher). O cDNA foi então padronizado para 1 μg , e as amostras foram diluídas na proporção 1:4 antes da realização da PCR quantitativa (qPCR).

A qPCR foi realizada no aparelho Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR System usando o PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Thermo) nas seguintes condições: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Os primers utilizados na amplificação por qPCR estão listados na

Tabela 1, e todos foram previamente avaliados quanto à eficiência. A expressão de genes alvos foi analisada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) usando o gene β -actina (*Actb*) como referência endógena.

Tabela 1: Sequência de primers usados na qPCR.

GENE	Primer Forward	Primer Reverse
<i>Actb</i>	GCTGAGAGGGAAATCGTGCGTG	CCAGGGAGGAAGAGGATGCGG
<i>Tlr4</i>	ATGGCATGGCTTACACCACC	GAGGCCATTTTTGTCTCCACA
<i>Nfkb1 (p105)</i>	GTGGAGGCATGTTTCGGTAGTG	TCTTGGCACAATCTTTAGGGC
<i>Tnf</i>	ACGTGGAACTGGCAGAAGAG	CTCCTCCACTTGGTGGTTTG
<i>Il1b</i>	CTCCATGAGCTTTGTACAAGG	TGCTGATGTACCAGTTGGGG
<i>Claudina-2</i>	GTCATCGCCCATCAGAAGAT	ACTGTTGGACAGGGAACCAG

Fonte: Elaborado pelo autor

4.11 Análises estatísticas

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da dose comercial

O potencial probiótico pode diferir entre linhagens de uma mesma espécie, isso porque a ação de microrganismos probióticos é linhagem específica, ou seja, dentro de uma mesma espécie as linhagens podem possuir áreas de aderência distintas, efeitos imunológicos específicos e seus mecanismos de ação sobre a mucosa e microbiota também podem ser diferentes (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004). Além disso, não existe um consenso a respeito da dose apropriada, uma vez que a dificuldade em se fixar um valor para a dosagem correta é influenciada pela escolha do probiótico, ou combinações destes, e do objetivo para qual vai ser aplicado. Há, no entanto, uma tendência errônea no mercado de interpretar que uma dose maior é melhor e traz mais benefícios, porém esta conclusão é limitada e carece de mais pesquisas (FORSSTEN; OUWEHAND, 2020; OUWEHAND et al., 2018). No Brasil, a recomendação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) traz que a quantidade mínima viável em uma formulação probiótica encontra-se na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação para consumo diário (ANVISA, 2008). Por isso, essas dosagens são frequentemente administradas.

Diante desta definição, a formulação comercializada utilizada neste trabalho, que contém 10^9 UFC de cada bactéria, foi diluído em 1 mL de salina 0,9% e os animais tratados receberam por gavagem intragástrica o equivalente a 10^8 UFC. De acordo com Charteris et al. (1998), é necessário uma concentração intestinal de 10^6 a 10^7 UFC para manutenção das atividades fisiológicas desejadas com o probiótico, que foi atingida neste estudo. Além disso, a concentração da formulação comercial atende a quantidade mínima determinada pela ANVISA (2008).

No que se referem à mucosite intestinal, poucos estudos são encontrados na literatura acerca do protocolo ideal para tratar/prevenir a doença, sendo que os tratamentos disponíveis são paliativos e muitas vezes ineficazes. Sabe-se que a condição é desencadeada a partir do tratamento por quimioterapia/radioterapia durante terapias oncológicas e, sob essa perspectiva, podemos sugerir que a condição da mucosite é parcialmente previsível, já que o tratamento do câncer é definido quando a doença é diagnosticada. Em concordância com essas condições, conhecer o melhor protocolo de tratamento para mucosite é importante. Neste

trabalho optamos pelo tratamento preventivo, que consiste em iniciar com o probiótico antes do desenvolvimento da doença, com o objetivo de prevenir ou atenuar os sintomas que serão desencadeados pela mucosite intestinal. Essa estratégia foi baseada em trabalhos que obtiveram sucesso ao utilizarem o tratamento preventivo (QUINTANILHA et al., 2022; SOUZA et al., 2023; TRINDADE et al., 2021).

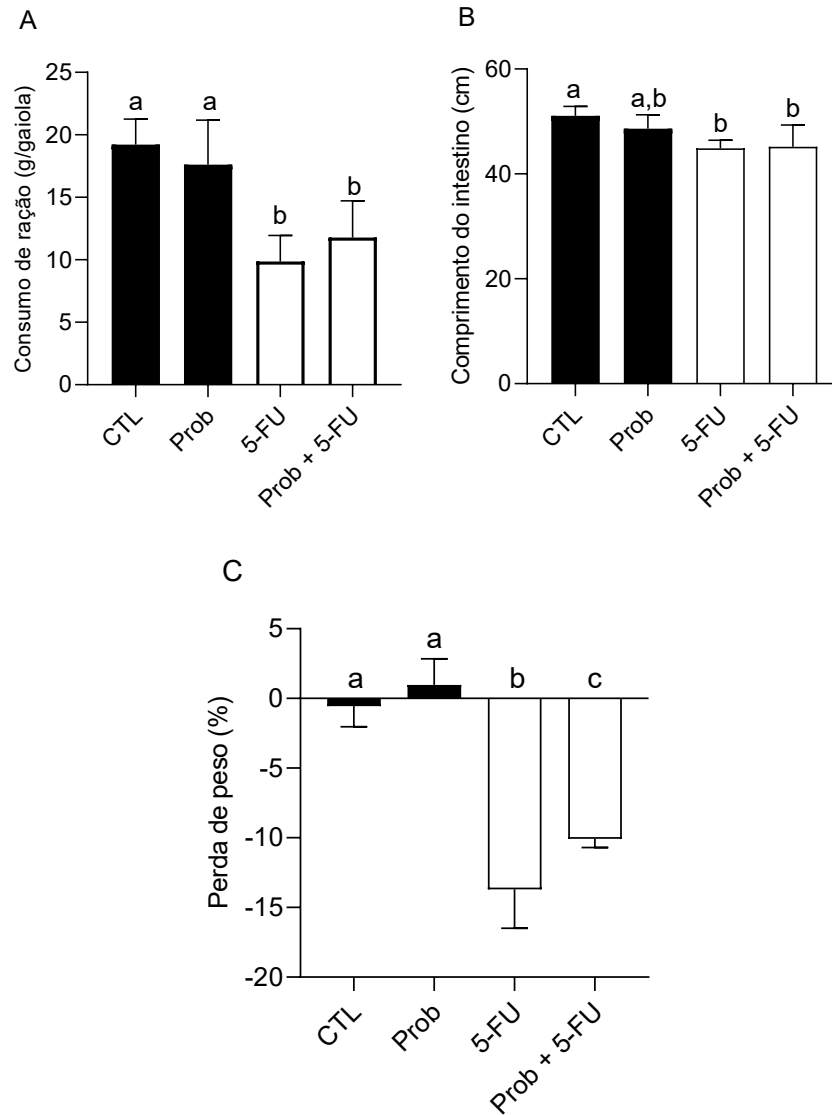
A partir destas definições, foram feitas análises acerca dos parâmetros comuns da mucosite intestinal, seguindo os protocolos apresentados na seção 4.

5.2 Avaliação do consumo alimentar e perda de peso

A mucosite é considerada uma das complicações clínicas mais comuns que podem afetar o estado nutricional de pacientes oncológicos, uma vez que o comprometimento na ingestão de alimentos pode ser ocasionado por anormalidades no TGI desencadeada por doenças ou uso de determinados fármacos (EDUARDO et al., 2018). Com isso, a redução da ingestão alimentar, encurtamento do comprimento do intestino delgado e perda de peso podem acontecer devido ao processo inflamatório agudo e presença de lesões teciduais características da mucosite (DE JESUS et al., 2019; SONIS, 2004).

Nossos resultados mostraram que os animais em todos grupos experimentais tiveram níveis semelhantes de ingestão de alimentos durante o tratamento com o Probiatop® ou solução salina. No entanto, após a indução da doença, como esperado, os grupos que foram administrados o 5-FU reduziram significativamente o consumo de ração, o tamanho do intestino e aumentou a perda de peso em comparação ao grupo controle (CTL) ($p < 0,05$). O grupo Prob + 5-FU não foi capaz de reverter a redução alimentar e o comprimento do intestino delgado causado pela mucosite (Figura 8-A-B) ($p > 0,05$), porém atenuou significativamente a perda de peso em relação ao grupo 5-FU (Figura 8-C) ($p < 0,05$). Contudo, é válido ressaltar que administração do probiótico individualmente não interferiu negativamente nesses parâmetros, uma vez que o grupo Prob não apresentou diferença estatística quando comparado com o controle (CTL).

Figura 8: Avaliação do consumo de ração por gaiola, comprimento intestinal e perda de peso. Os grupos analisados foram: CTL: Controle, Prob: Probiatop®, 5-FU: Mucosite, e Prob + 5-FU: tratamento com Probiatop® e mucosite induzida. Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre grupos, determinado por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Resultados similares são encontrados na literatura mostrando que o tratamento com probióticos não tem impacto significativo na redução do consumo alimentar causado pela mucosite, mas podem atenuar a perda de peso. Maioli e colaboradores (MAIOLI et al., 2014) demonstraram que a levedura *S. boulardii* não foi capaz de reverter o agravamento na ingestão alimentar após indução da mucosite. Jesus e colaboradores (2019), ao avaliarem o efeito terapêutico de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 no modelo de mucosite intestinal induzida 5-FU,

mostraram que a linhagem bacteriana estudada foi capaz de prevenir a redução do comprimento do intestino, mas não aumentou o consumo alimentar após indução da mucosite no grupo que recebeu o probiótico (MUC + CIDCA 133).

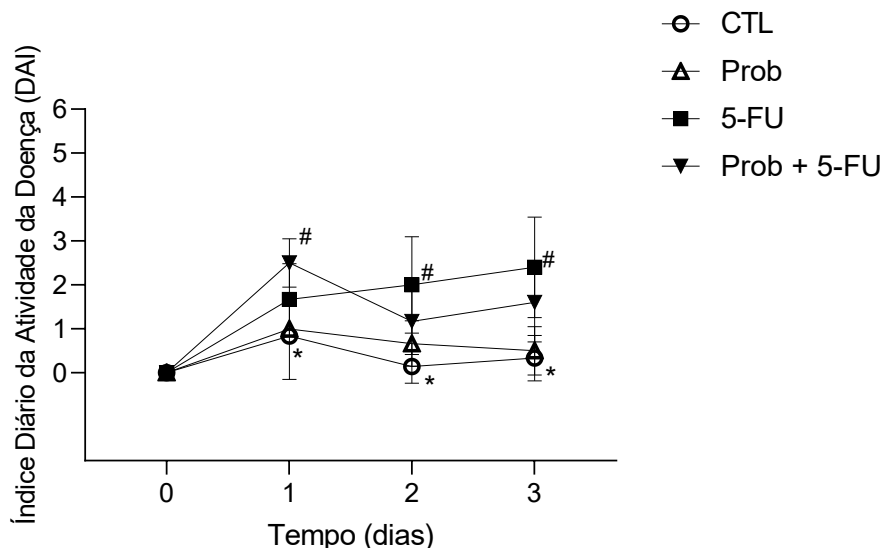
Sabendo dos efeitos sobre a inflamação causada pelo 5-FU, uma hipótese que pode explicar a diminuição do consumo alimentar é o atraso no esvaziamento gástrico, isso porque a inflamação intestinal está associada a anormalidades no controle da motilidade gastrointestinal, não apenas no local da inflamação, mas também em locais distantes não inflamados (SOARES et al., 2008). Em contrapartida, o tratamento com o probiótico melhorou a arquitetura do tecido, preservando as vilosidades, o que pode levar a melhora na capacidade de absorção de nutrientes e redução da perda de peso dos animais do grupo tratado (Prob + 5-FU).

5.3 Avaliação do índice de atividade da doença (DAI)

Dentre os efeitos colaterais da mucosite, podemos destacar a diarreia, que se caracteriza pelo aumento da frequência das evacuações e redução da consistência das fezes, podendo ou não ser acompanhadas de sangue ou cólicas (GIBSON; KEEFE, 2006; SALTZ et al., 2001). Desta maneira, o índice de atividade da doença (DAI) tem sido proposto como um escore acumulativo indicador da gravidade do dano intestinal causado pela mucosite, e este é capaz de monitorar o agravamento desta condição de forma tempo-dependente a partir desses parâmetros (BAJIC et al., 2016; CHARTIER; HOWARTH; MASHTOUB, 2020; MASHTOUB et al., 2015).

Após a administração do quimioterápico ou salina, o DAI foi monitorado diariamente em uma escala de 0-9, considerando como parâmetros a perda de massa corporal, sangue oculto nas fezes e consistência das fezes. A administração do 5-FU não agravou o DAI dos animais no dia 1 ($p > 0,05$), porém aumentou o índice da doença nos dias 2 e 3, em comparação com o grupo CTL ($p < 0,05$). O tratamento com Probiatop® promoveu aumento significativo dos sintomas no primeiro dia após indução da mucosite em relação ao grupo CTL ($p < 0,05$). Nos dias 2 e 3 o 5-FU levou ao aumento do DAI com a piora do escore neste grupo (5-FU), porém, nesses dias, o tratamento com o Probiatop® (Prob + 5-FU) mostrou uma tendência de melhora, sem importância significativa, dos sintomas em comparação ao grupo 5-FU. Dados mostrados na Figura 9.

Figura 9: Índice de atividade da doença após indução da mucosite. CTL: Controle, Prob: Probiatop®, 5-FU: Mucosite, e Prob + 5-FU: tratamento com Probiatop® e mucosite induzida. Símbolos indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$), sendo # diferença entre os grupos CTL vs. 5-FU + Prob e entre grupos CTL vs. 5-FU ($p \leq 0,05$) determinado por ANOVA two-way, seguido do pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A diarreia pode ser ocasionada por alterações no controle osmótico, na motilidade intestinal ou mudanças no perfil microbiano. Além disso, alguns trabalhos sugerem que a migração de neutrófilos para o epitélio promova aumento na permeabilidade intestinal, favorecendo a ocorrência de diarreia (GIBSON; KEEFE, 2006). Segundo MEGO e colaboradores (2015), algumas bactérias lácticas podem reforçar a barreira intestinal contra antígenos estranhos, manter a integridade das junções apertadas das células epiteliais, o que poderia diminuir a gravidade da diarreia relatada em pacientes sob terapia antineoplásica.

Apesar do nosso tratamento não ter apresentado melhora no DAI, os resultados apresentados (seção 5.2) mostraram melhora da perda de massa corporal no grupo tratado (Prob + 5-FU). Alguns resultados na literatura têm demonstrado que probióticos são capazes de atenuar sintomas como a perda de massa corporal e ocorrências de diarreia. Coutinho e colaboradores (2022), por exemplo, observaram um DAI aumentado após indução da mucosite com 5-FU, enquanto que animais tratados com *Rhodotorula mucilaginosa* UFMGCB 18,377 apresentaram redução dos danos intestinais e um DAI significativamente reduzido.

5.4 Avaliação de MPO e EPO

A patogênese da mucosite intestinal induzida por 5-FU envolve lesão intestinal que está associada à infiltração inflamatória no intestino delgado (SOARES et al., 2008) que pode ser verificada pelo aumento da atividade da mieloperoxidase (infiltração de neutrófilos) e da peroxidase eosinofílica (infiltração de eosinófilos). As metaloproteases secretadas por essas células são essenciais para o processo inflamatório causado pela mucosite, promovendo degradação tecidual que evolui para formação de úlceras, necrose de criptas e redução da espessura da camada muscular (CINAUSERO et al., 2017).

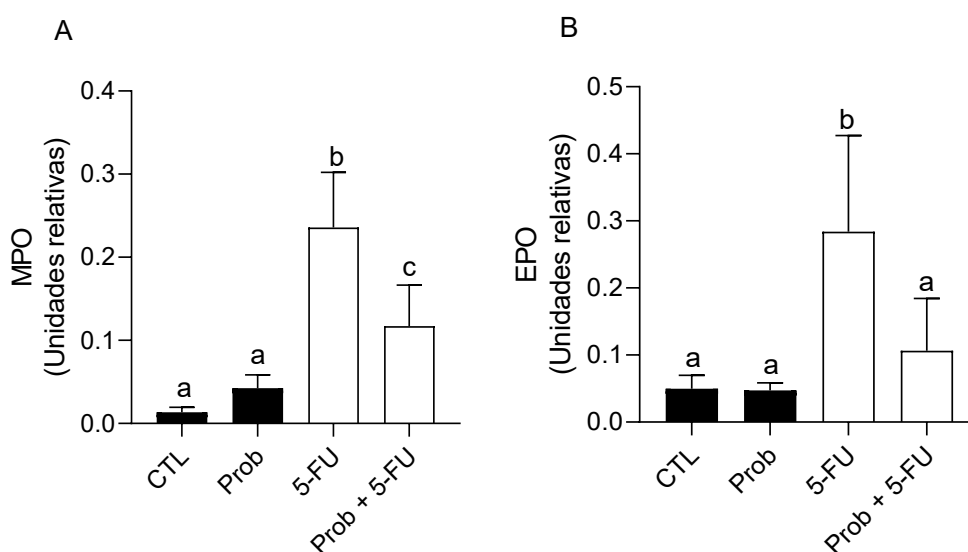
Os neutrófilos exercem um papel importante na manutenção da homeostase intestinal, eles possuem mecanismos de defesa cruciais para eliminação de microrganismos que translocam do lúmen para a LP, por meio da camada de células epiteliais intestinais. Além disso, atuam também na resposta inflamatória, uma vez que agem sobre os mecanismos de fagocitose, produção de radicais livres, bem como na produção e ativação de mediadores inflamatórios (REAVES; CHIN; PARKOS, 2005). Os eosinófilos são um componente do sistema imunológico inato que, inicialmente, reside nos tecidos mucosos, especialmente no TGI. Essas células promovem a inflamação pela liberação de proteínas granulares tóxicas e radicais livres, assim como pela produção de diversos mediadores pró-inflamatórios como leucotrienos, prostaglandinas, citocinas e quimiocinas (HOGAN; WADDELL; FULKERSON, 2013). Neste sentido, trabalhos utilizando *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em modelos de mucosite intestinal por 5-FU têm demonstrado potencial anti-inflamatório, por meio de mecanismos dependentes, em parte, da redução de citocinas pró-inflamatórias e do infiltrado de neutrófilos (JUSTINO et al., 2015; YUAN et al., 2014).

Para verificar se o tratamento com o probiótico poderia reduzir a infiltração de neutrófilos e eosinófilos na mucosa intestinal, a infiltração destes foi mensurada por MPO e EPO, respectivamente. A indução da mucosite contribuiu para o recrutamento significativo de neutrófilos intestinais e eosinófilos ($p < 0,05$) (Figura 10-A-B). No entanto, os animais com mucosite induzida que receberam o tratamento com probiótico mostraram níveis reduzidos de infiltração de neutrófilos e eosinófilos ($p < 0,05$).

A redução de infiltrados inflamatórios pode estar associado a preservação da arquitetura do tecido, fazendo com que o recrutamento de neutrófilos e eosinófilos

seja diminuído. Achados semelhantes também foram observados anteriormente em outros probióticos, como *R. mucilaginoso* UFMGCB 18,377 e *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5^{1A}. (COUTINHO et al., 2022; QUINTANILHA et al., 2022). Além disso, esse efeito, de redução de infiltrados inflamatórios, pode estar associado a modulação da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, como IL1 β e TNF, na qual o Probiatop® reduziu significativamente (Figura 13). Isso porque a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias aumenta a PI e induz uma cascata de eventos inflamatórios resultando em lesão da mucosa por invasão de células imunes (neutrófilos, macrófagos teciduais e células dendríticas) (MARCHIANDO; GRAHAM; TURNER, 2010), sugerindo que o uso de probióticos pode atenuar a resposta inflamatória induzida por quimioterápicos.

Figura 10: Avaliação de MPO e EPO no íleo. CTL: Controle, Prob: Probiatop®, 5-FU: Mucosite, e Prob + 5-FU: tratamento com Probiatop® e mucosite induzida. Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$), determinado por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Avaliação da permeabilidade e translocação bacteriana

O epitélio intestinal é revestido por uma camada única de células que estão conectadas por junções firmes, estabelecendo a formação de uma barreira física e controle da permeabilidade no intestino, fatores fundamentais para manutenção da homeostase intestinal (GATT; REDDY; MACFIE, 2007; MACFIE et al., 2005). Quando a barreira intestinal sofre danos, há um aumento da permeabilidade

intestinal (PI) favorecendo a translocação de bactérias, ou seus subprodutos, podendo levar a ocorrências de doenças no TGI (GENEROSO et al., 2011). Conforme já foi descrito por Sonis (2004), as manifestações tardias da mucosite intestinal é caracterizada pelo aumento da PI, atrofia das vilosidades e criptas, levando a uma perda da função da barreira epitelial (DANIELE et al., 2001; SONG; PARK; SUNG, 2013).

Os dados apresentados na Figura 11-A mostram que a PI foi aumentada no grupo 5-FU ($p < 0,05$) em comparação ao grupo CTL, enquanto que a administração do probiótico promoveu a redução significativa deste parâmetro ($p < 0,05$) no grupo 5-FU + Prob. A expressão gênica de claudina-2 foi aumentada com a indução da mucosite (5-FU) de forma significativa e o tratamento com o probiótico (Prob + 5-FU) demonstrou redução significativa da expressão desse gene ($p < 0,05$) (Figura 11-B). Com relação a translocação bacteriana, foi observado que a indução da mucosite aumentou significativamente a translocação de ^{99m}TC-*E. coli*, para todos os órgãos analisados e sangue quando comparada ao grupo CTL (sangue: $p = 0,001$; pulmão: $p = 0,003$; baço: $p = 0,03$; fígado: $p = 0,0001$; MLN: $p = 0,02$ e rim: $p = 0,02$) (Figuras 11-C-H). O tratamento com o probiótico diminuiu significativamente os níveis de translocação bacteriana para o sangue e órgãos quando comparado ao grupo 5-FU (sangue: $p = 0,03$; pulmão: $p = 0,002$; baço: $p = 0,02$; fígado: $p = 0,002$; MLN: $p = 0,001$ e rim: $p = 0,02$). Com isso, estes resultados indicam que o probiótico foi capaz de atenuar o aumento da PI em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU e reduzir a translocação bacteriana.

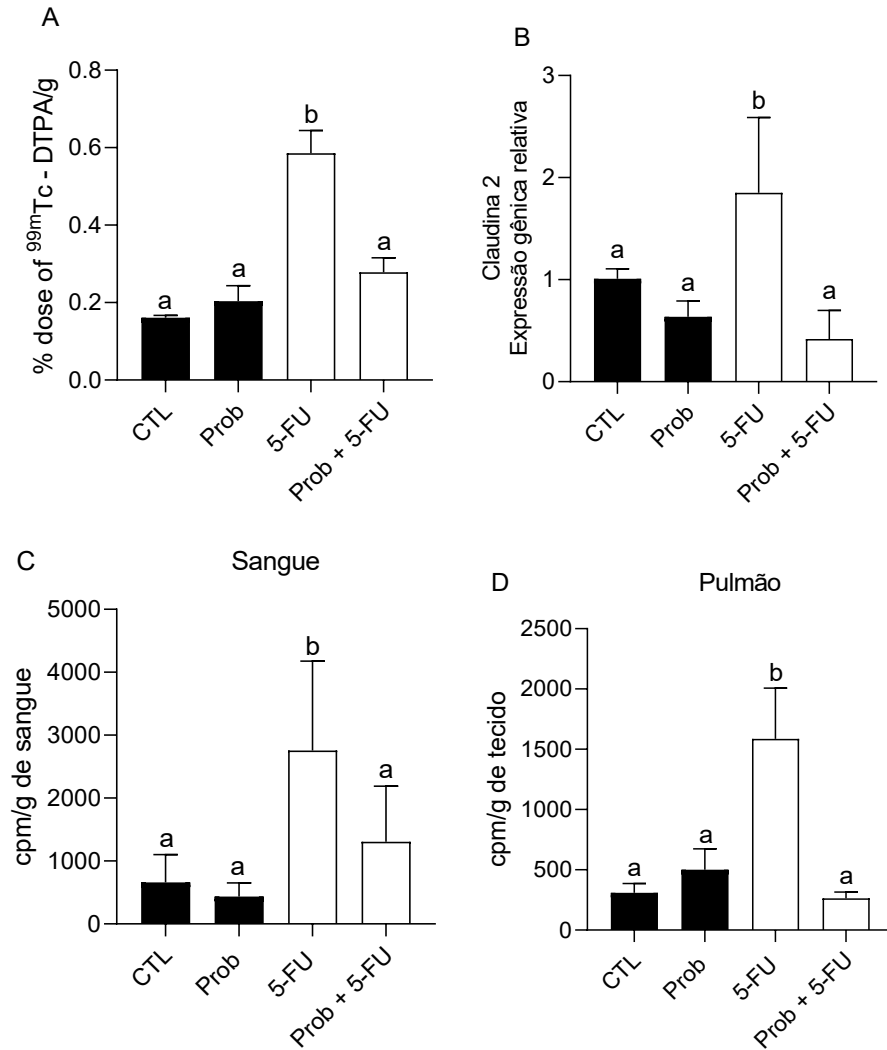
Em nosso trabalho, assim como em outros relatos (FERREIRA et al., 2012; LI et al., 2017; SONG; PARK; SUNG, 2013) foi demonstrado que o quimioterápico 5-FU aumenta a PI. Com isso, estudos na literatura tem sugerido que o uso de probióticos, posbióticos e simbióticos pode diminuir o dano causado pela mucosite na barreira intestinal, induzindo a redução da permeabilidade e translocação bacteriana (COUTINHO et al., 2022; GENEROSO et al., 2011; QUINTANILHA et al., 2022; SOUZA et al., 2023; TRINDADE et al., 2018, 2021).

O epitélio intestinal forma a maior e mais importante barreira entre nossos ambientes interno e externo. A barreira é mantida pela expressão de proteínas, como caderinas, claudinas e ocludinas, que selam as células adjacentes e fornecem ancoragem ao citoesqueleto (GROSCWITZ; HOGAN, 2009). As claudinas são uma

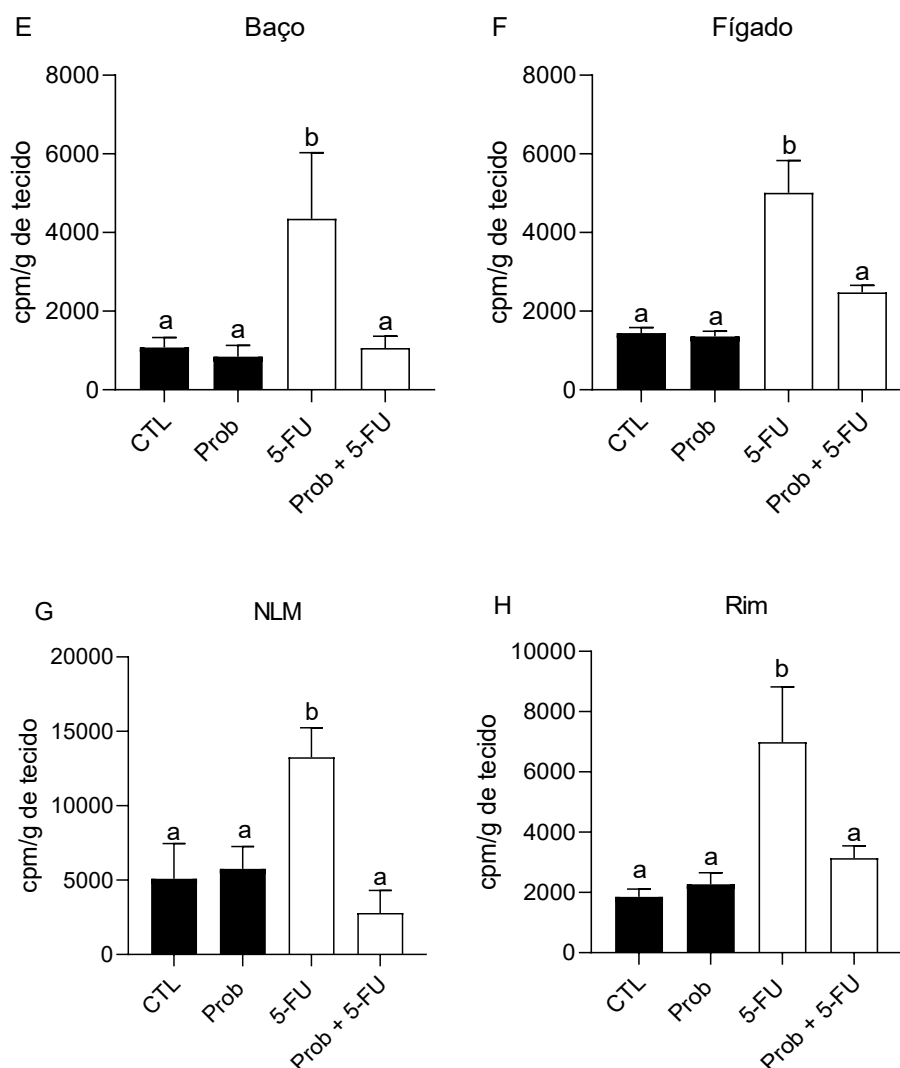
família de proteínas expressas de formas distintas entre os tecidos e exercem diferentes efeitos na permeabilidade paracelular, regulando criticamente a seletividade da barreira epitelial. A claudina-2, por exemplo, é uma claudina formadora de poros cuja expressão tem se mostrado elevada em pacientes com várias DII (BARRETT, 2020; GROSCWITZ; HOGAN, 2009).

Sugerimos a hipótese de que a redução da PI pode estar associado ao recrutamento de neutrófilos e eosinófilos, isso porque essas células secretam metaloproteases, que promovem degradação tecidual que evolui para a formação de úlceras, necrose de criptas e redução da espessura da camada muscular (CINAUSERO et al., 2017). Além disso, nossos resultados sugerem que a redução na expressão de claudina-2 no grupo tratado (Prob + 5-FU) reforça mais uma vez a capacidade do probiótico em reduzir o dano causado pelo quimioterápico, induzindo melhora na barreira epitelial.

Figura 11: Avaliação da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana. (A) Permeabilidade intestinal por ^{99m}Tc -DTPA em amostras de sangue. (B) Expressão gênica relativa de Claudina-2. Quantificação da translocação bacteriana em amostras de (C) Sangue, (D) Pulmão, (E) Baço, (F) Fígado, (G) Linfonodos mesentéricos e (H) Rins. As barras representam os grupos analisados CTL: Controle, Prob: Probiatop®, 5-FU: Mucosite, e Prob + 5-FU: tratamento com Probiatop® e mucosite induzida. Letras diferentes (a e b) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) por one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.



continua...



Fonte: Elaborado pelo autor.

O dano intestinal causado pelo 5-FU leva a distúrbios na barreira epitelial que permite a translocação de patógenos intestinais, o que pode contribuir para um agravamento da mucosite. A translocação bacteriana pode ser estratificada em três níveis: local, quando as bactérias atingem os linfonodos mesentéricos; regional, quando a bactéria se localiza no sistema venoso portal e no fígado; e sistêmico, quando é observada a presença de bactérias no sangue periférico e baço (WONG et al., 2015). O tratamento com 5-FU induziu uma translocação bacteriana sistêmica associada à gravidade da mucosite, como esperado. Esta condição simula um quadro de infecção sistêmica que pode ser desenvolvido por pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico, sendo este um efeito colateral grave, com potencial risco de vida. Nossos resultados mostram que a quantificação da radioatividade em amostras de sangue e nos demais órgãos, incluindo os linfonodos mesentéricos,

foram significativamente iguais em animais saudáveis que receberam salina (CTL) e os grupos tratados com Probiatop® (Prob e Prob + 5-FU).

Estes resultados sugerem, pelo menos em parte, que o probiótico foi capaz de impedir a progressão da ocorrência de uma bacteremia local, regional e sistêmica, uma vez que a diminuição da translocação bacteriana está associada a uma diminuição da PI e da inflamação. Reduziu também o dano causado nas junções apertadas com a redução da expressão de Claudina 2, o que leva a um menor dano tecidual e à preservação da barreira epitelial.

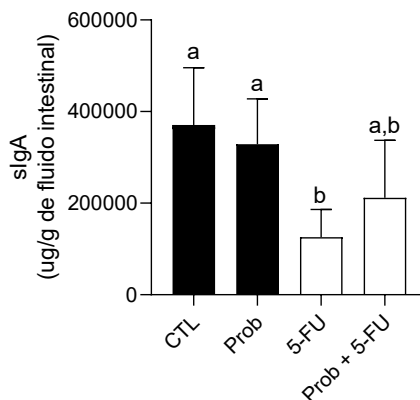
5.6 Avaliação dos níveis intestinais de sIgA

A adesão é um passo inicial necessário para posterior translocação bacteriana, e é bem conhecido que baixas concentrações de sIgA intestinal estão associadas com aumento da aderência bacteriana à mucosa (GENEROSO et al., 2011). A administração de 5-FU promove a diminuição dos níveis intestinais de sIgA, diminuindo o número de linfócitos B e outras células responsáveis pela indução da secreção de IgA no intestino (MAIOLI et al., 2014)

Como esperado, foi observado que a produção e secreção de sIgA para o fluido intestinal diminuiu significativamente no grupo mucosite (5-FU) quando comparado ao grupo controle (CTL) ($p < 0,05$). O tratamento com o probiótico (Prob + 5-FU) não alterou os níveis de sIgA, pois não observamos diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) deste grupo em comparação ao grupo 5-FU. Contudo, é válido ressaltar que administração do probiótico individualmente não interferiu negativamente na secreção de sIgA, uma vez que o grupo Prob não apresentou diferença estatística quando comparado com o controle (CTL) ($p > 0,05$). Estes resultados são apresentados na Figura 12.

Este resultado não era esperado, uma vez que vários estudos têm associado o tratamento de probióticos com aumento da produção de sIgA em modelo de mucosite induzida por 5-FU (COUTINHO et al., 2022; TRINDADE et al., 2021).

Figura 12: Avaliação dos níveis de sIgA no fluido intestinal. CTL: Controle, Prob: Probiatop®, 5-FU: Mucosite, e Prob + 5-FU: tratamento com Probiatop® e mucosite induzida. Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$), determinado por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.7 Avaliação da expressão de citocinas por qPCR

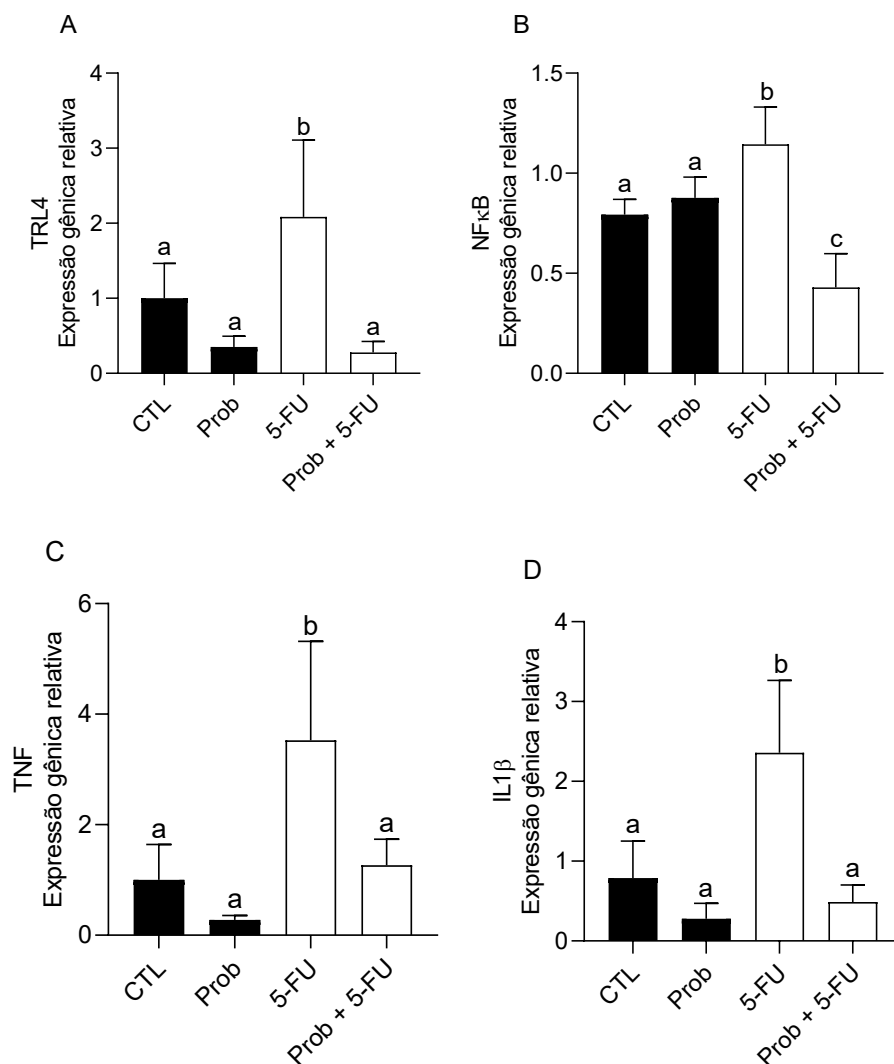
De acordo com a literatura, as citocinas e a geração de espécies reativas de oxigênio exercem um papel importante nas vias de desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por quimioterápicos atualmente utilizados. Dentre as citocinas pró-inflamatórias que desempenham uma função essencial no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida, destacam-se o TNF e IL1 β , cujas expressões são moduladas diretamente via NF- κ B (FERREIRA et al., 2012; SONIS, 2004). Neste sentido, foi avaliado o papel do Probiatop® na regulação da expressão destas citocinas que estão intimamente envolvidas na patogênese da mucosite.

A expressão de TLR4 e NF- κ B, assim como das citocinas pro-inflamatórias TNF e IL1 β , foram significativamente aumentadas no grupo mucosite (5-FU) em comparação aos grupos controle (CTL) e Probiatop® (Prob) ($p < 0,05$). Entretanto, os animais que foram tratados com o probiótico (Prob + 5-FU) mostraram redução significativa na expressão de TLR4 e NF- κ B ($p < 0,05$) e a expressão das citocinas TNF e IL1 β ($p < 0,05$) (Figura 13).

A expressão aumentada de NF- κ B na fase de amplificação de sinais, atua via um mecanismo de autorregulação exacerbando a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL1 β e IL6, de forma a contribuir para a evolução da doença (LOGAN et al., 2007; SONIS, 2004). Neste sentido, a inibição do NF- κ B tem sido sugerida como uma estratégia atraente para a prevenção da mucosite (CHANG

et al., 2018). O receptor *toll-like 4* (TLR4) é um membro da família TLR que ativa a via NF- κ B, levando ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (KOUSHKI et al., 2021). Estudos publicados anteriormente mostraram que a presença de lipopolissacarídeos (LPS) e flagelina de bactérias Gram-negativo pode danificar o epitélio intestinal e induzir inflamação devido à estimulação da resposta imune pela ação de receptores TLR 4 e 5, respectivamente. Entretanto, administração de *L. rhamnosus* JL-1 diminuiu os danos causados pelo LPS ao inibir a via de sinalização de TLR4/NF- κ B, atuando na modulação das respostas imunes (LI et al., 2020).

Figura 13: Avaliação da expressão gênica em amostras de íleo de camundongos. (A) TLR4, (B) NF- κ B, (C) TNF, (D) IL1 β . CTL: Controle, Prob: Probiatop®, 5-FU: Mucosite, e Prob + 5-FU: tratamento com Probiatop® e mucosite induzida. Letras diferentes (a, b e c) significam diferença estatística entre grupos ($p \leq 0,05$), determinado por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir disso, nossa hipótese a cerca destes resultados é que a inibição do receptor TLR4 reduziu a resposta inflamatória, a jusante a via de sinalização TLR4/NF- κ B, contribuindo para a supressão da síntese das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL1 β . Nossos resultados corroboram com outros estudos que avaliaram a administração de probióticos em mucosite induzida e viram que a expressão dessas citocinas também foi diminuída (QUINTANILHA et al., 2022; SOUZA et al., 2023).

5.8 Avaliação do escore histológico

A perda da arquitetura intestinal é ocasionada a partir das alterações inflamatórias induzidas pelos quimioterápicos durante a fase de amplificação de sinais, onde é observada a paralisação da divisão celular e apoptose das células. Assim, há uma perda significativa da arquitetura e integridade do intestino delgado, encurtamento das vilosidades e depleção de células caliciformes, além de um intenso infiltrado inflamatório local (SOARES et al., 2013; SONIS, 2004).

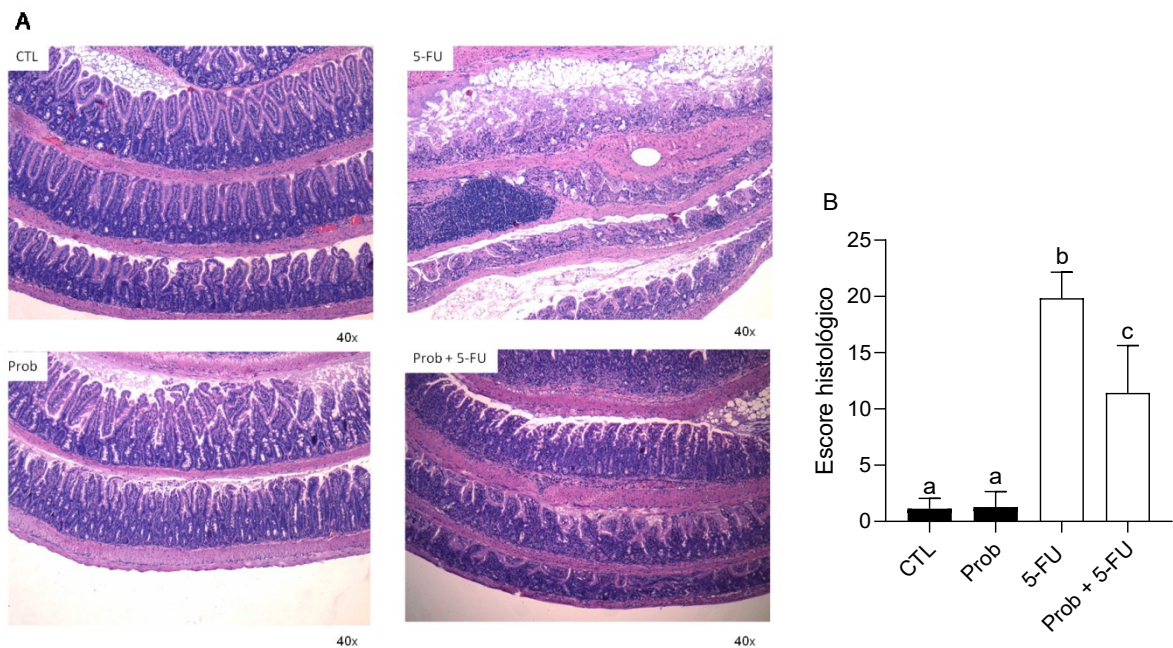
As avaliações das alterações macroscópicas no tecido (Figura 14-A) foi realizada utilizando um escore de dano à mucosa para quantificação dos resultados. Os achados histológicos revelaram que camundongos em que não foi induzida a mucosite (grupos CTL e Prob) a mucosa apresentou aspecto regular, confirmando que a administração do probiótico não alterou a morfologia da mucosa, tendo sido observado apenas um leve infiltrado de células inflamatórias em animais do grupo Prob. Em contraste, a integridade da mucosa foi perdida nos animais submetidos à mucosite experimental (5-FU) ($p < 0,05$) e o tratamento com o Probiatop® em animais com mucosite (Prob + 5-FU) resultou em menor grau de lesão. Esses resultados indicam um escore significativamente reduzido após tratamento com o probiótico (Figura 20-B) ($p < 0,05$).

A literatura existente até o momento indica que os resultados deste estudo estão em linha com outros autores, pois o dano ao epitélio intestinal decorrente do uso de medicamentos quimioterápicos geralmente causam redução das vilosidades intestinais, elevado escore histológico da mucosa, perda da arquitetura e necrose das criptas intestinais, além de intenso infiltrado de células inflamatórias na mucosa intestinal (ARIFA et al., 2014; CARVALHO et al., 2021; GUABIRABA et al., 2014; MAIOLI et al., 2014).

Corroborando com nossos resultados referente ao dano causado pela mucosite na arquitetura epitelial, Trindade e colaboradores (2021) avaliou o posbiótico (*L. rhamnosus* CGMCC1.3724 inativado) e observou que o tratamento foi capaz de preservar vilosidades e criptas intestinais e reduzir o infiltrado inflamatório no tecido em modelo de mucosite animal induzida.

Com base nos resultados deste trabalho, podemos inferir que o probiótico tem um efeito positivo na integridade da estrutura da mucosa. Isso pode estar associado à sua capacidade de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, possivelmente, inibindo a ativação da via NF- κ B, ajudando a proteger a mucosa de uma lesão tecidual exacerbada.

Figura 14: Análise histológica do íleo de camundongos submetidos ao modelo murino de mucosite intestinal. (A) Fotodocumentação de lâminas de seções de íleo coradas em hematoxilina e eosina, representando todos os grupos experimentais e (B) escore histológico. As barras representam os grupos analisados CTL: Controle, Prob: Probiatop®, 5-FU: Mucosite, e Prob + 5-FU: tratamento com Probiatop® e mucosite induzida. Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) por ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que o tratamento com Probiatop® apresentou melhorias significativas na perda de massa corporal, redução dos indicadores inflamatórios (mieloperoxidase, peroxidase eosinofílica e citocinas pró-inflamatórias), diminuição do escore histológico, indicando melhora na arquitetura tecidual no modelo de mucosite induzida por 5-FU em camundongos. Além disso, o probiótico demonstrou um efeito protetor em relação à barreira epitelial, reduzindo a permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana no modelo de mucosite estudado. Em resumo, a administração do Probiatop® melhora os danos causados pela mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico 5-FU em camundongos, sugerindo ser uma estratégia terapêutica em associação a tratamentos quimioterápicos.

7 REFERÊNCIAS

AARNOUTSE, R. et al. The Clinical Link between Human Intestinal Microbiota and Systemic Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, 1 set. 2019.

ALEXANDER, J. L. et al. Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 14, n. 6, p. 356–365, 1 jun. 2017.

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

ARANTES, R. M. E.; NOGUEIRA, A. M. M. F. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. **Cell and tissue research**, v. 290, n. 1, p. 61–69, 1997.

ARIFA, R. D. N. et al. Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecan-induced mucositis through IL-1 β and IL-18 in mice. **The American journal of pathology**, v. 184, n. 7, p. 2023–2034, 2014.

AVERSHINA, E. et al. Transition from infant- to adult-like gut microbiota. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 7, p. 2226–2236, 1 jul. 2016.

BAJIC, J. E. et al. Rhubarb extract partially improves mucosal integrity in chemotherapy-induced intestinal mucositis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 37, p. 8322, 10 out. 2016.

BARRETT, K. E. Claudin-2 pore causes leak that breaches the dam in intestinal inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 10, p. 5100, 8 ago. 2020.

BASILE, D. et al. Mucosal Injury during Anti-Cancer Treatment: From Pathobiology to Bedside. **Cancers**, v. 11, n. 6, 1 jun. 2019.

BATISTA, V. L. et al. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 2246, 17 set. 2020.

BLIJLEVENS, N.; SONIS, S. Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor-1): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis. **Annals of Oncology**, v. 18, n. 5, p. 817–826, 1 maio 2007.

BOKULICH, N. A. et al. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. **Science translational medicine**, v. 8, n. 343, 15 jun. 2016.

CARVALHO, P. L. A. et al. Prophylactic and therapeutic supplementation using

fructo-oligosaccharide improves the intestinal homeostasis after mucositis induced by 5- fluorouracil. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 111012, 1 jan. 2021.

CASTAGLIUOLO, I. et al. Saccharomyces boulardii Protease Inhibits the Effects of Clostridium difficile Toxins A and B in Human Colonic Mucosa. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 302, 1999.

CHANG, C. W. et al. Lactobacillus casei Variety rhamnosus probiotic preventively attenuates 5-Fluorouracil/Oxaliplatin-induced intestinal injury in a syngeneic colorectal cancer model. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 983, 15 maio 2018.

CHANG, C. W. et al. Fecal Microbiota Transplantation Prevents Intestinal Injury, Upregulation of Toll-Like Receptors, and 5-Fluorouracil/Oxaliplatin-Induced Toxicity in Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, p. 386, 2 jan. 2020.

CHARTERIS, W. P. et al. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, v. 51, n. 4, p. 123–136, nov. 1998.

CHARTIER, L. C.; HOWARTH, G. S.; MASHTOUB, S. Chemotherapy-induced mucositis development in a murine model of colitis-associated colorectal cancer. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 55, n. 1, p. 47–54, 2 jan. 2020.

CHEN, X. et al. Saccharomyces boulardii inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both in vitro and in vivo and protects against Clostridium difficile toxin A-induced enteritis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 34, p. 24449–24454, 2006.

CHENG, L. K. et al. Gastrointestinal system. **Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine**, v. 2, n. 1, p. 65, jan. 2010.

CINAUSERO, M. et al. New Frontiers in the Pathobiology and Treatment of Cancer Regimen-Related Mucosal Injury. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JUN, 8 jun. 2017.

CIORBA, M. A. et al. Probiotics to prevent gastrointestinal toxicity from cancer therapy: An interpretive review and call to action. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 9, n. 2, p. 157–162, 6 jun. 2015.

COUTINHO, J. O. P. A. et al. Antarctic Strain of Rhodotorula mucilaginosa UFMGCB 18,377 Attenuates Mucositis Induced by 5-Fluorouracil in Mice. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 14, n. 3, p. 486–500, 1 jun. 2022.

CROSNIER, C.; STAMATAKI, D.; LEWIS, J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. **Nature reviews. Genetics**, v. 7, n. 5, p. 349–359, maio 2006.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics -

Saccharomyces boulardii. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, n. 6, p. 767–778, 19 jul. 2007.

DANIELE, B. et al. Effect of chemotherapy with 5-fluorouracil on intestinal permeability and absorption in patients with advanced colorectal cancer. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 32, n. 3, p. 228–230, 2001.

DE BARROS, P. A. V. et al. Conjugated linoleic acid prevents damage caused by intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in an experimental model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1567–1576, 1 jul. 2018.

DE JESUS, L. C. L. et al. Protective effect of Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis CIDCA 133 in a model of 5 Fluorouracil-Induced intestinal mucositis. **Journal of Functional Foods**, v. 53, p. 197–207, 1 fev. 2019.

DETHLEFSEN, L. et al. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16s rRNA sequencing. **PLoS Biology**, v. 6, n. 11, p. 2383–2400, nov. 2008.

DINIZ, S. O. F. et al. 99mTechnetium labelled Escherichia coli. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 51, n. 1, p. 33–36, 1 jul. 1999.

DUCARMON, Q. R. et al. Gut Microbiota and Colonization Resistance against Bacterial Enteric Infection. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 83, n. 3, p. 1–29, 21 ago. 2019.

EDUARDO, F. DE P. et al. Impact of Oral and Gastrointestinal Mucositis on Body Weight Alterations during Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Nutrition and cancer**, v. 70, n. 2, p. 241–248, 17 fev. 2018.

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, 1 jul. 2012.

FIETTO, J. L. . et al. Molecular and physiological comparisons between Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces boulardii. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 615–621, 1 ago. 2004.

FIJLSTRA, M. et al. Lactose maldigestion during methotrexate-induced gastrointestinal mucositis in a rat model. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 300, n. 2, fev. 2011.

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

GATT, M.; REDDY, B. S.; MACFIE, J. Review article: bacterial translocation in the critically ill – evidence and methods of prevention. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 25, n. 7, p. 741–757, 1 abr. 2007.

GEHART, H.; CLEVERS, H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem

cells. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** 2018 16:1, v. 16, n. 1, p. 19–34, 14 nov. 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.

GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. **Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, v. 14, n. 9, p. 890–900, set. 2006.

GILLILAND, S. E.; WALKER, D. K. Factors to Consider When Selecting a Culture of *Lactobacillus acidophilus* as a Dietary Adjunct to Produce a Hypocholesterolemic Effect in Humans. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 4, p. 905–911, abr. 1990.

GRAFF, S. et al. Influence of pH conditions on the viability of *Saccharomyces boulardii* yeast. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 221–227, 2008.

GRIBBLE, F. M.; REIMANN, F. Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. **Annual review of physiology**, v. 78, p. 277–299, 10 fev. 2016.

GROSCWITZ, K. R.; HOGAN, S. P. Intestinal Barrier Function: Molecular Regulation and Disease Pathogenesis. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 124, n. 1, p. 3, jul. 2009.

GUABIRABA, R. et al. IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumor chemotherapy in mice. **Mucosal Immunology** 2014 7:5, v. 7, n. 5, p. 1079–1093, 15 jan. 2014.

HILL, C. et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HOGAN, S. P.; WADDELL, A.; FULKERSON, P. C. Eosinophils in infection and intestinal immunity. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 29, n. 1, p. 7–14, jan. 2013.

HOOPER, L. V. Bacterial contributions to mammalian gut development. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 129–134, 1 mar. 2004.

HOWARTH, G. S. et al. Milk growth factors enriched from cheese whey ameliorate intestinal damage by methotrexate when administered orally to rats. **Journal of Nutrition**, v. 126, n. 10, p. 2519–2530, 1996.

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

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 299–313, 1 abr. 2004.

JOHANSSON, M. E. V.; HANSSON, G. C. **Immunological aspects of intestinal mucus and mucins** *Nature Reviews Immunology* NIH Public Access, , 8 out. 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC6435297/>. Acesso em: 6 mar. 2023

JUSTINO, P. F. C. et al. Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 559–567, 9 jan. 2015.

KORPELA, K. et al. Selective maternal seeding and environment shape the human gut microbiome. **Genome Research**, v. 28, n. 4, p. 561–568, 1 abr. 2018.

KOUSHKI, K. et al. Anti-inflammatory Action of Statins in Cardiovascular Disease: the Role of Inflammasome and Toll-Like Receptor Pathways. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 60, n. 2, p. 175–199, 1 abr. 2021.

KUNDU, P. et al. Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self. **Cell**, v. 171, n. 7, p. 1481–1493, 14 dez. 2017.

LI, H. L. et al. Alteration of gut microbiota and inflammatory cytokine/chemokine profiles in 5-fluorouracil induced intestinal mucositis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. OCT, p. 455, 26 out. 2017.

LI, X. et al. Protective effects of a novel *Lactobacillus rhamnosus* strain with probiotic characteristics against lipopolysaccharide-induced intestinal inflammation in vitro and in vivo. **Food and Function**, v. 11, n. 7, p. 5799–5814, 22 jul. 2020.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 1 dez. 2001.

LOGAN, R. M. et al. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: Pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, n. 5, p. 448–460, 1 ago. 2007.

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

LOZUPONE, C. A. et al. **Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota** *Nature* Nature, , 13 set. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22972295/>>. Acesso em: 6 mar. 2023

MACFIE, J. et al. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years. **British Journal of Surgery**, v. 93, n. 1, p. 87–93, 21 dez. 2005.

MACK, D. R. et al. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. **Gut**, v. 52, n. 6, p. 827, 1 jun.

2003.

MAIOLI, T. U. et al. Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. **Journal of Negative Results in Biomedicine**, v. 13, n. 1, p. 6, 11 abr. 2014.

MARCHIANDO, A. M.; GRAHAM, W. V.; TURNER, J. R. Epithelial barriers in homeostasis and disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 5, p. 119–144, 2 fev. 2010.

MARTINS, F. S. et al. Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 83–92, 2005.

MARTINS, F. S. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 352–359, 1 mar. 2007.

MARTINS, F. S. et al. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. **Archives of Microbiology**, v. 191, n. 8, p. 623–630, 13 ago. 2009.

MASHTOUB, S. et al. Oral Nucleotides only Minimally Improve 5-Fluorouracil-Induced Mucositis in Rats. **Nutrition and Cancer**, v. 67, n. 6, p. 994–1000, 18 ago. 2015.

MCCRACKEN, V. J.; LORENZ, R. G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. **Cellular microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2001.

MEGO, M. et al. Prevention of irinotecan induced diarrhea by probiotics: A randomized double blind, placebo controlled pilot study. **Complementary therapies in medicine**, v. 23, n. 3, p. 356–362, 1 jun. 2015.

MILANI, C. et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 4, dez. 2017.

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667–685, 19 out. 2014.

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

OHNO, H. Featured: Intestinal M cells. **Journal of Biochemistry**, v. 159, n. 2, p. 151, 1 nov. 2016.

OUWEHAND, A. C. et al. Effectiveness of Multistrain Versus Single-strain Probiotics: Current Status and Recommendations for the Future. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 52, p. S35–S40, 1 nov. 2018.

PHILIPPE, D. et al. Bifidobacterium lactis attenuates onset of inflammation in a murine model of colitis. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 17, n. 4, p. 459, 1 jan. 2011.

QUINTANILHA, M. F. et al. Bifidobacterium longum subsp. longum 51A attenuates intestinal injury against irinotecan-induced mucositis in mice. **Life Sciences**, v. 289, p. 120243, 15 jan. 2022.

REAVES, T. A.; CHIN, A. C.; PARKOS, C. A. Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. SUPPL. 1, p. 191–198, 2005.

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

REN, S. et al. The Probiotic Lactobacillus paracasei Ameliorates Diarrhea Cause by Escherichia coli O8 via Gut Microbiota Modulation1. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 814, 17 maio 2022.

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

SALTZ, L. B. et al. Irinotecan plus fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer: a new survival standard. **The oncologist**, v. 6, n. 1, p. 81–91, 1 fev. 2001.

SANDERS, M. E. Considerations for Use of Probiotic Bacteria to Modulate Human Health. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 2, p. 384S-390S, 1 fev. 2000.

SANDERS, M. E. et al. Probiotics for human use. **Nutrition Bulletin**, v. 43, n. 3, p. 212–225, 1 set. 2018.

SARA, J. D. et al. 5-fluorouracil and cardiotoxicity: a review. **Therapeutic advances in medical oncology**, v. 10, 1 jan. 2018.

SCHLEE, M. et al. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte β -defensin 2. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 151, n. 3, p. 528, mar. 2008.

SHARMA, R.; TOBIN, P.; CLARKE, S. J. Management of chemotherapy-induced nausea, vomiting, oral mucositis, and diarrhoea. **The Lancet Oncology**, v. 6, n. 2, p. 93–102, 1 fev. 2005.

SOARES, P. M. G. et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 91–98, 7 dez. 2008.

SOARES, P. M. G. et al. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine**, v. 61, n. 1, p. 46–49, 1 jan. 2013.

SONG, M.-K.; PARK, M.-Y.; SUNG, M.-K. 5-Fluorouracil-Induced Changes of Intestinal Integrity Biomarkers in BALB/C Mice. **Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 4, p. 322, 30 dez. 2013.

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, 1 mar. 2016.

SONIS, S. T. The biologic role for nuclear factor-kappaB in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy. **Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists**, v. 13, n. 5, p. 380–389, 2002.

SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. **Nature Reviews Cancer 2004 4:4**, v. 4, n. 4, p. 277–284, 2004.

SOUGIANNIS, A. T. et al. Understanding chemotherapy-induced intestinal mucositis and strategies to improve gut resilience. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 320, n. 5, p. G712, 5 maio 2021.

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

SOUZA, É. L. et al. Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis by modulating intestinal permeability, the inflammatory response and clinical signs in a faecal transplantation model. **Journal of medical microbiology**, v. 65, n. 3, p. 201–210, 1 mar. 2016.

SOUZA, R. O. et al. Evaluation of the Treatment with Akkermansia muciniphila BAA-835 of Chemotherapy-induced Mucositis in Mice. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 1, p. 1–18, 18 jan. 2023.

STRINGER, A. et al. Chemotherapy-Induced Modifications to Gastrointestinal Microflora: Evidence and Implications of Change. **Current Drug Metabolism**, v. 10, n. 1, p. 79–83, 1 jan. 2009.

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

TAP, J. et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 2574–2584, 1 out. 2009.

THOMAS, C. M.; VERSALOVIC, J. Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. **Gut Microbes**, v. 1, n. 3, p. 148, 2010.

THOMAS, S. et al. Adverse effects of 5-fluorouracil: Focus on rare side effects. **Cancer cell & microenvironment**, 30 mar. 2016.

THOMAS, S. et al. The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. **Cancer research**, v. 77, n. 8, p. 1783, 4 abr. 2017.

TRINDADE, L. M. et al. Oral administration of Simbioflora® (synbiotic) attenuates intestinal damage in a mouse model of 5-fluorouracil-induced mucositis. **Beneficial Microbes**, v. 9, n. 3, p. 477–486, 2018.

TRINDADE, L. M. et al. Paraprobiotic *Lactocaseibacillus rhamnosus* Protects Intestinal Damage in an Experimental Murine Model of Mucositis. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 1, p. 1–13, 15 set. 2021.

VAN DER SLUIS, M. et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. **Gastroenterology**, v. 131, n. 1, p. 117–129, 2006.

VANCAMELBEKE, M.; VERMEIRE, S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. **Expert review of gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 9, p. 821, 2 set. 2017.

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

WEHKAMP, J. et al. NF- κ B- and AP-1-Mediated Induction of Human Beta Defensin-2 in Intestinal Epithelial Cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a Novel Effect of a Probiotic Bacterium. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5750–5758, out. 2004.

WELLS, J. M.; SPENCE, J. R. How to make an intestine. **Development**, v. 141, n. 4, p. 752–760, 15 fev. 2014.

WIRTZ, S. et al. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nature Protocols 2007 2:3**, v. 2, n. 3, p. 541–546, 15 mar. 2007.

WOHLHUETER, R. M.; MCIVOR, R. S.; PLAGEMANN, P. G. W. Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. **Journal of cellular physiology**, v. 104, n. 3, p. 309–319, 1980.

WONG, D. V. T. et al. The Adaptor Protein Myd88 Is a Key Signaling Molecule in the Pathogenesis of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, 6 out. 2015.

YATSUNENKO, T. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 222–227, 14 jun. 2012.

YEUNG, C. Y. et al. Amelioration of Chemotherapy-Induced Intestinal Mucositis by Orally Administered Probiotics in a Mouse Model. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 25 set.

2015.

YUAN, K. T. et al. Bifidobacterium infantis has a beneficial effect on 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. <https://doi.org/10.3920/BM2013.0095>, v. 6, n. 1, p. 113–118, 6 nov. 2014.

ZHENG, H. et al. The protective effects of Aquilariae Lignum Resinatum extract on 5-Fuorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Phytomedicine**, v. 54, p. 308–317, 15 fev. 2019.