



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

Gabriele Moreira Guimarães

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO METABOLISMO DO TRIPTOFANO NO
EFEITO PROTETOR DA LINHAGEM *Weissella paramesenteroides* WpK4 SOBRE
O DESENVOLVIMENTO DA MUCOSITE INTESTINAL MURINA INDUZIDA
PELO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL (5-FU)**

Belo Horizonte
2023

Gabriele Moreira Guimarães

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO METABOLISMO DO TRIPTOFANO NO EFEITO PROTETOR DA LINHAGEM *Weissella paramesenteroides* WpK4 SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA MUCOSITE INTESTINAL MURINA INDUZIDA PELO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL (5-FU)

Versão final

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

Orientadora: Elisabeth Neumann
Co-orientador: Caio Tavares Fagundes

Belo Horizonte
2023

043

Guimarães, Gabriele Moreira.

Avaliação da influência do metabolismo do triptofano no efeito protetor da linhagem *Weissella paramesenteroides* WpK4 sobre o desenvolvimento da mucosite intestinal murina induzida pelo quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) [manuscrito] / Gabriele Moreira Guimarães. – 2023.

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

Orientadora: Elisabeth Neumann. Co-orientador: Caio Tavares Fagundes.

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

1. Microbiologia. 2. *Weissella*. 3. Probióticos. 4. Mucosite. 5. Fluoruracila. 6. Óperon. 7. Triptofano. 8. Receptores de Hidrocarboneto Arílico. I. Neumann, Elisabeth. II. Fagundes, Caio Tavares. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



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

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE GABRIELE MOREIRA GUIMARÃES

Nº REGISTRO: **2019704808**

Às 14:00 horas do dia **27 de março de 2023**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Mila Fernandes Moreira Madeira (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Sávio Henrique de Cicco Sandes (Universidade Estadual de Campinas), Leonardo Borges Acúrcio (Centro Universitário de Formiga), Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho (Universidade Federal da Bahia) e a Profa. Dra. Elisabeth Neumann (Orientadora), para julgar o trabalho final "**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO METABOLISMO DO TRIPTOFANO NO EFEITO PROTETOR DA LINHAGEM Weissella paramesenteroides WpK4 SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA MUCOSITE INTESTINAL MURINA INDUZIDA PELO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL (5-FU)**" da aluna **Gabriele Moreira Guimarães**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Elisabeth Neumann, 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 considerado **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a 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 tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 27 de março de 2023

Membros da Banca:

Profa. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira

Prof. Dr. Sávio Henrique de Cicco Sandes

Prof. Dr. Leonardo Borges Acúrcio

Prof. Dr. Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho

De acordo:

Profa. Dra. Elisabeth Neumann
(Orientadora)

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



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho, Usuário Externo**, em 28/03/2023, às 13:25, 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 **Mila Fernandes Moreira Madeira, Professora do Magistério Superior**, em 28/03/2023, às 15:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 28/03/2023, às 16:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sávio Henrique de Cicco Sandes, Usuário Externo**, em 28/03/2023, às 17:30, 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 **Leonardo Borges Acurcio, Usuário Externo**, em 29/03/2023, às 11:16, 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 **Elisabeth Neumann, Professora do Magistério Superior**, em 30/03/2023, às 14:04, 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 2093354 e o código CRC 59C98A58.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela graça e misericórdia, por ter me proporcionado a vida e a sabedoria, aliviando a ansiedade e sempre me conduzindo, permitindo a realização deste trabalho. Pelos profissionais da saúde (Aline e Guilherme) que foram colocados no meu caminho. Por tudo que fez, e por tudo que ainda vai fazer, obrigada Senhor.

Aos meus pais Ângelo e Sirlene pelo amor, dedicação e compreensão pelos fins de semanas e feriados ausentes. Obrigada por incentivarem meus estudos e meu vício em livros desde criança. Amo vocês incondicionalmente. Em memória ao meu padrasto, que esteve presente nesses últimos dez anos e se foi em 2022, obrigada por confiar em mim e aceitar com carinho meus alertas sobre os cuidados na pandemia.

Aos meus irmãos e respectivos cônjuges Angélica, Douglas, Thunay, Maria Paula, Tarik e Juliana. As minhas sobrinhas Maria Clara, Maria Cecília e Maria Luiza. Apesar da distância, vocês se fizeram presentes, amo vocês.

Ao meu marido Romain Cailleau, pelo amor, paciência, companheirismo, empatia e tranquilidade. Você sabe o quanto é importante para mim. Obrigada por tudo Papinho. Aos nossos filhos de quatro patas, Ed e Ella. Obrigada pelos miaus, cabeçadas e *lambeijos*.

Aos meus amigos, que sempre se fizeram presentes, em especial à Karen Costa, Mariana Silva, Gustavo José, César Moura, Livia Mara, Daiane Cerqueira, Raphaella, Cássio Siqueira, Jardel e Wellison. Muito obrigada por sempre estarem ao meu lado, pelos momentos especiais e inesquecíveis que me proporcionaram. A Karen, Gustavo e Livia que foram os únicos contatos durante a pandemia, vocês foram minha família e essenciais para minha saúde mental.

A todos os amigos do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (LEFM) e Laboratório de micologia, em especial a Karen, César, Sarah, Mariana (IC) e Rafaela pela

dedicação e disposição em ajudar. Esta conquista também é de vocês! Aos demais colegas, foi muito bom trabalhar com vocês.

À professora e orientadora Elisabeth e coorientador Caio Tavares Fagundes por essa oportunidade, confiança e paciência durante a realização deste trabalho. Por todos os ensinamentos prestados e oportunidades, sempre me fazendo acreditar que eu seria capaz. Vocês foram fundamentais para minha formação.

Aos demais professores do laboratório Jacques Robert Nicoli, Sílvia Beleza de Moura, Flaviano dos Santos Martins por terem cedido gentilmente o espaço, os equipamentos para realização deste trabalho. Muito obrigada por toda ajuda!

Agradeço também aos professores colaboradores Álvaro Cantini Nunes, Marcelo Vidigal Caliari e ao técnico Jamil Silvano de Oliveira pela disponibilidade e auxílio nos ensaios realizados no presente estudo.

Aos professores Mila Fernandes Moreira Madeira, Sávio Henrique de Sicco Sandes, Leonardo Borges Acurcio e Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho pela participação e contribuição como membros da banca avaliadora deste trabalho.

Às agências de fomento CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

Ele fortalece o cansado e dá grande vigor ao que está sem forças. Até os jovens se cansam e ficam exaustos, e os moços tropeçam e caem; mas aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças. **(Isaías 40.29-31)**

RESUMO

Os microrganismos presentes na microbiota vêm se mostrando cada vez mais importantes para a saúde geral do hospedeiro. Sabe-se que o estado de eubiose é a condição na qual o hospedeiro está saudável e sua microbiota está em equilíbrio. Em contrapartida, a disbiose ocorre quando o equilíbrio na relação entre a microbiota e o hospedeiro é perdido, acarretando possíveis danos para o hospedeiro. O estado de disbiose pode induzir diferentes situações patológicas. A mucosite intestinal causada por quimioterápicos é um exemplo de quadro inflamatório em que a disbiose pode ser considerada um marcador importante. Há evidências científicas robustas de que probióticos, microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, oferecem benefícios à saúde do hospedeiro, podem ser eficazes no controle de disbiose. Nesse contexto, a linhagem *Weissella paramesenteroides* WpK4, isolada da nasofaringe de suínos recém-desmamados, vem se mostrando um excelente candidato probiótico, demonstrando efeito benéfico em diferentes modelos experimentais de infecção e inflamação. Essa linhagem bacteriana possui o *operon* triptofano em seu genoma e sabe-se que o triptofano é responsável por sinalizações celulares importantes para o hospedeiro. Portanto, nosso objetivo é investigar se o metabolismo do triptofano influencia na proteção observada no modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU. De fato, *W. paramesenteroides* WpK4 possui sequências codificadoras de enzimas para produção do triptofano e seu catabolismo. Uma averiguação mais detalhada do perfil metabólico mostrou a produção de triptofano (TRP), triptamina (TAM), ácido indol acético (AIA) e ácido indol aldeído (IAld) pela linhagem estudada. Em modelo murino de indução de mucosite por 5-FU, a administração oral de *W. paramesenteroides* WpK4 resultou em 100% de sobrevivência, diferentemente do grupo controle (administração de solução salina 0,9%) que resultou em 60% de sobrevivência. Uma averiguação mais detalhada dos parâmetros avaliados dos animais submetidos ao modelo de mucosite por 5-FU, demonstrou que a linhagem *W. paramesenteroides* WpK4 protegeu os animais da morbidade e das alterações de microbiota induzidas pela quimioterapia, além de induzir expressão aumentada de moléculas envolvidas no metabolismo do TRP no hospedeiro, pressupondo a ativação da via AhR pela linhagem estudada.

PALAVRAS-CHAVES: *Weissella paramesenteroides* WpK4; probióticos, mucosite intestinal, 5-fluorouracil, *operon* triptofano, AhR.

ABSTRACT

The microorganisms present in the microbiota are proving to be increasingly important for the general health of the host. It is known that the state of eubiosis is the condition in which the host is healthy, and its microbiota is in balance. On the other hand, dysbiosis occurs when the balance of the relation between the microbiota and the host is lost, resulting in possible damage to the host. The state of dysbiosis can induce different pathological situations. Intestinal mucositis caused by chemotherapy is an example of an inflammatory condition in which dysbiosis can be considered an important marker. There is robust scientific evidence that probiotics, live microorganisms that, when administered in adequate amounts, offer health benefits to the host, can be effective in controlling dysbiosis. In this context, the strain *Weissella paramesenteroides* WpK4, isolated from the nasopharynx of weaning pigs, has proven to be an excellent probiotic candidate, demonstrating beneficial effects in different experimental models of infection and inflammation. This bacterial strain has the tryptophan *operon* in its genome, and it is known that tryptophan is responsible for important cell signals for the host. Therefore, our objective to investigate whether tryptophan metabolism influences protection in a murine model of 5-FU-induced intestinal mucositis. In this case, *W. paramesenteroides* WpK4 has enzyme-coding sequences for tryptophan production and its catabolism, and a more detailed investigation of the metabolic profile showed the production of tryptophan (TRP), tryptamine (TAM), indole acetic acid (IAA) and indole aldehyde acid (IAld) by the strain studied. In a murine model of mucositis induction by 5-FU, oral administration of *W. paramesenteroides* WpK4 resulted in 100% survival, unlike the control group (administration of 0.85% saline solution), which resulted in 60% survival. A more detailed investigation of the evaluated parameters of the animals submitted to the mucositis model by 5-FU demonstrated that the *W. paramesenteroides* WpK4 strain protected the animals from morbidity and microbial shifts induced by chemotherapy, and improved host expression of molecules involved in the TRP metabolism, suggesting the activation of the AhR pathway by the studied strain.

KEYWORDS: *Weissella paramesenteroides* WpK4; probiotics, intestinal mucositis, 5-fluorouracil, *operon* tryptophan, AhR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - O operon TRP. Retirado do livro Princípios de Bioquímica de Lehninger - 8.ed., 2022.....	34
Figura 2 - Metabolismo de TRP pelas vias (1) Indol/AhR, (2) Quinurenina/IDO e (3) Serotonina/5-HTP. Adaptado de AGUS et al., 2018.....	35
Figura 3 - Metabolismo de TRP sob o controle da microbiota intestinal. O TRP proveniente da dieta pode ser convertido em ligantes de receptor AhR pela microbiota intestinal. As vias de sinalização possíveis são: a) Ativação do Receptor AhR, no qual auxilia na homeostase imunológica e fisiologia da barreira intestinal; b) IDO1, na qual o TRP é convertido em QUI, essa via está envolvida em vias inflamatórias, resposta imune e funções neurobiológica; c) 5-HTP, na qual o TRP é convertido em serotonina, responsável pela estimulação da motilidade intestinal. Adaptado de AGUS et al., 2018	39
Figura 4 - Desenho experimental do ensaio de sobrevivência dos animais após indução da mucosite por 75 mg/kg/d de 5-FU.....	48
Figura 5 - Desenho experimental do ensaio de avaliação de parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos após indução da mucosite por 75 mg/kg/d de 5-FU.....	49
Figura 6 - Possíveis vias do catabolismo do TRP em <i>W. paramesenteroides</i> WpK4, de acordo com a presença ou ausência da sequência de aminoácidos para cada enzima. *Significa metabólitos capazes de se ligar ao receptor AhR.....	59
Figura 7 - Dosagem de metabólitos no sobrenadante de WpK4 por HPLC-UV: triptofano (A), ácido indol-3-acético (B) triptamina (C), ácido indol-3-aldeído (D) e curva de crescimento da bactéria (E). Os resultados de concentração foram expressos em média \pm desvio padrão (uM). Em (A), valores estatisticamente diferentes estão representados pelos símbolos: *p = 0,0095 quando comparados ao tempo 0h na mesma condição e #p = 0,0263 comparado ao tempo 48h em meio MRS. Em (B) houve diferença significativa (&p = 0,0279; **p = 0,0088; #p = 0,0123) quando comparado ao tempo 0h de incubação na mesma condição. Em (C) O símbolo ** significa diferença estatisticamente significativa quando foi comparado ao tempo 0h de incubação em meio suplementado com TRP (p = 0,0073). (E) Os resultados de crescimento microbiano foram apresentados como Log UFC/mL, na qual a análise da área sob a curva foi realizada, e a diferença significativa entre os dois meios de culturas testados foi expressa pelo símbolo *p = 0,0209.....	62

Figura 8 - Curva percentual de sobrevivência de camundongos com (A) quatro e (B) oito semanas, tratados ou não com *W. paramesenteroides* WpK4, após indução de mucosite intestinal com 75 mg/kg/3dias de 5-FU. Sal = Controle com administração prévia de salina 0,9%. PT Wp= administração prévia de WpK4 (início 10 dias antes da primeira dose de 5-FU). CC Wp= administração concomitante de WpK4 (início no dia da primeira dose de 5-FU). * Diferença estatisticamente significativa entre o percentual de sobrevivência do grupo controle (salina 0,9%) e o grupo tratado previamente com WpK4 ($p = 0.0161$) ($n = 11$). 64

Figura 9 - Avaliação do escore clínico de animais com (A) quatro e (B) oito semanas, tratados ou não *W. paramesenteroides* WpK4, após indução de mucosite intestinal com 75 mg/kg/3dias de 5-FU. Sal = controle com administração prévia de salina 0,9%. PT Wp = administração prévia de WpK4 (início 10 dias antes da primeira dose de 5-FU). Sal = administração concomitante de WpK4 (início no dia da primeira dose de 5-FU). Os animais ($n = 6$ /grupo) foram avaliados quanto ao escore clínico da doença nos tempos 0, 5 e 10 dias após o início da administração de 5-FU (75 mg/kg/3dias; i.p). Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão..... 65

Figura 10 - Avaliação do desenvolvimento ponderal ($n = 11$ /grupo) em animais com (A) quatro e (B) oito semanas tratados ou não com *W. paramesenteroides* WpK4, após indução de mucosite intestinal com 75 mg/kg/3dias de 5-FU. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. (A) A média geral dos pesos dos grupos pré tratados (PT Wp) e tratamento concomitante (CC Wp) com *W. paramesenteroides* WpK4 foram estatisticamente iguais quando comparados ao grupo controle (Sal) administrado apenas com salina 0,9%. (B) A média geral dos pesos entre os grupos pré tratados com *W. paramesenteroides* WpK4 foram estatisticamente iguais quando comparados ao grupo controle (Sal) administrado apenas com salina 0,9%. Setas vermelhas indicam a queda de peso após desafio com 5-FU. 66

Figura 11 - Avaliação do escore clínico da mucosite intestinal em animais tratados ou não com *W. paramesenteroides* WpK4 e eutanasiados com cinco dias ou oito dias após o início administração de 75 mg/kg/dia de 5-FU. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. ($n= 4-6$ /grupo). 67

Figura 12 - Avaliação do desenvolvimento ponderal em animais tratados ou não com W. paramesenteroides WpK4 e eutanasiados no (A) quinto e (B) oitavo dia após início da administração de 75 mg/kg/dia de 5-FU. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. Os símbolos representados por # ($p < 0,0001$) ou * ($p = 0,0019$) representam diferenças significativas entre o peso do 14° dia com o do 1° dia para o mesmo grupo. \$ ($p < 0,0001$) representa diferença estatisticamente significativa entre o peso do 14° dia com o do 10° dia para o mesmo grupo em ($n = 4-5$)..... 68

Figura 13 - Avaliação do comprimento intestinal em animais tratados ou não com W. paramesenteroides WpK4 e eutanasiados no (A) quinto e (B) oitavo dia após início da administração de 75 mg/kg/dia de 5-FU. * significa diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0174$). ($n = 9-10$ /grupo). 69

Figura 14 – (A) Histopatologia do íleo de camundongos C57/BL4J dos grupos Sal5d, Wp5d, Salmuc5d, Salmuc8d, Wpmuc5d e Wpmuc8d: Sal5d íleo com aspecto histológico normal. **Wp5d:** notar o aumento das áreas PAS⁺ (cabeças de setas). **Salmuc5d:** vilosidades encurtadas (setas), hiperplasia de criptas (*) e redução de áreas PAS⁺ (cabeças de seta). **Wpmuc5d:** aumento das áreas PAS⁺ (cabeças de setas) e vilosidades encurtadas (setas). **Salmuc8d:** parede intestinal de aspecto histológico normal, demonstrando a regeneração das vilosidades (setas), hiperplasia de criptas (*) e áreas PAS⁺ normais (cabeças de seta). **Wpmuc8d:** hiperplasia de criptas (*), vilosidades regeneradas (setas) e aumento das áreas PAS⁺ (cabeças de setas). Ácido periódico de Schiff (PAS). Barra = 50 μ m; **(B) Área de muco PAS⁺ na mucosa do íleo de camundongos C57/BL4J dos grupos Sal5d, Salmuc5d, Salmuc8d, Wp5d, Wpmuc5d e Wpmuc8d.** Sal5d vs. WP5d: *** $P=0,0003$; Sal5d vs. WPmuc5d: *** $P=0,0008$; Salmuc5d vs. WPmuc5d: * $P=0,0317$. Sal8d vs. WP8d: **** $P<0,0001$; Sal8d vs. WPmuc8d: *** $P=0,0003$; Salmuc8d vs. WP8d: * $P=0,0008$; Salmuc5d vs. WPmuc8d: * $P=0,0004$. **(C) Altura de vilosidade da mucosa do íleo de camundongos C57/BL4J dos grupos Sal5d, Salmuc5d, Salmuc8d, Wp5d, Wpmuc5d e Wpmuc8d.** Sal5d vs. WP5d: * $P=0,0226$; Wp5d vs. WPmuc5d: * $P=0,0231$; Sal8d vs. WPmuc8d: ** $P=0,0024$. **(D) Altura de cripta da mucosa do íleo de camundongos C57/BL4J dos grupos Sal5d, Salmuc5d, Salmuc8d, Wp5d, Wpmuc5d e Wpmuc8d.** Sal5d vs. Salmuc5d: *** $P=0,0002$; Sal5d vs. WPmuc5d: ** $P=0,0022$; Sal8d vs. WPmuc8d: * $P=0,0156$. **(E) Relação entre criptas e vilosidades intestinais em camundongos**

C57/BL4J dos grupos Sal5d, Salmuc5d, Salmuc8d, Wp5d, Wpmuc5d e Wpmuc8d. Sal5d vs. Salmuc5d: ****P=0,0001; Sal5d vs. Wpmuc5d: ***P=0,0001; Wp5d vs. Wpmuc5d: ***P=0,0004; Salmuc5d vs. Wp5d: ***P=0,0002. 72

Figura 15 - (A) Histopatologia do íleo de camundongos C57/BL4J dos grupos Sal5d, Wp5d, Salmuc5d, Wpmuc5d: Sal5d íleo com aspecto histológico normal. **Wp5d** íleo com aspecto histológico normal. **Salmuc5d:** íleo com áreas de edema e infiltrados inflamatório discreto. **Wpmuc5d:** íleo com áreas de edema e infiltrados inflamatório discreto. Asteriscos vermelhos indicam área de edema; setas pretas apontam células inflamatórias. (H&E). Barra = 50 µm; **(B) Escore da lesão histológica do íleo de camundongos C57/BL4J dos grupos Sal5d, Wp5d, Salmuc5d e Wpmuc5d.** ****P<0,001. **(C) Escore do infiltrado inflamatório do íleo de camundongos C57/BL4J dos grupos Sal5d, Wp5d, Salmuc5d e Wpmuc5d.** ****P<0,001; ***P=0,005; *P=0,05..... 73

Figura 16 - Contagem total de leucócitos no sangue de animais com e sem mucosite, tratados com salina ou WpK4. (A) Animais eutanasiados no quinto ou (B) oitavo dia após início da administração de 75 mg/kg/dia de 5-FU. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão (n = 10-11/grupo). # significa diferença estatisticamente significativa dos valores de leucócitos x 10⁴/mL de sangue entre o grupo com e sem mucosite, tratado com salina (p = 0,0011), * significa diferença estatisticamente significativa dos valores de leucócitos x 10⁴/mL de sangue entre o grupo com e sem mucosite, tratado com WpK4 (p= 0,0015). 74

Figura 17 - Atividade das enzimas mieloperoxidase (A) e peroxidase eosinofílica (B) a partir de fragmentos de íleo. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão (n = 10-11/grupo). U.A: unidades arbitrárias. * Significa diferença estatisticamente significativa dos valores de atividade enzimática entre os grupos tratados com salina, sem e com mucosite (p = 0,0028), # Significa diferença estatisticamente significativa dos valores de atividade enzimática entre os grupos tratados com WpK4, sem e com mucosite (p = 0,0017). 75

Figura 18 - Expressão relativas do gene tnf (A, B) no íleo de animais eutanasiados no 5° dia (A) e no 8° dia após indução de mucosite intestinal por 5-FU (B). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão, n= (6/por grupos)..... 76

Figura 19 - Avaliação da população de bactérias do ácido láctico (A, C) e enterobactérias (B, D) nas fezes (A, B) e conteúdo intestinal (C, D) no quinto dia após indução da

mucosite. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$) significam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo tratado com salina 0,9% sem mucosite intestinal. (n=4-5/grupo)..... 77

Figura 20 - Expressão relativa da população de enterobacteriales (A, B) e E. coli (C, D) no conteúdo intestinal de camundongos eutanasiados no quinto (A, C) ou oitavo dia após indução da mucosite (B, D). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, n= (4-6) por grupo. * (P= 0,0493); # (P=0,0227); ** (P=0,0028); & (P=0,0130); significam diferença estatisticamente significativa quando comparado entre os grupos com e sem mucosite intestinal. (n=3-6/grupo)..... 79

Figura 21 - Expressão relativa dos genes relacionados ao metabolismo do TRP em camundongos Cyp1a1 (A, B); Ido1 (C, D); Ahr (E, F) e Tph1 (G, H) no íleo de animais eutanasiados no 5° dia (A, C, E, G) e no 8° dia após indução de mucosite intestinal por 5-FU (B, D, F, H). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, n= (6/ grupo). 81

Figura 22 - Resumo das possíveis vias do catabolismo do TRP..... 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Enzimas envolvidas no anabolismo e catabolismo do TRP e suas funções.	45
Tabela 2 - Esquema de tratamentos por grupo do ensaio de sobrevivência dos camundongos após indução da mucosite por 75 mg/kg/d de 5-FU.	48
Tabela 3 - Esquema de tratamentos por grupo do ensaio de avaliação de possíveis mecanismos de ação da linhagem <i>Weissella paramesenteroides</i> após indução da mucosite por 75 mg/kg/d de 5-FU.	49
Tabela 4 - Painel de primers para genes específicos para detecção de bactérias.	53
Tabela 5 - Painel de primers para genes codificadores de citocinas e gene constitutivo....	55
Tabela 6 - Painel de <i>primers</i> para genes codificadores de moléculas relacionadas ao metabolismo de triptofano.....	55
Tabela 7 - Sequências gênicas codificadoras de proteínas envolvidas na síntese do TRP presentes no genoma de <i>W. paramesenteroides</i> WpK4.	57
Tabela 8 - Sequências gênicas codificadoras de proteínas envolvidas no catabolismo do triptofano contidas no genoma de <i>W. paramesenteroides</i> WpK4.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

(p/v) – peso por volume

(v/v) – volume por volume

°C – Graus Celsius

3-HAA – Ácido-3-hidroxiantranílico

5-FU – Quimioterápico 5-fluorouracil

5-HT – 5-hidroxitriptamina

5-HTP - 5-Hidroxitriptofano

Aa – Aminoácido

AAD - Aminoácido aromático descarboxilase

AAO - L-aminoácidos-2-monooxigenases

Actb - Beta-actina

AGCCs - Ácidos graxos de cadeia curta

AhR ou RHA – Receptor de aril hidrocarboneto

AIA/IAA - Ácido indol-3-acético

ALD - Aldeído desidrogenase

AMPS - Peptídeos antimicrobianos

Ant. – Anteriormente

ANXA - Anexina A1/Lipocortina I

APCs - Células apresentadoras de antígeno

APRIL - Ligante indutor de proliferação

ARAT - Aminotransferase amino ácido aromático

ARNT - translocador nuclear do AhR

BAFF - Fator de ativação de células B

BAL – Bactérias ácido-lático ou bactéria produtoras de ácido lático.

BFS/SBF – Bactérias filamentosas segmentadas

BHI - Infusão de cérebro e coração - Meio BHI

CA - Ácido cinabarínico

CC - Concomitante

CD/DC – Células dendríticas

cDNA - DNA complementar

CEUA/UFMG – Comissão de ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais

cm - Centímetros

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX -1 e 2 – Ciclo-oxigenase-1 e 2

CV – Convencionais

CXCL-8 - C-X-C - Motif chemokine ligand 8, também conhecida como Interleucina-8

DEPC – Dicarbonato de dietila

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNase – Enzima envolvida na clivagem do DNA

DO/OD – Densidade ótica

DRC - Doença renal crônica

DSS – Dextran sulfato de sódio

dTMP - Monofosfato de desoxitimidina

dUMP - Monofosfato de desoxiuridina

dUTP - Trifosfato de desoxiuridina

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPO - Peroxidase eosinofílica

EPS – Exopolissacarídeos

EROS/ROS – Espécies reativas de oxigênio

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FdUDP - Difosfato de fluorodesoxiuridina

FdUMP - Monofosfato de fluorodesoxiuridina

FdUTP - Trifosfato de fluorodesoxiuridina

FICZ – 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole

FIDH - Fenilactato desidrogenase

FLDH - Fenilactato desidrogenase

FUMP - 5-fluorouridina monofosfato

FUTP - Trifosfato de fluorodesoxiuridina

g – Gramas

GF – *Germ free*

H&E – Hematoxilina e eosina
HPLC – Cromatografia líquida alta eficiência
HTAB – Brometo hexadeciltrimetilamônio
I.P. - Via de administração intraperitoneal
IAAH - Indol-3-acetamida hidrolase
IAAId – Ácido indol-3-acetaldeído
IAcra – Ácido indoleacrílico
IAld – Indol-3-aldeído
IAM – Indole-3-Acetamida
IAN - indol-3-acetonitrila
ICB – Instituto de ciências biológicas
IDO – Indoleamina 2,3-Dioxygenase
IFN – γ – Interferon gama
IG - Animais isentos de germes
IgG/IgA/IgE – Imunoglobulina G/A/E
I κ B - I κ B kinase
IL-1b, 6, 18, 22 ou 23 - Interleucinas 1b, 6, 18, 22 ou 23
ILA – Ácido-3- Indol Lático
ILCs – Células linfoides inatas
INCA – Instituto nacional do câncer
iNKT – Células T matadoras naturais invariáveis
IPA – Ácido indol-3-propiónico
IPDC - Indol piruvato descarboxilase
IPYA – Indole-3-piruvato
IS – Indoxil Sulfato
ISAPP - Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos
KNA – Ácido quinurênico
KP – Via da quinurenina
L – Litros
LEFM – Laboratório de ecologia de fisiologia de microrganismo
LGMPP – Laboratório de genética de microrganismos e protozoários e parasitas

LPS - Lipopolissacarídeo
M – Molar (mol/L)
MAMPS - Padrões moleculares associados a micro-organismos
MAO - Monoamina oxidase
mg – Miligramas
MK – Meio de cultura MacConkey
ml – Mililitros
MPO - Mieloperoxidase
MRS – Meio de cultura MAN, ROGOSA e SHARPE
MTOX - N-metiltryptofano oxidase
Myd88 – Proteína sinalizadora dos TLRs
NAD - Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF-κB - Factor nuclear kappa B
ng - nanogramas
nm – Nanometro
nM - nanomolar
NOD – Receptores do tipo NOD
NOS2 - Óxido Nítrico Sintase 2
OMS - Organização Mundial da Saúde
PAS - Ácido Periódico de Schiff ou Receptores da Superfamília Per-Arnt-Sim
PBS – *Phosphate buffered saline*
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PLP - piridoxal-5-fosfato
PORB, C - Piruvato ferroxidina oxireductase B e C
PRD - Proteína contendo o domínio PRD
PT - Pré-tratamento
PXR - Receptor do pregnano X
QA – Ácido quinolínico
qPCR – Reação em cadeia de polimerase quantitativa
Rag 2 -/- - Proteína ativadora de recombinação do gene 2
RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – RNA mensageiro

RNR - Ribonucleotídeo redutase

RPM – rotação por minutos

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SI - Sistema imune

SPF - Camundongos livres de patógenos específicos

TAM - Triptamina

TCDD - 3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

TDO – Triptofano-2,3-dioxigenase

TE – Tampão contendo por Tris-HCl e EDTA

TGF- β - Fator de crescimento transformante beta

TGI – Trato gastrointestinal

TH - Resposta imune mediada por células auxiliares

TH17 - Resposta imune mediada por células auxiliares tipo 17

TLRs – Receptores toll like

TMB – Tetrametilbenzidina

TMO - Triptofano 2 monoxigenase

TNAA - Triptofanase

TNF – Fator de necrose tumoral

TPH1 – *Tryptophan hydroxylase 1*

TRAP - Proteína de atenuação ligada ao RNA do operón TRP

TREG - Células imunes do tipo T regulatórias

Tris-HCl - Trisaminometano

TRP – Triptofano

TS - Timidilato Sintase

TSO - Oxidase da cadeia lateral do triptofano

U.A - Unidades arbitrárias

UFC – Unidade formadora de colônias

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UGD - Uracila-DNA-glicosilas

UTP/dTTP - Uridina-5'-trifosfato/2'-desoxitimidina-5'-trifosfato

UV – Ultravioleta

V – Volts

WpK4 – Linhagem da *Weissella paramesenteroides* WpK4

XA – Ácido xanturênico

µg – Micrograma

µL – Microlitros

µm – Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Mucosite intestinal	16
1.2 Microbiota intestinal e o sistema imune.....	20
1.3 Probióticos e <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4	27
1.4 Metabolismo do TRP e Receptor de Hidrocarboneto Arílico (RHA ou AhR).....	32
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Linhagem bacteriana – origem, manutenção e cultivo.....	43
4.2 Animais.....	43
4.3 Avaliação do genoma da linhagem <i>W. paramesenteroides</i> WpK4: busca pelos genes de biossíntese e catabolismo do triptofano.....	44
4.4 Avaliação da produção de TRP e seus metabólitos por <i>W. paramesenteroides</i> WpK4	45
4.5 Modelo murino de mucosite intestinal por 5-FU	46
4.6 Administração de <i>W. paramesenteroides</i> WpK4	47
4.7 Avaliação da sobrevivência dos animais após indução da mucosite	47
4.5 Avaliação de parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos após indução da mucosite.....	48
4.6 Análise estatística.....	55
5. RESULTADOS	57
6. DISCUSSÃO.....	82
7. CONCLUSÃO.....	102
REFERÊNCIAS.....	103
ANEXOS.....	122
CRONOGRAMA.....	127

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mucosite intestinal

Segundo o Instituto nacional do câncer (INCA), câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que podem invadir tecidos e órgãos. A estimativa de novos casos no Brasil para o triênio (2023-2025) são de 704 mil casos de câncer a cada ano (<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025> Acesso 06/02/2023 às 11:13h).

O tratamento do câncer pode ser realizado por cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade. A quimioterapia é um dos principais tratamentos oferecido a pacientes com câncer e utiliza drogas citotóxicas, imunossupressoras ou hormonais. A eficácia desse tratamento é comprovada e, a cada dia, novas substâncias, protocolos e associações de fármacos são desenvolvidos (DAVILA; BRESALIER, 2008; FERLAY; COLOMBET, 2012). Essas drogas, no entanto, vêm demonstrando diversos efeitos colaterais. A mucosite é um efeito colateral da quimioterapia citotóxica e da radioterapia, na qual é observada uma inflamação e ulceração de mucosas, resultando em sintomas como dor, inflamação, inchaço, náusea, vômito e diarreia. As mucosas, devido à alta taxa de proliferação, assim como as células cancerígenas, acabam sendo alvos desses agentes quimioterápicos (ONG *et al.*, 2010; revisto por DAHLGREN *et al.*, 2021). A mucosite gastrointestinal induzida por quimioterapia pode ocorrer em cerca de 40 - 100% dos pacientes em tratamento para câncer e tem implicações significativas na qualidade de vida destes (HUANG *et al.*, 2019). Esse dado depende da dose e regime de administração da droga (SONIS *et al.*, 2015; DAHLGREN *et al.*, 2021).

A mucosite intestinal ocorre em 5 fases, sendo elas: (1) iniciação; (2) regulação positiva e geração de mensagens; (3) sinalização e amplificação; (4) ulceração e inflamação; e (5) fase de cicatrização (SONIS *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2014). A primeira fase ocorre quando a mucosa do trato gastrointestinal (TGI) é exposta ao agente citotóxico, resultando em danos ao material genético e morte celular por espécies reativas de oxigênio (EROs).

Uma cascata de vias inflamatórias é desencadeada pelas EROs. A regulação positiva dos mediadores inflamatórios observados na segunda fase ocorre pela capacidade de fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) em induzir a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), que vão contribuir para o dano tecidual e apoptose. O NF- κ B representa uma família de fatores de transcrição induzíveis, que regulam uma grande variedade de genes envolvidos em diferentes processos das respostas imune e inflamatória, como o processo de angiogênese, aumentando assim a expressão de moléculas de adesão e da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009). Sabe-se que, na mucosa intestinal, o NF- κ B pode proteger as células epiteliais, mantendo a integridade epitelial e a homeostase imune intestinal (ZAPH *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2017; SOUGIANNIS *et al.*, 2021). A terceira fase é marcada por diversas alças de amplificação do processo inflamatório, prologando as lesões teciduais principalmente na submucosa e epitélio. A integridade da barreira permanece sem alterações por mais que o dano tecidual ocorra. Durante a quarta fase da mucosite, a integridade da barreira começa a ser prejudicada devido às ulcerações, alterações atróficas da mucosa, morte de células-tronco e perda da função das células epiteliais. A colonização bacteriana nas úlceras da mucosa induz um aumento da inflamação, estimulando a ativação e infiltração de macrófagos. Duas semanas após o término da quimioterapia, a quinta fase, por fim, inicia-se e é marcada pela renovação epitelial, diferenciação da mucosa e pela angiogênese (CHEN *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2014; ONG *et al.*, 2010; DAHLGREN *et al.*, 2021).

Os agentes citotóxicos mais utilizados na prática e que estão associados à mucosite são 5-Fluorouracil (5-FU), capecitabina e irinotecano (HUANG *et al.*, 2019). O 5-FU é um dos medicamentos usados para tratar o câncer de cólon e carcinomas da parte superior do corpo, como cabeça e pescoço e câncer de mama, desde a década de 1960 (TUNG *et al.*, 2011). Pertencente à família dos agentes anti-metabólicos, o 5-FU é um análogo de pirimidina (uracil) com um átomo de flúor na posição C-5 no lugar de hidrogênio. Distribuído comercialmente com os nomes Adrucil®, Efurix®, Fauldfluor®, Neugrast® e outros (SPENCER, 2016). O 5-FU utiliza o mesmo mecanismo de transporte facilitado do uracil para adentrar a célula, e é convertido em 5-fluorouridina monofosfato (FUMP). O FUMP é então fosforilado em difosfato de fluorouridina (FUDP), que é convertido no metabólito ativo trifosfato de fluorodesoxiuridina (FUTP) ou difosfato de fluorodesoxiuridina (FdUDP)

pela ribonucleotídeo redutase (RNR). Esses metabólitos ativos provenientes de 5-FU, são responsáveis pela incorporação errônea no RNA/DNA no lugar da uridina -5'-trifosfato/2'-desoxitimidina-5'-trifosfato (UTP/dTTP). Por outro lado, o 5-FU pode ser convertido em monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), que ao se acoplar ao sítio de ligação da enzima timidilato sintase (TS), forma um complexo ternário estável com a enzima, bloqueando assim a ligação do substrato dUMP. Envolvida indiretamente na replicação e reparo do DNA, a enzima TS catalisa a metilação redutiva de monofosfato de desoxiuridina (dUMP) em monofosfato de desoxitimidina (dTMP). Sendo assim, o metabólito FdUMP proveniente de 5-FU, inibe a síntese de dTMP ao se ligar ao sítio de ligação da enzima TS, resultando no acúmulo de dUMP e privação de dTMP. Esse acúmulo, conseqüentemente leva ao aumento dos níveis de trifosfato de desoxiuridina (dUTP). Ambos (dUMP e FdUTP) podem ser incorporados erroneamente ao DNA. Para corrigir essa incorporação errônea de nucleotídeos, a maquinaria celular utiliza o mecanismo de reparo pela enzima de reparação por excisão de bases uracila-DNA-glicosilase (UDG). Essa tentativa de reparo juntamente com a os níveis alterados de outros desoxinucleotídeos e incorporação errônea, leva a quebras do DNA e morte celular (SONIS *et al.*, 2004; TUNG *et al.*, 2011; SETHY *et al.*, 2021). Segundo a revisão de Longley e colaboradores (2003) a incorporação incorreta de nucleotídeos impacta a síntese de RNA em vários níveis, desde o RNAm até ao nível pós-transcricional. Pela interrupção da montagem e atividade de complexos snRNA/proteína, inibindo o *splicing* de pré-mRNA. Esse mecanismo de ação do 5-FU é responsável pela melhora da sobrevida global e pela não progressão do câncer, no entanto, esse mesmo mecanismo também afeta a divisão de células saudáveis e causa uma variedade de efeitos colaterais, incluindo a mucosite, já discutida anteriormente (SONIS *et al.*, 2004; TUNG *et al.*, 2011; DAHLGREN *et al.*, 2021).

Os sintomas clínicos da mucosite por 5-FU são diarreia grave, náusea, vômitos, desnutrição, fadiga, desidratação, infecções e sepse, por causa da translocação bacteriana (CHEN *et al.*, 2008; SONIS *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2016). Foi observado também que esse fármaco induz mielossupressão (LEE *et al.*, 2014). Esses sintomas, além de serem um incômodo para o paciente, reduzindo sua qualidade de vida, podem atrapalhar a eficiência do tratamento, por ser um fator debilitante e indicador de que a dose do fármaco precisa passar por alterações, o que aumenta os custos do tratamento (Revisto por DAVILA *et al.*, 2008).

Segundo revisão de Ribeiro e colaboradores (2016), cerca de 32,2% dos pacientes necessitam de internação e os custos médios do tratamento desses efeitos colaterais, relacionados à quimioterapia, são altos.

A busca por tratamentos para a mucosite vêm chamando a atenção dos pesquisadores. Sabe-se que a microbiota intestinal desempenha um papel importante na atenuação ou amplificação da mucosite intestinal. Em camundongos tratados com o 5-FU, foi observado alteração da diversidade da comunidade microbiana intestinal, alterando a abundância relativa de Bacillota, Lactobacilli, *Enterococcus* e *Bacteroides*. Segundo Menezes-Garcia e colaboradores (2020), os agentes quimioterápicos exercem um efeito prejudicial sobre a composição da microbiota intestinal; essa disbiose pode promover o desenvolvimento e agravamento da mucosite intestinal e acarretar perdas na diversidade da comunidade microbiana. Neste estudo foi realizada uma comparação entre camundongos convencionais (CV) e animais isentos de germes (IG), em um modelo de mucosite induzida por 5-FU, no qual animais IG apresentaram altos níveis de corticosterona plasmática basal capaz de inibir a expressão de múltiplos genes inflamatórios e induzir a expressão de proteínas anti-inflamatórias, como ANXA1 e IL-10. Demonstraram, ainda, que a presença da microbiota está envolvida no desenvolvimento e gravidade da mucosite induzida por 5-FU, uma vez que os camundongos CV tratados com 5-FU apresentaram um aumento no conteúdo de *Escherichia coli* e outras Enterobacteriaceae no conteúdo intestinal, o que contribuiu para a exacerbação da lesão intestinal e inflamação durante a mucosite induzida. O aumento de Enterobacteriaceae diminuiu os níveis plasmáticos de corticosterona e modulou a resposta a estímulos inflamatórios (MENEZES-GARCIA *et al.*, 2020).

Pedroso e colaboradores (2014) ressaltaram também a relevância da microbiota na atenuação da mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico cloridrato de irinotecano CPT-11 e a influência da enzima β -glucuronidase produzidas pelas enterobactérias, que se encontram aumentadas na mucosite intestinal. Esta enzima catalisa a conversão do irinotecano não tóxico (glucuronidado) em irinotecano tóxico (desglucuronidado), aumentando assim o dano ao epitélio, o que é bem característico na mucosite intestinal. Para avaliar a influência dessa enzima no modelo de mucosite intestinal murina, os animais IG foram divididos em grupos monoassociados com *E. coli* produtora de β -glucuronidase (MN-TG1) ou *E. coli*, cujo gene codificador para β -glucuronidase foi deletado (MN-L91). Os

animais do grupo MN-TG1 apresentaram um aumento da permeabilidade intestinal quando comparados ao MN-L91. A dose letal de quimioterápico usada em animais IG foi três vezes maior do que a usada em camundongos CV. Ao comparar os animais CV com os IG foi observado um aumento significativo no recrutamento de eosinófilos e neutrófilos, níveis mais elevados de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β e TNF) e anticorpos (IgA no intestino e no soro). A convencionalização de animais IG reverteu o fenótipo encontrado, evidenciando assim o papel importante da microbiota intestinal para o desenvolvimento da mucosite intestinal (PEDROSO *et al.*, 2014).

1.2 Microbiota intestinal e o sistema imune

A microbiota intestinal é a soma dos microrganismos presentes no ambiente intestinal, responsáveis por desempenhar papéis fisiológicos fundamentais para o hospedeiro (WASTYK *et al.*, 2021). O trato gastrointestinal é o sítio anatômico que possui maior número de microrganismos, por esse motivo é chamado de “órgão microbiano”. Acreditava-se que o nascimento era o marco inicial da colonização (revisto por TILG *et al.*, 2017), no entanto, há relatos que a microbiota de recém-nascidos pode ser influenciada pela microbiota da mãe antes mesmo da ruptura das membranas amnióticas (WASSENAAR; PANIGRAHI, 2014; BITTINGER *et al.*, 2020). Revisores apontaram a presença de DNA microbiano na placenta, líquido amniótico e mecônio. Na qual a aparição desses microrganismos ao ambiente intrauterino, podem ser explicados pela ascensão de bactérias pela vagina, ou pela disseminação hematogênica a partir da cavidade oral ou do intestino. Além disso, o sistema imune (mais especificamente células dendríticas ou tecido linfoide) pode contribuir ao translocar bactérias ou material genético de bactérias para a placenta (WITKIN, 2015; FARDINI *et al.*, 2010; revisto por SPROCKETT *et al.*, 2018; KENNEDY *et al.*, 2021). Após o nascimento, o neonato é exposto a inúmeros microrganismos que serão responsáveis pela colonização do TGI, sendo a exposição aos inúmeros microrganismos da microbiota da mãe e/ou do ambiente, tipo de parto e alimentação pós-natal os principais norteadores desse processo (revisto por TILG *et al.*, 2017).

Inicialmente, a microbiota é transferida de mãe para filho e sua composição relativa varia entre indivíduos e dentro do mesmo indivíduo ao longo de sua vida, sendo afetada por fatores genéticos e externos como dieta, exposição ao ambiente, idade, higiene, infecções, uso de drogas e antimicrobianos (revisto por TILG *et al.*, 2017). Durante o parto natural, a criança tem contato primeiramente com a microbiota vaginal e fecal da mãe, enquanto no parto cesárea esse contato ocorre primeiro com a microbiota da pele (BOKULICH *et al.*, 2016). O leite materno contribui para a formação da comunidade microbiana devido à presença de oligossacarídeos (fator bífido) e anticorpos (IgA) que vão selecionar certos microrganismos (em bebês amamentados, a microbiota é largamente dominada por *Bifidobacterium* e Enterobacteriaceae como segundo grupo dominante). A microbiota de membros da família, equipe médica, parteiras e outros cuidadores podem contribuir na colonização intestinal. Além disso, os comportamentos associados ao cuidado infantil como estruturas sociais, dietas, práticas médicas, viagens, padrões de migração, urbanização e ambientes habitacionais expõe o neonato em contato à diferentes microbiotas adultas (revisto por SPROCKETT *et al.*, 2018). Mais tarde, na transição a alimentos sólidos, a microbiota passa a se estabilizar até adquirir uma composição semelhante à encontrada em adultos, o que ocorre em torno dos dois anos de vida. O sistema imune (SI), assim como a dieta, auxilia na seleção dos microrganismos da microbiota. Foi observado que linhagens de *E. coli* comensais adaptaram-se mais lentamente ao intestino de camundongos *Rag2^{-/-}* (que não possuem células B e T), quando comparados aos animais selvagens (BARROSO-BATISTA *et al.*, 2015; SPROCKETT *et al.*, 2018). Esses eventos iniciais na instalação da microbiota intestinal são fundamentais para a saúde do recém-nascido e os estágios subsequentes da vida adulta (CREMON *et al.*, 2018).

Os colonizadores primários são bactérias anaeróbias facultativas, os quais reduzem as concentrações locais de oxigênio, permitindo, em seguida, a colonização por anaeróbios estritos (KAWAMOTO *et al.*, 2014). A microbiota adulta é parcialmente estável, acredita-se que 60% de todas as linhagens bacterianas dentro de um indivíduo adulto persistem por até 5 anos e durante graves perturbações, como tratamento com antimicrobianos, a diversidade da microbiota diminui drasticamente. Durante essas perturbações, algumas espécies responsáveis pela resistência à colonização podem ser eliminadas possibilitando assim o

crescimento excessivo de outros tipos de microrganismo (Revisto por DONALDSON *et al.*, 2015).

São mais de mil espécies retratadas na microbiota intestinal de um adulto (LIN *et al.*, 2017), segundo revisores (QIU *et al.*, 2022) afirma-se que a microbiota humana compreende de dez a cem trilhões de microrganismos. Dentre elas é possível encontrar bactérias aeróbias e anaeróbias, arqueias, fungos, protozoários e vírus. As bactérias são relatadas como o grupo dominante nesse ambiente, com uma densidade de 10^{11} - 10^{12} células/mL, representadas pelos filos dominantes Bacteroidota (anteriormente Bacteroidetes), Bacillota (ant. Firmicutes) e Actinomycetota (ant. Actinobacteria), Pseudomonadota (ant. Proteobacteria) e Verrucomicrobiota (ant. Verrucomicrobia) (Revisto por CORTHER *et al.*, 2010; QIU *et al.*, 2022). O filo Bacillota contém táxons relevantes, incluindo *Ruminococcus*, *Clostridium*, Lactobacillaceae e os produtores de butirato *Eubacterium*, *Faecalibacterium* e *Roseburia*. O filo Bacteroidota é representado pelos gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*, que degradam uma variedade de glicanos complexos. E, por fim, o filo Actinomycetota inclui os gêneros *Collinsella* e *Bifidobacterium*. Em menor proporção, a microbiota intestinal é constituída por componentes do filo Pseudomonadota, dentre eles os gêneros *Escherichia* e *Desulfovibrio*. O filo Verrucomicrobiota descrito em 1997 inclui o gênero *Akkermansia*, especificamente a espécie *Akkermansia muciniphila* envolvidas na degradação de muco (DERRIEN *et al.*, 2004; Revisto por TREMAROLI *et al.*, 2012; DONALDSON; MAZMANIAN, 2016). Em virtude das diferenças fisiológicas ao longo do intestino, como gradiente de oxigênio, peptídeos antimicrobianos (ácidos biliares, por exemplo) e pH, a população microbiana pode variar ao longo do intestino. Os táxons predominantemente presentes no intestino delgado são Lactobacillaceae Enterobacteriaceae, bactérias filamentosas segmentadas (BFS), e *Helicobacter* spp, enquanto no cólon aponta-se espécies das famílias Bacteroidaceae, Prevotellaceae, Rikenellaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Bifidobacteriaceae e *Akkermansia muciniphila* (Revisto por DONALDSON; MAZMANIAN, 2016).

Eubiose é a condição no qual há um equilíbrio interespecies da comunidade microbiana com o hospedeiro saudável, na qual a microbiota exerce funções sem acarretar danos para o mesmo (CLEMENTE *et al.*, 2012; AL-RASHIDI, 2022). A homeostase é mantida por vários fatores, como genética do hospedeiro, dieta, número diário de defecações, atividade física, tabagismo e uso de drogas (Revisto por FAN; PEDERSEN, 2021).

Acredita-se que o TGI humano tenha dez milhões de genes associados a diferentes espécies microbianas, e que a expressão desses genes contribui para a homeostase do sistema imune, conversão de alimentos em nutrientes úteis para o hospedeiro, assim como proteção contra patógenos intestinais pela geração de subprodutos (BELZER *et al.*, 2013; FAN; PEDERSEN, 2021). A digestão, por exemplo, requer a contribuição de diferentes grupos de microrganismos fermentativos com atividades complementares. Estes microrganismos interagem para formar uma cadeia complexa garantindo a transformação de macromoléculas em metabólitos que podem ser assimilados pelo hospedeiro (Revisto por ZANELLA *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2021). No cólon, os carboidratos complexos são digeridos e posteriormente fermentados em ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) como n-butilato, acetato e propionato. Os AGCCs são então transportados pela corrente sanguínea para diferentes órgãos onde são utilizados como substratos para o metabolismo energético, principalmente pelas células hepáticas que os utilizam para a gliconeogênese (Revisto por SHANG *et al.*, 2018). Além disso, os AGCCs podem modular a inflamação, atuar como vasodilatadores e contribuir para motilidade intestinal e cicatrização de lesões (Revisto por TREMAROLI *et al.*, 2012). Assim sendo, a interrupção deste equilíbrio funcional pode ter impactos potencialmente deletérios sobre a nutrição e a saúde do hospedeiro, como por exemplo diabetes tipo 1 e 2, doença celíaca, problemas relacionados ao metabolismo do colesterol, efeitos comportamentais, e transtornos cardiovasculares (BELZER *et al.*, 2013; FAN; PEDERSEN, 2021).

Diferentemente do que é observado na eubiose, a disbiose ocorre quando há perturbações na microbiota acarretando possíveis danos para o hospedeiro. O estado de disbiose pode estar envolvido em situações patológicas como doenças respiratórias (asma), câncer, doenças autoimunes, síndromes metabólicas (obesidade e diabetes tipo 2), doenças inflamatórias intestinais, doenças cardiovasculares e hepáticas, distúrbios neurodegenerativas e alergia alimentar (FAN; PEDERSEN, 2021; AL-RASHIDI, 2022). Acredita-se que uma alta diversidade de táxons e de genes microbianos caracterizam um microbiota intestinal saudável (HUTTENHOWER *et al.*, 2012). Não há uma referência “padrão ouro” de microbiota saudável, segundo Fan (2021), dado que há uma enorme variação em nível de taxonomia entre os indivíduos de diferentes demografia, etnia, sexo, idade e estado de saúde. No entanto, sabe-se que alguns microrganismos aparecem de forma

abundante em algumas condições patológicas, como foi citado por alguns autores (DERRIEN *et al.*, 2004; Revisto por TREMAROLI *et al.*, 2012; DONALDSON; MAZMANIAN, 2016). As bactérias produtoras de AGCCs (*Eubacterium ventriosum* e *Roseburia intestinalis*) estão associadas a obesidade, enquanto a produtora de butirato (*Oscillospira* spp.) foi associada a eutrofia (TIMS *et al.*, 2013; GOPHNA *et al.*, 2017; MILLER *et al.*, 1982; FAN; PEDERSEN, 2021). Indivíduos com resistência insulínica, por exemplo, apresentaram uma diminuição de táxons produtores de butirato e na abundância relativa de *Akkermansia muciniphila*, bem como no aumento da abundância relativa de bactérias que podem aumentar a inflamação local (ALLIN *et al.*, 2018; ZHONG *et al.*, 2019).

ABBAS, Abul. **Imunologia celular e molecular 7a edição**. Elsevier Brasil, 2012.

O sistema imune do hospedeiro é dividido em imunidade inata e adquirida, na qual a microbiota participa ativamente da maturação desses componentes. A imunidade inata, por exemplo, auxilia na proteção contra microrganismos e lesão tecidual (ABBAS, 2012). Durante as primeiras semanas de vida, há uma redução da atividade dos receptores do tipo *Toll* (TLRs), que são necessários para a formação de uma comunidade microbiana estável no intestino. A redução da atividade vai inibir a resposta inflamatória e promover a tolerância imunológica à microbiota (Revisto por FASANO *et al.*, 2021). Os TLRs são receptores ativados por vários padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs). Ao ser estimulado, desencadeia uma cascata de sinalização, resultando na ativação de NF- κ B que irá induzir a expressão de genes codificadores de citocinas, quimiocinas e outros mediadores de resposta imune humoral (Revisto por FRANCINO, 2014). Outro receptor que auxilia na montagem da microbiota são os receptores do tipo NOD (NLRs), incluindo o NOD1 e NOD2. A proteína NOD1 promove a resposta imune inata e adaptativa nos tecidos linfóides, enquanto a proteína NOD2 inibe a inflamação intestinal e potencializa a renovação epitelial (LEVY *et al.*, 2015). Os inflamassomas, agrupamentos de complexos multiprotéicos de NLRs, desencadeiam a atividade de caspases inflamatórias que vão estimular a maturação de interleucinas (IL-1 β e IL-18) e morte celular lítica (piroptose). O inflamassoma NLRP6, por exemplo regula a expressão de peptídeos antimicrobianos (AMPs), induz a liberação de IL-18, norteia a secreção de muco e controla a resposta imune antiviral no intestino (BROZ;

DIXIT, 2016). A proteína Resposta primária de diferenciação mieloide 88 (MyD88) controla a expressão de AMPs, IL-1 β , IL-18, diferenciação de célula T e estimula a produção de IgA. Um exemplo de AMPs, bem elucidado é o RegIII γ , que limita a colonização de bactérias Gram-positivas e inativa a resposta imune adaptativa (WANG *et al.*, 2015). A microbiota desempenha um papel na maturidade e funcionamento das células linfóides inatas (ILC), classificadas em 3 subgrupos de células: ILC1, ILC2 e ILC3. A secreção de IL-23 pelas células dendríticas (CD), estimula a ILC3 a produzir IL-22, promovendo a secreção de AMPs, IL-1 β em macrófagos e IL-23 em células dendríticas (SONNENBERG; ARTIS, 2012). A ausência de IL-22 dependente de ILC3, por exemplo, levou à disbiose e ao aumento da população de *Alcaligenes xylosoxidans* (SONNENBERG *et al.*, 2012).

Os estudos em animais IG demonstram a importância dos microrganismos na maturação do sistema imune do hospedeiro (Revisto por MURGUÍA *et al.*, 2013). Desde o componente da imunidade inata como a adquirida. Foi observado que animais criados em isoladores estéreis, a fim de controlar sua exposição a microrganismos, apresentam desenvolvimento reduzido das placas de Peyer quando comparado a camundongos SPF (*Specific Pathogen Free* - Livre de patógenos específicos) (BELKAID; HAND *et al.*, 2014). Foi observado, nesses animais IG, um número reduzido de células T intestinais (TH17, Treg) e células B produtoras de IgA (Revisto por AL-RASHIDI, 2022).

Durante o período fetal, foi observado a transferência de imunoglobulinas (IgG), por endocitose, pela placenta ao feto. Essa transferência ocorre pela presença de enterócitos vacuolizados, capacidade endocítica dos enterócitos fetais e presença de receptores FcRn. Após o nascimento, o epitélio intestinal diminui a expressão do receptor, perdendo a capacidade endocítica. Apesar dessa expressão reduzida de *FcRn*, foi sugerido que os complexos luminiais IgG/antígeno podem ser transportados através da barreira intestinal para a *lamina propria*, para interagir com células apresentadoras de antígenos e outras células imunes (SPENCER *et al.*, 1986; CHEN *et al.*, 2020). Confirmando que a arquitetura linfóide se forma previamente ao nascimento. As células B e T são encontradas no intestino de feto humanos (12-14 semanas de gestação) e sua abundância e maturação aumentam até o nascimento. Apesar dos indícios da formação do sistema imune no período fetal, há uma imaturidade geral do SI após o nascimento, que será maturado a partir da estimulação microbiana (Revisto por WESTRÖM, 2020).

A microbiota estimula a resposta imune adquirida pela expansão de linfócitos específicos. A produção de células T helper (Th) 17 é promovida por diversos estímulos, como é o caso das bactérias filamentosas segmentadas (SFB) da classe Clostridia, que ao se ligar promove a expressão da proteína Amilóide A sérica (SAA). As CD da *lamina propria* são estimuladas por SAA, que induz estas células a liberar citocinas (IL-6, IL-23) que posteriormente induzirão a diferenciação celular de linfócitos TH17 (IVANOV *et al.*, 2009). O ATP luminal fornecido por outros microrganismos comensais não patogênicos, fornecem energia para o desenvolvimento de células TH17. A produção de IL-1 β pelos estímulos da microbiota auxiliam na diferenciação de células TH17 (SHAW, *et al.*, 2012; AL-RASHIDI, 2022). Outro conjunto de células que se acumulam no intestino e são importantes para a homeostase são as células T regulatórias (Treg). As bactérias podem estimular células epiteliais a produzir TGF- β que irão promover a formação de células Treg a partir de células Th (KAMADA *et al.*, 2013). A produção de anticorpos na mucosa intestinal proveniente da resposta imunológica promovida pela microbiota é bem caracterizada na literatura. Sabe-se que a imunoglobulina A (IgA) secretada no lúmen reveste antígenos ou bactérias comensais afim de restringir sua ligação ao epitélio ou disseminação na *lamina propria* (MACPHERSON *et al.*, 2012). Um exemplo da estimulação da microbiota na produção de IgA é por meio da flagelina, indutora da produção de ácido retinóico, responsável pela diferenciação de células B produtoras de IgA. Outros estímulos como expressão de TNF, óxido nítrico sintase 2 (NOS2), fator de ativação de células B (BAFF), ligante indutor de proliferação (APRIL) pelas CD amplifica a produção de IgA (TEZUKA *et al.*, 2011; AL-RASHIDI, 2022).

A relação entre os sinais que a microbiota fornece são responsáveis por estimular o sistema imunológico e a interrupção dessas interações complexas e dinâmicas pode ter consequências profundas para a saúde do hospedeiro. A evolução da mucosite intestinal juntamente com a inflamação exacerbada e alteração da população microbiana é amplamente relatada na literatura (FAN; PEDERSEN, 2021; SPROCKETT *et al.*, 2018). A microbiota intestinal exerce papéis importantes nessa comorbidade, assim como a ativação do sistema imune. Após a administração do quimioterápico o material genético sofre danos e as EROs geradas são responsáveis por desencadear uma cascata de sinalização de vias inflamatórias

na mucosa (ONG *et al.*, 2010). O principal responsável nessa sinalização é o (NF- κ B), que é um heterodímero das subunidades p65 / RelA e p50 ou p52, amplamente encontrado no citoplasma das células. Quando inativo, o NF- κ B é fortemente ligado à classe de proteínas I κ B, que atuam como um "inibidor" da sua função. A quimioterapia, por sua vez, é capaz de estimular esse complexo enzimático (NF- κ B / I κ B) pela fosforilação, permitindo assim a translocação nuclear de NF- κ B e regulação positiva de vários genes associados à mucosite, como citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e genes pró e anti-apoptose (THORPE *et al.*, 2013). As principais citocinas pró-inflamatórias expressas nesse contexto são TNF, IL-1 β e IL-6, que são capazes de regular positivamente o NF- κ B, gerando assim uma resposta inflamatória amplificada. No caso da mucosite intestinal, é observado também uma modificação da população de bactérias do TGI, marcada pelo aumento de enterobactérias, principalmente *E. coli* (MENEZES-GARCIA *et al.*, 2020). Pedroso *et al.* (2014) citaram que a alteração da microbiota depende também do quimioterápico utilizado, uma vez que o irinotecano é capaz de aumentar a população de Clostridioides e *Staphylococcus* no jejuno; assim como a população de *Clostridium*, *Enterococcus*, *Serratia* e *Staphylococcus* no cólon; e diminuição de *Bifidobacterium* nas fezes. Enquanto isso, o 5-FU causa diminuição da população de *Clostridium*, Lactobacilos e *Streptococcus* no jejuno, e *Enterococcus*, Lactobacilos e *Streptococcus* no cólon (PEDROSO *et al.*, 2014). Como dito anteriormente, o sistema imunológico monitora constantemente o ambiente intestinal, permitindo que as bactérias da microbiota atravessem a barreira epitelial até as placas de Peyer, onde as células imunes iniciam uma resposta imune inata. Os produtos bacterianos da microbiota, por meio da ligação aos TLRs, são capazes de levar à ativação do NF- κ B (FRANCINO, 2014). Portanto, a modificação da microbiota, conseqüentemente, pode estimular ainda mais o sistema imune, modificando assim a homeostase intestinal e gerando um ambiente pró-inflamatório (THORPE *et al.*, 2013).

1.3 Probióticos e *Weissella paramesenteroides* WpK4

O cientista russo Elie Metchnikoff, nascido em 1845, se tornou professor de zoologia em Odessa. Após contato com pesquisador Louis Pasteur, Metchnikoff mudou-se da Rússia

e foi trabalhar voluntariamente e depois como chefe de laboratório no Instituto Pasteur em Paris. Em 1908, foi prestigiado com o prêmio Nobel de fisiologia pelos trabalhos sobre células fagocíticas e a teoria da longevidade (GORDON, 2016). Metchnikoff postulou que o envelhecimento estaria relacionado a um envenenamento do corpo pelo metabolismo da microbiota. E, que o consumo de leites fermentados por bacilos poderia prevenir a ação destas toxinas, diminuir a população de microrganismos tóxicos e trazer longevidade aos consumidores (METCHNIKOFF, 1907). O tempo se passou e até hoje a ingestão de probióticos em longo prazo e diário, corrobora o fato observado por Metchnikoff. Os probióticos foram nomeados pela FAO/WHO e definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, oferecem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO; WHO 2001). Durante algum tempo, estabeleceu-se que a dose diária desses microrganismos estaria em um intervalo de 10^6 a 10^7 UFC/mL ou por grama de produto utilizado como veículo (SOHAIL *et al.* 2013). No entanto, atualmente sabe-se que é difícil estabelecer uma dose precisa para os probióticos em geral, uma vez que diferentes doses podem ser necessárias, dependendo da função benéfica que se deseja atingir e do microrganismo probiótico em questão (Revisto por FAZILAH *et al.*, 2018; KERRY *et al.*, 2018).

Embora a definição proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) ainda seja aceita pela maioria dos pesquisadores, novas definições (paraprobióticos, pós-bióticos, psicobióticos) surgiram a fim de agrupar agentes que fogem da definição oficial de “microrganismos vivos”, mas que também geram impactos significativos à saúde humana (revisto por ZENDEBOODI *et al.*, 2020). No geral, os pós-bióticos (metabólitos secundários dos microrganismos, ou preparação de microrganismos inativos e/ou seus componentes que promovem efeitos benéficos) são compostos antimicrobianos produzidos pelos microrganismos sendo eles bacteriocinas, ácidos orgânicos, etanol, diacetil, acetaldeído e peróxido de hidrogênio (KERRY *et al.*, 2018; SALMINEN *et al.*, 2021).

Apesar de alguns autores relatarem que certos probióticos podem apresentar efeitos benéficos ao hospedeiro mesmo se administrados mortos ou inativados (paraprobióticos) por métodos físicos (calor, radiação gama, radiação ultravioleta, alta pressão hidrostática, ultrassom e liofilização) e químicos como a inativação ácida (BUSANELLO *et al.*, 2012), a nomenclatura paraprobiótico é controversa, de modo que a Associação Científica

Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) não aceita esse termo, e classificam os microrganismos inativos por métodos físicos ou químicos como pós-bióticos (SALMINEN *et al.*, 2021).

Outro conceito bastante relatado na literatura são os psicobióticos, responsáveis por influenciar positivamente a relações intestino-cérebro com efeitos ansiolíticos e antidepressivos. O surgimento desse conceito se fez necessário após a percepção de que camundongos IG possuem reações fisiológicas exageradas ao estresse em comparação com animais CV. As reações anormais foram reversíveis pela recolonização bacteriana induzida por probióticos (SUDO *et al.*, 2005). Desde então, ficou claro que as bactérias intestinais participam da regulação de diversos e importantes processos fisiológicos, desde a imunomodulação, adiposidade e balanço energético bem como a atividade eletrofisiológica do sistema nervoso entérico (SARKAR *et al.*, 2016).

Há diversas evidências científicas que apoiam a eficácia clínica e efeitos profiláticos exercidos pelos probióticos contra distúrbios ou doenças gastrointestinais, síndromes metabólicas, câncer e distúrbios psíquicos. É possível observar alívio dos sintomas pelo uso de probióticos (Revisto por KERRY *et al.*, 2018). O mecanismo de prevenção de doenças se dá pelo fato desses microrganismos competirem por sítios de ligação e por nutrientes, fornecendo, portanto, uma barreira protetora contra bactérias patogênicas, assim como pela ação antimicrobiana. Os probióticos também podem aumentar a função de barreira física e imunológica do intestino, aumentar a produção de muco, diminuir a lesão isquêmica pela produção de óxido nítrico e modular a resposta inflamatória (KOMATSU *et al.*, 2008; ISLAM, 2016). Além de controlar a microbiota intestinal, estabilizando-a após o uso de antibióticos, eles auxiliam na digestão da lactose em indivíduos intolerantes, aliviam a constipação, aumentam a absorção de minerais e vitaminas; e reduzem produtos tóxicos que vêm do alimento ou da própria microbiota como o LPS e o sulfeto de hidrogênio (KOMATSU *et al.*, 2008). Os probióticos podem modular a liberação hormonal e regular cognição pelo eixo intestino-cérebro, como foi observado com *Levilactobacillus brevis* DPC6108 (antigo *Lactobacillus brevis*) e *Bifidobacterium dentium* produtoras de ácido gama-aminobutírico, um neurotransmissor cerebral que ajuda os seres humanos a suprimir a ansiedade e a depressão. Muitas bactérias intestinais sintetizam compostos neuroativos semelhantes aos produzidos no cérebro do hospedeiro (MARQUES *et al.*, 2016).

Atualmente os probióticos utilizados vão além das espécies de Lactobacilos e das espécies pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*. Por exemplo, bactérias dos gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus* (*E. faecium*), *Streptococcus* (*S. salivarius*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*) e alguns fungos filamentosos (*Aspergillus oryzae*) são usados como probióticos (revisto por YADAV *et al.*, 2017). Os mecanismos de ação podem ser compartilhados entre diferentes linhagens e espécies. Além disso, é impossível afirmar que todos os microrganismos dos gêneros mais estudados como probiótico, por exemplo bifidobactérias e lactobacilos, apresentam funcionalidade. Este fato ressalta a importância de se avaliar criteriosamente as diferentes linhagens e espécies quanto ao potencial probiótico (NOLE *et al.*, 2014; ISLAM, 2016). Produtos contendo probióticos representam uma oportunidade sem igual para fornecer microrganismos vivos eficientes (leveduras ou bactérias) ao trato digestivo. Os microrganismos probióticos que caracterizam esses produtos são provenientes principalmente do intestino humano ou de outros animais, além de alimentos tradicionais fermentados, tais como picles, iogurtes, queijos e kefir (SUEZ *et al.*, 2019).

O gênero *Weissella* é composto por bactérias Gram-positivas, catalase-negativas, não formadoras de endósporos, com morfologia cocoide ou em forma de bastonete, pertencentes ao grupo de bactérias geralmente conhecidas como bactérias ácido-láticas (BAL). Espécies hoje pertencentes ao gênero *Weissella* pertenciam ao gênero *Leuconostoc* devido às semelhanças morfológicas e metabólicas. Collins e colaboradores (1993), por meio de diversos testes bioquímicos conseguiram designar o gênero *Weissella* dentro da família Leuconostocaceae. Com o advento das técnicas moleculares, observou-se a necessidade de se criar o gênero *Weissella*.

O gênero *Weissella* é considerado ubíquo, uma vez que as bactérias são encontradas em uma variedade de habitats como solo, esterco, sedimentos de pântanos, lagos, plantas, alimentos fermentados, cavidade oral e mucosas de diferentes animais, leite materno, entre outros (revisto por FUSCO *et al.*, 2015). Algumas linhagens de *Weissella* são capazes de produzir bacteriocinas, como Weissellicina 110 (produzida pela *W. cibaria* 110), Weissellina A (*W. paramesenteroides* DX), Weissellicina L (*W. hellenica* 4-7), Weissellicina D (*W. hellenica* D1501), Weissellicina M e Weissellicina Y (*W. hellenica* QU 13). Essas bacteriocinas são investigadas devido às suas aplicações tecnológicas em preservação de

alimentos e saúde bucal (ABRIOUEL *et al.*, 2015; revisto FUSCO *et al.*, 2015). *Weissella paramesenteroides* foi proposta como uma nova espécie por Garvie, em 1967, morfológicamente muito semelhantes a *L. mesenteroides*, no entanto se diferenciam pela formação de exopolissacarídeos (EPS) a partir de sacarose ou pela não formação de amônia a partir de arginina. São mais tolerantes ao NaCl e resistentes ao pH abaixo de 5. A temperatura ideal de crescimento é de 18 a 24 °C, mas muitas linhagens crescem a 30 °C. As bactérias produzem ácido a partir de galactose, maltose, melibiose, sacarose e trealose (GARVIE, 1967).

A linhagem *Weissella paramesenteroides* WpK4 foi isolada da nasofaringe de suínos recém-desmamados e mostrou-se o candidato probiótico mais promissor entre algumas BAL avaliadas, em um estudo realizado por Alvim e colaboradores (2016). A linhagem apresentou, *in vitro*, resistência às condições estressantes encontradas no trato intestinal, capacidade de inibição de bactérias patogênicas, além de produzir peróxido de hidrogênio e secretar EPS. Além disso, camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4 e submetidos à infecção com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium apresentaram atenuação na perda de peso e na mortalidade após infecção. Foi observado que a linhagem, além de ser segura para o consumo, inibiu a translocação do patógeno para fígado e baço dos animais, atenuou as lesões causadas pela infecção, além de modular a resposta imune por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e produzir substâncias desejáveis para um candidato a probiótico (ALVIM, 2016).

Em um modelo experimental de infecção por *Giardia lamblia*, foi observado redução significativa da carga parasitária com a administração de 10^6 UFC/mL de *W. paramesenteroides* WpK4 por 21 dias. Além disso, foi observado uma atenuação das lesões epiteliais provocadas pela infecção e diminuição dos níveis IL-1 β , tanto na fase aguda quanto na fase tardia da infecção por *G. lamblia* (FONSECA *et al.*, 2015). Em animais com colite amebiana induzida por *Entamoeba dispar*, a administração desta bactéria promoveu aumento da regeneração epitelial, aumento do peso e da expressão de mucinas (PRADO *et al.*, 2019). A bactéria também demonstrou efeito protetor em modelo murino de colite induzida por DSS, melhorando os aspectos de saúde dos camundongos, reduzindo a perda de peso, melhorou os aspectos histológicos pela redução da atividade apoptótica e aumentou a síntese de IL-22. Neste mesmo estudo, foi observado também que camundongos em modelo de

estresse crônico, induzido pela contenção forçada, tratados com o microrganismo, apresentavam comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo atenuados. Além disso, houve diminuição da expressão do gene citocinas inflamatórias no hipocampo dos camundongos estressados, após administração da linhagem bacteriana (SANDES *et al.*, 2019). Em um estudo realizado recentemente, foi evidenciado uma tendência ao efeito protetor causado pela administração oral de *W. paramesenteroides* WpK4 viável ou não viável aos camundongos com mucosite induzida por 5-FU (MARCHIORI *et al.*, 2020).

Após o sequenciamento, montagem e anotação do genoma da linhagem *W. paramesenteroides* WpK4, observou-se a presença do *operon* triptofano (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_004214915.1/ Acesso 10/02/2023 às 12:55). Esse *operon*, encontrado em bactérias como *E. coli*, contém genes que codificam as enzimas que participam da via biossintética do aminoácido triptofano (TRP), responsável por sinalizações celulares importantes para o hospedeiro.

1.4 Metabolismo do TRP e Receptor de Hidrocarboneto Arílico (RHA ou AhR)

O TRP é um dos aminoácidos (aa) essenciais necessários para a síntese de proteínas e precursor de metabólitos que desempenham uma série de papéis importantes na fisiologia humana. O triptofano possui um grupamento metileno, e o carbono β conectado à posição 3 de um grupo indol. Este grupo indol é rico em elétrons e muito suscetível à substituição eletrofílica, como alquilação, nitração e halogenação, tornando o aa facilmente transformável em outros produtos bioativos (SUNDBERG; 2012). Os seres humanos não podem sintetizar esse aa, sendo assim necessário obtê-lo por meio da dieta. Os produtores primários desse aa são bactérias, fungos e plantas (STAVRUM *et al.*, 2013; Revisto por YANG; SAUVE, 2017; ROAGER; LICHT, 2018). Em bactérias, como *E. coli*, o TRP é produzido pela via metabólica envolvendo as enzimas expressas pelo *operon* triptofano (figura 1), que possui cinco genes (*TRPE*, *TRPD*, *TRPC*, *TRPB* e *TRPA*) (MIOZZARI *et al.*, 1978; SHIMAZAKI *et al.*, 2012; NELSON; COX, 2018). Os genes *TRPE* e *TRPD* codificam as enzimas Antranilato-sintase componente I e II, respectivamente. Essas enzimas são responsáveis pela conversão do Corismato em Antranilato que será fosforilado em N-(5'Fosforibosil) -

antranilato. O gene *TRPC* codifica a enzima N-(5'Fosforibosil) -antranilato-isomerase-indol-3-glicerol-fosfato-sintase, que converte o N-(5'Fosforibosil) -antranilato em Indol-3-glicerol-fosfato que, após a ação das enzimas Triptofano-sintase-subunidade β e α (produzidos pela expressão dos genes *TRPB* e *TRPA*), produz o L-triptofano (YANOFSKY *et al.*, 1981; SHIMAZAKI *et al.*, 2012; NELSON; COX, 2018).

Esse *operon* é regulado pelo próprio TRP por mecanismos de repressão ou atenuação da expressão. Quando em grandes quantidades, o TRP liga-se ao repressor (*TRPR*) mudando sua conformação e possibilitando assim que o repressor se ligue ao operador *TRP* (NELSON; COX, 2018). Essa ligação bloqueia a ligação da RNA-polimerase ao *operon* e inibe a expressão dos genes. A atenuação da transcrição também depende da disponibilidade de TRP, no entanto, em vez de bloquear a iniciação da transcrição, a atenuação promove o término precoce da transcrição. Existe uma região localizada entre o operador e o primeiro gene do *operon* (*TRPE*), essa região é chamada de sequência líder (codifica o segmento 1) e logo após há uma sequência atenuadora (segmentos 2 a 4). O atenuador, quando transcrito em RNAm, possui regiões auto complementares capazes de formar estruturas em forma de grampo (YANOFSKY *et al.*, 1981; SHIMAZAKI *et al.*, 2012; NELSON; COX, 2018; LI *et al.*, 2021). Resumidamente, quando o TRP está abundante, o ribossomo se move rapidamente ao longo do líder, forma-se o grampo terminador e a transcrição do *operon TRP* cessa. Quando o triptofano está escasso, o ribossomo se move lentamente ao longo do líder, forma-se o grampo não-terminador e a transcrição do *operon TRP* continua. Ou seja, a lógica da atenuação é a mesma da regulação pelo repressor *TRP*. Em ambos os casos, altos níveis de TRP na célula reprimem a expressão do *operon*. Isso faz sentido, já que altos níveis de TRP significam que a célula não precisa fazer mais enzimas biossintéticas para a produção adicional do aa. Assim as bactérias irão economizar energia, porque o TRP é o aa mais caro para sintetizar (NELSON; COX, 2018; LI *et al.*, 2021).

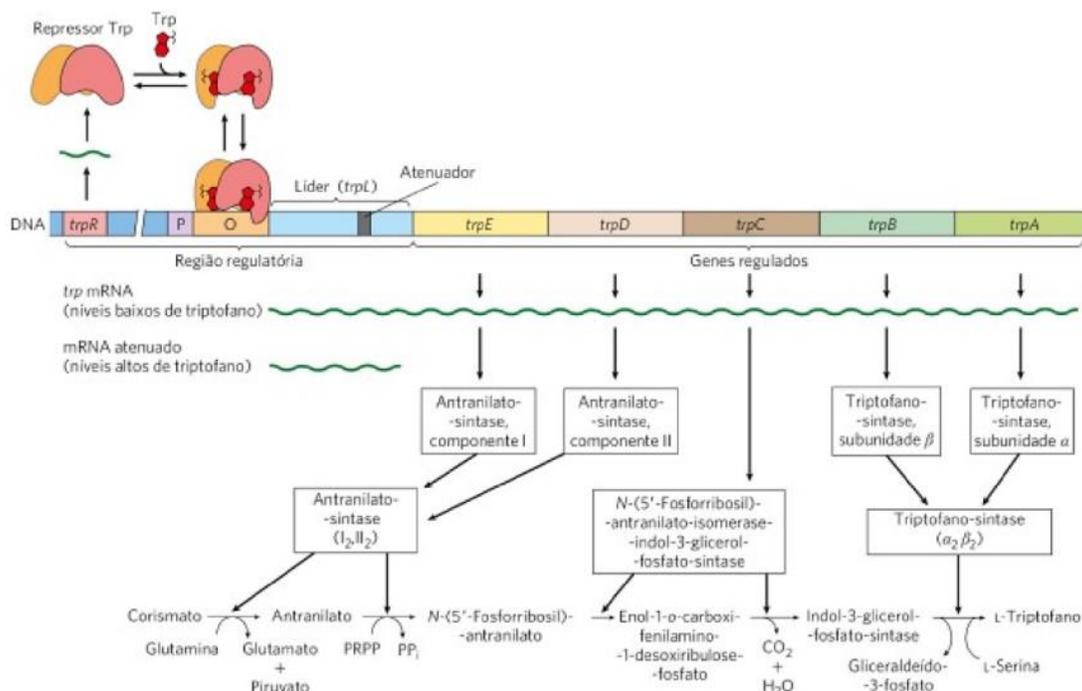


Figura 1 - O operon TRP. Retirado do livro Princípios de Bioquímica de Lehninger - 8.ed., 2022.

Como o TRP não é produzido pelas células animais, os seres humanos dependem de fontes exógenas desse aa essencial, obtido principalmente pela dieta (SUNDBERG; 2012). Sendo assim, as proteínas ingeridas são hidrolisadas no trato gastrointestinal humano e o TRP fica disponível para síntese proteica. Embora o TRP seja o aa menos abundante em proteínas e células, ele é um precursor biossintético para muitos microrganismos presentes na microbiota (PETERS, 1991; GAO *et al.*, 2018). O metabolismo do TRP (figura 2) segue três vias principais no trato gastrointestinal: (1) a transformação direta de TRP em várias moléculas, incluindo ligantes do receptor hidrocarboneto arílico (AhR), pela microbiota intestinal; (2) a via da quinurenina (KP) nas células imunes e epiteliais via indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO); e (3) a via de produção de serotonina (5-hidroxitriptamina [5-HT]) via TRP hidroxilase 1 (Tph1).

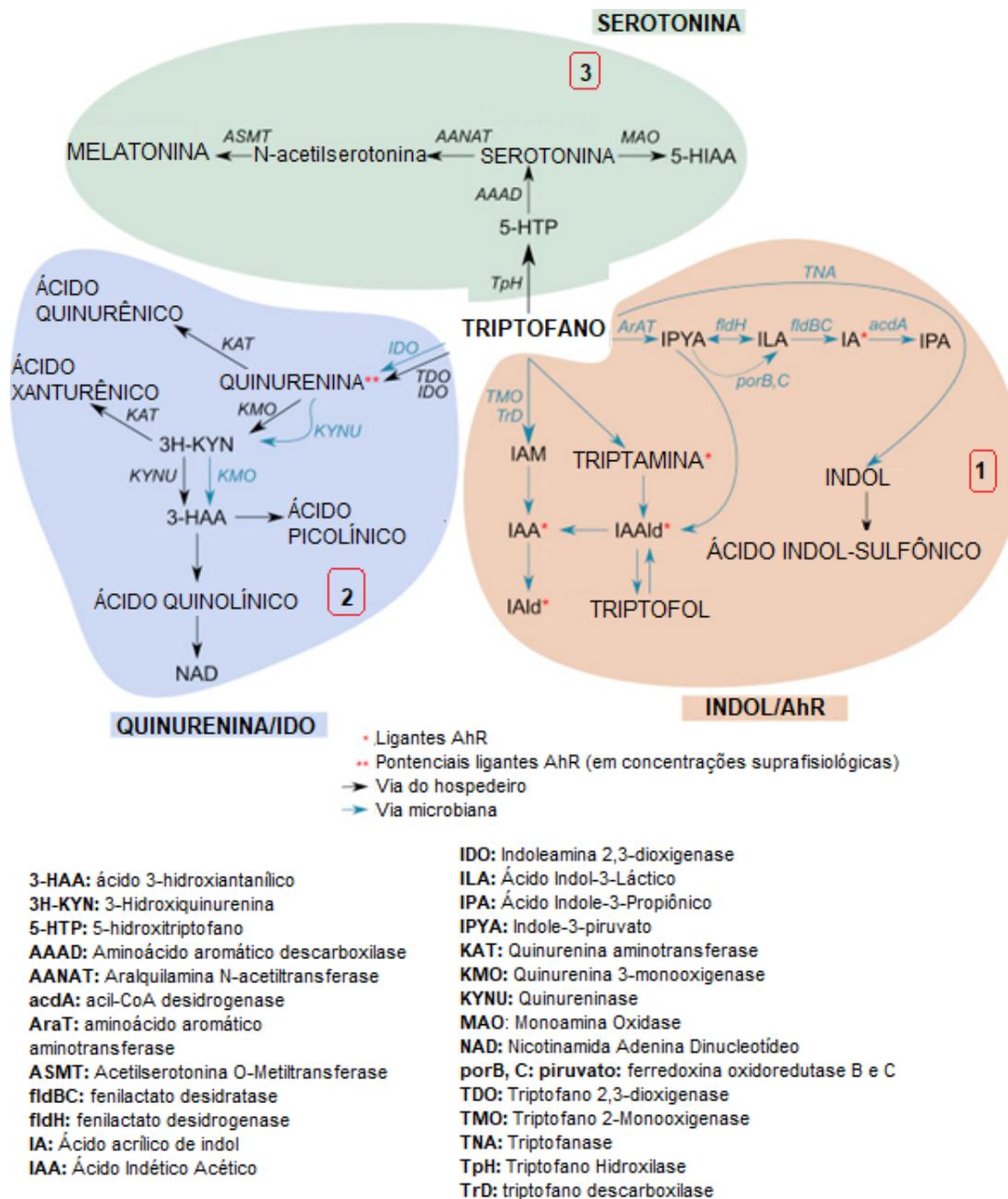


Figura 2 - Metabolismo de TRP pelas vias (1) Indol/AhR, (2) Quinurenina/IDO e (3) Serotonina/5-HTP. Adaptado de AGUS et al., 2018.

Segundo Gao e colaboradores (2018), aproximadamente 1 - 2% do TRP ingerido é convertido em serotonina (5-HT) e melatonina pela via da serotonina. O 5-HT é sintetizado a partir de TRP por reações enzimáticas em dois estágios envolvendo TRP hidroxilase (TrpH) e aa aromático descarboxilase (AAD). Nos animais, a serotonina é encontrada principalmente no trato gastrointestinal, nas plaquetas sanguíneas e no sistema nervoso central. Esse

neurotransmissor desempenha diversas funções no sistema nervoso, como a liberação de alguns hormônios, regulação do sono, temperatura corporal, apetite, humor, atividade motora e funções cognitivas (BHATTARAI *et al.*, 2018). A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é derivada do 5-HT por meio de reações de conversão enzimática em duas etapas (acetilação e metilação) principalmente na glândula pineal, mas também em outros tecidos, como retina, TGI, pele e leucócitos. A melatonina é responsável por regular o ciclo sono/vigília, outros ritmos circadianos e sazonais e atua como imuno-estimulador e agente citoprotetor (STAVRUM *et al.*, 2013; JENKINS *et al.*, 2016).

A KP resultante da ação das enzimas indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e triptofano-2,3-dioxigenase (TDO), utiliza 95% do TRP disponível e produz quinurenina, ácido quinolínico (QA), niacina, NAD e ácido quinurênico (KNA). Os produtos dessa via estão implicados na regulação de vários processos biológicos do hospedeiro, envolvendo neurotransmissão, inflamação e respostas imunes (AGUS, *et al.*, 2018). Hormônios do estresse (adrenalina e cortisol) são capazes de induzir a síntese de TDO, já a IDO é induzida frente a uma resposta imune inata e respostas pró-inflamatórias do tipo Th1 (IFN- γ e TNF). A IDO inibe a atividade que causa a indução de TDO e vice-versa (BADAWY, 2015). Alguns subprodutos dessa via são neurotóxicos como é o caso do 3-HAA (ácido-3-hidroxi-antranílico) (revisto por AGUS *et al.*, 2018).

Os microrganismos intestinais metabolizam o triptofano de forma direta pela via do indol, e ocorre a formação dos derivados indol-3-aldeído (IAld), ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-propiónico (IPA), indol-3-acetaldeído (IAAld) e ácido indoleacrílico (IAcra), que são ligantes de AhR (AGUS *et al.*, 2018). O receptor AhR é um membro da superfamília Per-Arnt-Sim (PAS) de fatores de transcrição envolvidos na detecção de sinais ambientais, como alterações no ritmo circadiano, tensão de oxigênio ou potencial de redução e oxidação (KRISHNAN *et al.*, 2018). Uma vez ativado por moléculas xenobióticas ambientais, como compostos sintéticos (por exemplo, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina - TCDD) e produtos químicos naturais, incluindo derivados de TRP e fitoquímicos (por exemplo, polifenóis), o AhR, no citosol, transloca-se para o núcleo, onde associa-se ao translocador nuclear de AhR (ARNT). O heterodímero AhR/ARNT formado liga-se a uma sequência consenso de DNA nas regiões promotoras e inicia a transcrição de genes, incluindo aqueles que codificam as enzimas do citocromo P450, como CYP1A1 e CYP1A2, envolvida no metabolismo de

toxinas e ligantes do AhR (ZELANTE *et al.*, 2013b; ALKHALAF; RYAN, 2015). Outros metabólitos do TRP além do indol e seus derivados como quinurenina, QA, XA e ácido cinabaránico (CA), podem funcionar como ligantes de AhR. Os genes ativados nessa via são os relacionados à inflamação (IL-6, IL-22) e à angiogênese, além disso, é crucial para a homeostase intestinal, agindo na renovação epitelial e na integridade da barreira (revisado por GAO *et al.*, 2018).

O papel da sinalização do AhR foi proposto, inicialmente, no desenvolvimento das células Treg, TH17 e células linfoides inatas (ILCs), para a produção IL-22 (MONTELEONE *et al.*, 2011; revisado por HUBBARD *et al.*, 2015). O AhR é altamente expresso nas células TH17 e sua ativação pela FICZ (6-Formylindolo[3,2-b] carbazole), agonista de AhR, por exemplo, aumentou a diferenciação das células TH17 e promoveu a produção de IL-22. As células TH17 são caracterizadas pela produção de IL-17A e pela expressão do fator de transcrição ROR γ t que participam da resposta imune a bactérias e fungos extracelulares e contribuem para a patogênese de vários distúrbios autoimunes. Na deficiência de AhR a produção de IL-22 pelas células TH17 foi prejudicada, uma vez que o papel desse receptor facilita o recrutamento do fator de transcrição ROR γ t para o promotor de IL-22 (YESTE *et al.*, 2014; GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2018). Entretanto, a IL-22 regula negativamente as células TH17 no intestino, inibindo a expansão de bactérias filamentosas comensais, conhecidas por promover a ativação das células TH17 (MONTELEONE *et al.*, 2011; revisado por HUBBARD *et al.*, 2015). As células Th22 foram identificadas como uma população de células T CD4 + caracterizadas pela produção de IL-22, na ausência de IL-17, em resposta a IL-6, IL-21 ou IL-23 (Revisado por GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2018). A IL-22 tem funções importantes na regeneração tecidual e na manutenção da pele e da barreira mucosa. Na mucosa, a expressão de IL-22 é desencadeada principalmente em resposta à interação de microrganismos com células apresentadoras de antígeno (APCs) e pela ativação do receptor AhR. Acredita-se que um dos mecanismos pelos quais a IL-22 exerce esses efeitos é pela indução de proteínas antimicrobianas (YESTE *et al.*, 2014; BEHNSEN *et al.*, 2014). Essas proteínas auxiliam na contenção de comensais do sítio intestinal. As proteínas antimicrobianas que são reguladas positivamente pela IL-22, nas células epiteliais, são lipocalina-2, lectinas do tipo C (Reg3 β e Reg3 γ) e peptídeos antimicrobianos como a psoriasina S100A7, as duas subunidades da calprotectina S100A8, S100A9; β -defensinas 2

e 3 (BEHNSEN *et al.*, 2014). Por exemplo, a IL-22 induz a produção de proteínas antimicrobianas que aumentam a competição e o crescimento de *E. coli* comensal que é uma concorrente direta de *S. Typhimurium*, diminuindo assim a população de *S. Typhimurium* e os efeitos inflamatórios observados nos modelos de febre tifoide em camundongos (BEHNSEN *et al.*, 2014; HUBBARD *et al.*, 2015).

O AhR também induz a produção das enzimas IDO 1 e 2 (Revisto por GUTIERREZ-VAZQUEZ *et al.*, 2018). Quando induzido por citocinas pró-inflamatórias, a IDO1 é ativada e as quinureninas são produzidas atuando como ligantes AhR. As quinureninas especificamente regulam a homeostase imunológica e aumentam a diferenciação de células T reguladoras, marcada por FoxP3⁺, que protegem em oposição a respostas inflamatórias exacerbadas (GOETTEL *et al.*, 2016). A ausência de IDO1 induz a regulação positiva da atividade de AhR/IL-22, mas a estimulação de AhR pode, por sua vez, afetar a IDO1 (Revisto por GAO *et al.*, 2018). Um exemplo prático da ativação do eixo IDO-AhR é a capacidade de impedir a infecção por *S. Typhimurium* (BEHNSEN *et al.*, 2014) e induzir uma redução significativa dos sinais clínicos de artrite por *Streptococcus* (ZELANTE *et al.*, 2014). Resumidamente, a grande variedade de metabólitos do TRP conduz uma relação importante entre o hospedeiro e sua microbiota, como é visto na figura 3.

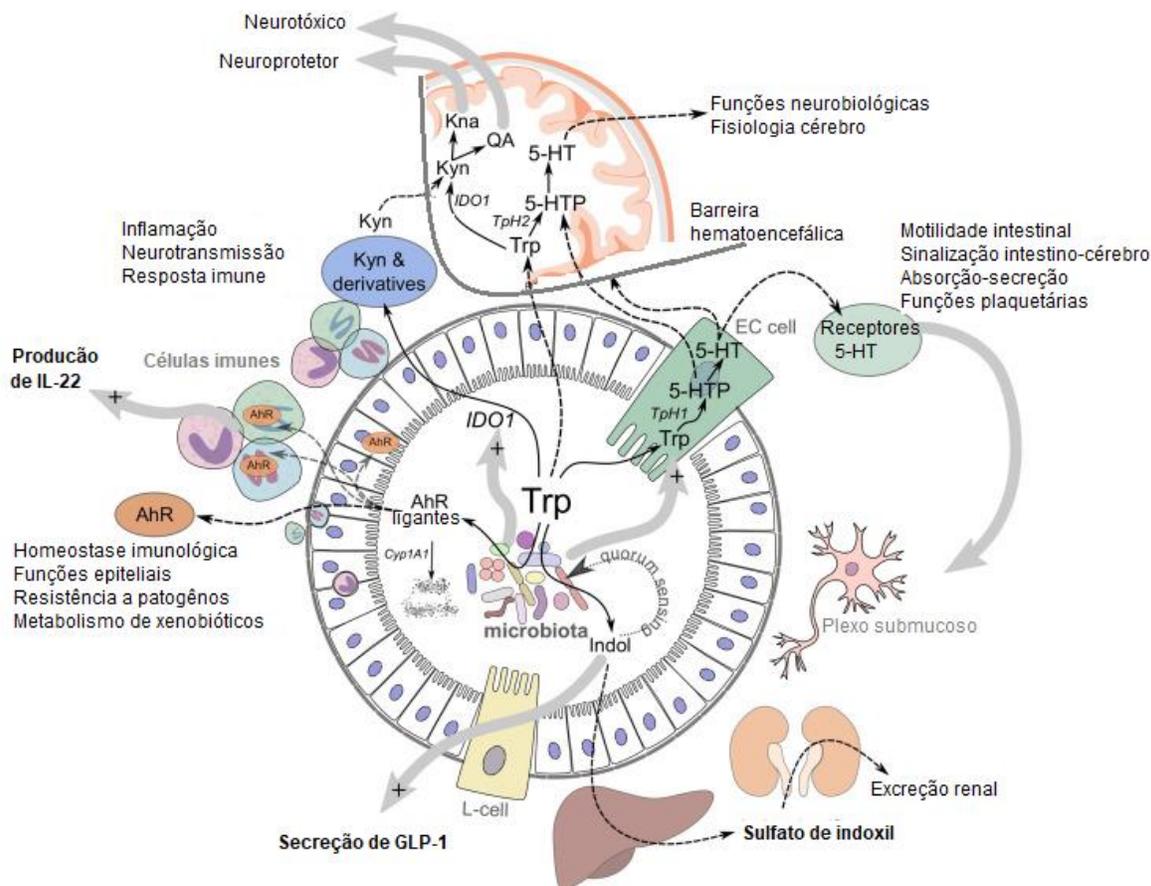


Figura 3 - Metabolismo de TRP sob o controle da microbiota intestinal. O TRP proveniente da dieta pode ser convertido em ligantes de receptor AhR pela microbiota intestinal. As vias de sinalização possíveis são: a) Ativação do Receptor AhR, no qual auxilia na homeostase imunológica e fisiologia da barreira intestinal; b) IDO1, na qual o TRP é convertido em QUI, essa via está envolvida em vias inflamatórias, resposta imune e funções neurobiológicas; c) 5-HTP, na qual o TRP é convertido em serotonina, responsável pela estimulação da motilidade intestinal. **Adaptado de** AGUS et al., 2018

O TRP dietético pode ser convertido diretamente pela microbiota intestinal em ligantes AhR que são capazes de ajustar funções locais e distantes do hospedeiro, incluindo homeostase imunológica e fisiologia de barreira. A microbiota intestinal também influencia a via IDO produtora de quinurenina, que desempenha um papel crítico nos mecanismos inflamatórios, respostas imunes e funções neurobiológicas. A produção periférica de serotonina pelas células enterocromafins também está sob a influência da microbiota intestinal. A serotonina produzida no intestino tem muitos efeitos locais, como estimular a motilidade intestinal e, mesmo que não atravesse a barreira hematoencefálica, a microbiota intestinal afeta

indiretamente as vias serotoninérgicas centrais modulando a disponibilidade de TRP e triptamina. 5-HTP, 5-hidroxitriptofano; IL, interleucina; QA, ácido quinolínico.

Portanto qualquer perturbação na microbiota do hospedeiro pode ser um fator inicial ou de reforço na patogênese de algumas doenças. Agus e colaboradores (2018) reuniram dados sobre doenças e o metabolismo do TRP. Foi observado uma correlação positiva entre desbalanço do metabolismo do TRP e o surgimento ou agravamento de algumas doenças, como por exemplo doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn e colite ulcerativa), obesidade e síndrome metabólica, distúrbios neuropsiquiátricos (distúrbios alimentares, autismo, doença de Parkinson e Alzheimer, distúrbios do sono) e complicações cardiovasculares associadas à insuficiência renal (KARU *et al.*, 2016; revisto por KAŁUŻNA-CZAPLIŃSKA *et al.*, 2019). Em doenças onde há uma inflamação exacerbada, foi observado um aumento da expressão deIDO1 e dos níveis séricos de quirunenina. Em doenças neuropsíquicas foi observado diminuição dos níveis de 5-HT, serotonina e melatonina, quando comparados a indivíduos saudáveis. A diminuição da produção de ligantes AhR pela microbiota em indivíduos doentes e menor expressão do receptor também foram observadas em doenças como Alzheimer e Parkinson (WIDNER *et al.*, 2002, 2000). Alguns metabólitos da via Indol, no entanto, podem ser tóxicos para o hospedeiro (Indol e Indoxil sulfato (IS)). Por exemplo, em pacientes com doença renal crônica (DRC), a depuração renal inadequada eleva os níveis de IS no sangue, causando efeitos deletérios. Foi observado também, que quando há acúmulo de IS, há um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e radicais oxidantes responsáveis pela patogênese da aterosclerose, insuficiência cardíaca congestiva e outras complicações cardiovasculares (revisto por AGUS *et al.*, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

O uso de probióticos por via oral auxilia na prevenção e tratamento da mucosite intestinal por 5-FU (ONG *et al.*, 2010; TUNG *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2020). Vários probióticos conhecidos comercialmente (Floratil®, VSL#3, Visbiome®, Yakult®) demonstraram efeitos benéficos, tanto na redução dos sinais clínicos da mucosite *in vivo* quanto na prevenção (RIBEIRO *et al.*, 2006).

A produção do TRP e os metabólitos gerados pelo seu catabolismo têm um papel importante na homeostase intestinal; e há evidências de efeitos benéficos advindos de probióticos, relacionados com o metabolismo do TRP (ARAGOZZINI *et al.*, 1979; LI *et al.*, 2009; GU *et al.*, 2013; ZELANTE *et al.*, 2013a; SARAF *et al.*, 2017; GALLIGAN, 2018; JENNIS *et al.*, 2018; KAŁUŻNA-CZAPLIŃSKA *et al.*, 2019; LIM *et al.*, 2020). Sabe-se que o TRP obtido na alimentação pode ser metabolizado pela microbiota gerando metabólitos que são capazes de ativar o receptor AhR e induzir a expressão de genes relacionados à inflamação (IL-6, IL-22) e à angiogênese, agindo na renovação epitelial e na integridade da barreira intestinal (YESTE *et al.*, 2014; BEHNSEN *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a linhagem *Weissella paramesenteroides* WpK4 vêm se mostrando um potente candidato a probiótico (ALVIM *et al.*, 2016; FONSECA *et al.*, 2019; SANDES, 2019). Foi observado, anteriormente, em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-FU, uma redução da mortalidade e melhora dos parâmetros histopatológicos, após administração oral de *W. paramesenteroides* WpK4 (MARCHIORI, 2020). O genoma sequenciado e anotado da linhagem revelou a presença do *operon* TRP, o que pode resultar na produção de aa e/ou moléculas responsáveis por sinalizações celulares importantes para o hospedeiro.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a possível influência entre o metabolismo do triptofano e o efeito protetor da linhagem *W. paramesenteroides* WpK4 em modelo experimental murino de mucosite induzida por 5-FU

3.2 Objetivos específicos

- Verificar, qualitativa e quantitativamente, a produção de TRP e seus metabólitos pela linhagem de *W. paramesenteroides* WpK4;
- Analisar se a administração oral da linhagem de *W. paramesenteroides* WpK4, de maneira terapêutica ou profilática, tem efeito na sobrevivência e peso de camundongos, no modelo de mucosite intestinal por 5-FU;
- Analisar se a administração oral da linhagem de *W. paramesenteroides* WpK4 tem efeito sobre parâmetros histopatológicos do jejuno de camundongos submetidos à quimioterapia;
- Analisar se a administração oral da linhagem de *W. paramesenteroides* WpK4 tem efeito nos parâmetros inflamatórios em camundongos submetidos à mucosite intestinal, pelos ensaios de peroxidase eosinofílica (EPO), mieloperoxidase (MPO), análise do comprimento intestinal e da expressão de genes de citocinas;
- Analisar se a administração oral da linhagem de *W. paramesenteroides* WpK4 tem efeito sobre parâmetros microbiológicos em camundongos submetidos à mucosite intestinal, por meio da avaliação da microbiota intestinal e possível translocação para fígado e baço;
- Analisar se a administração oral da linhagem de *W. paramesenteroides* WpK4 tem efeito sobre a expressão de moléculas envolvidas no metabolismo do TRP no hospedeiro

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagem bacteriana – origem, manutenção e cultivo

A linhagem *W. paramesenteroides* WpK4, gentilmente cedida pelo prof. Álvaro Cantini Nunes, foi isolada anteriormente da nasofaringe de suínos recém-desmamados e mantida em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Acumedia®) suplementado com glicerol 15% (v/v) em freezer a -80°C (Bio Freezer, Forma Scientific, Marietta, EUA). Uma vez descongelada, a bactéria foi cultivada por duas vezes consecutivas (inóculo de 2% v/v), em caldo MRS a 37°C por 18 – 24 h em estufa bacteriológica (Forma Scientific, Marietta, EUA), em condições aeróbicas, para obtenção de uma concentração de 10⁹ UFC/mL. Para verificar essa concentração, foi realizado diluições seriadas e plaqueamento em ágar MRS. Nos experimentos de verificação de produção de triptofano (TRP) e seus metabólitos, a linhagem foi crescida também em MRS e MRS suplementado com TRP (5 µM), conforme descrito por LIM *et al.*, 2020.

4.2 Animais

Camundongos convencionais C57BL6/J, fêmeas, com quatro ou oito semanas de idade, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos foram alojados em microisoladores (Alesco) autoclavados, com cama de maravalha, com livre acesso à ração e água filtrada, sendo armazenados em estantes ventiladas individualmente e com temperatura controlada (23°C), localizada em uma sala com ciclo claro/escuro de 12 horas de acordo com os padrões estabelecidos pelo CONCEA (2016). Os procedimentos experimentais realizados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA - protocolo 148/2019).

4.3 Avaliação do genoma da linhagem *W. paramesenteroides* WpK4: busca pelos genes de biossíntese e catabolismo do triptofano

Foi analisado por meio de ferramentas disponíveis no site NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) o genoma da linhagem *W. paramesenteroides* WpK4, disponíveis no domínio DDBJ/ENA/Genbank sob o número de acesso ASM421491v1 (acesso em 11/01/2023 às 17:09), em busca de genes para enzimas envolvidas no metabolismo do TRP (anabolismo e catabolismo). Sabe-se, após montagem e anotação do genoma da linhagem *W. paramesenteroides* WpK4, que essa linhagem possui o *operon* TRP, responsável pelo anabolismo desse aminoácido. A verificação da presença do *operon* TRP na linhagem *W. paramesenteroides* WpK4 foi confirmada pela realização de uma PCR com os iniciadores F (5' CTTGCTAAGGGTGGTGCTGA 3') e R (5' AACGAGGGCACTGCCAATAA 3') para o gene *TRPA* e os iniciadores F (5' GCAGGCAACAACCATGTCAG 3') e R (5' GCAAACACAACGTCCTGGTC 3') para o gene *TRPB*. Os iniciadores foram desenhados baseados nos genes encontrados no genoma da linhagem *W. paramesenteroides* WpK4. Além disso, uma anotação funcional do genoma da bactéria analisada (WpK4) foi realizada utilizando-se o programa DIAMOND v 0.9.24.125 (Buchfink *et al.*, 2014), alinhando as sequências de aminoácidos preditas contra bancos de dados contendo as sequências de aminoácidos das enzimas envolvidas no catabolismo do TRP. O alinhamento foi realizado utilizando o *BlastP* com os critérios de identidade mínima de 30% com a sequência de proteínas referência (ROST, 1999) e uma cobertura de no mínimo 60% (GALAGAN *et al.*, 2003), e *e-value default* de 10^{-7} . As proteínas envolvidas no anabolismo e catabolismo do TRP estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Enzimas envolvidas no anabolismo e catabolismo do TRP e suas funções.

Proteínas envolvidas no anabolismo de TRP	Função
Antranilato sintase (<i>trpE</i>)	CHA + Gln \leftrightarrow Pyr + Glu + ANTA
Antranilato PRPP transferase (<i>trpD</i>)	Difosfato + N- (5-fosfo- β -D-ribosil) antranilato \leftrightarrow 5-fosfo- α -D-ribose 1-difosfato + antranilato
Indol glicerol-fosfato-sintetase (<i>trpC</i>)	(2-carboxifenilamino) -1-desoxi-D-ribulose 5-fosfato + H ⁺ \rightarrow Glicerol 3-fosfato + CO ₂ + H ₂ O N-(5-fosfo- β -D-ribosil) antranilato \rightarrow 1-(2-carboxifenilamino) -1-desoxi-D-ribulose 5-fosfato
Triptofano sintase (<i>trpB</i>)	Glicerol-3-fosfato + L -serina \rightarrow
Triptofano sintase (<i>trpA</i>)	D -gliceraldeído 3-fosfato + H ₂ O + L -triptofano
Proteínas envolvidas no catabolismo de TRP	Função
Triptofanase (TNAA)	TRP \rightarrow INDOL
Idoleamina 2,3 dioxigenase (IDO)	TRP \rightarrow QUINURENINA*
Triptofano 2 monoxigenase (TMO)	TRP \rightarrow Indole-3-Acetamide (IAM)
Índole acetamida hidrolase (IAAH)	IAM \rightarrow AIA*
Aspartate aminotransferase family protein (AST)	AIA* \rightarrow IAld*
Aminotransferase amino ácido aromático (ARAT)	TRP \rightarrow Indole-3-piruvato (IPYA)
Índole piruvato descarboxilase (IPDC)	IPYA \rightarrow IAAlld*
Aldeído desidrogenase (ALD)	IAAlld \rightarrow AIA*
Triptofano descarboxilase (TRD)	TRP \rightarrow Triptamina*
Fenilactato desidrogenase (FLDH)	IPYA \rightarrow Ácido indol-3-láctico (ILA)*
Fenilactato desidratase (FIDH)	ILA \rightarrow IAcrA*
Acetil coA desidrogenase (ACDA)	IAcrA* \rightarrow indol ácido propiônico (IPA)

* Ligantes de AhR

4.4 Avaliação da produção de TRP e seus metabólitos por *W. paramesenteroides*

WpK4

Foram preparados inóculos de 2% v/v em caldo MRS, e em caldo MRS + TRP (suplementado com 5 μ M de TRP), em duplicata. Os meios inoculados foram incubados sob agitação (120 rpm), a 37°C por 48 h. Nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 horas, alíquotas dos meios foram coletadas, diluídas em NaCl 0,9% (p/v) e cultivadas ágar MRS, para análise do número de unidades formadoras de colônias por mL de amostra (UFC/mL). As curvas de crescimento foram construídas com base na média dos resultados da contagem aplicados a fórmula log UFC/mL.

4.4.1 Dosagem de TRP e metabólitos nos extratos livres de células

A dosagem foi realizada por cromatografia de alta eficiência. Para tanto, amostras de 20 mL foram coletadas nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 h de cultivo em cada meio, centrifugadas (5000 rpm; 4°C; 10 min) e filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,22 µm. Os sobrenadantes livres de células passaram por um processo de precipitação de proteínas com sulfato de amônio saturado (70%), em baixas temperaturas (4°C) por 24 h. Após a precipitação e centrifugação (10000 rpm; 4°C; 10 min), os sobrenadantes foram carregados em um cartucho de fase sólida (Strata-X), que foi previamente ativado com metanol e equilibrado com ácido fosfórico 1%. Os compostos indólicos foram eluídos do cartucho com 10 mL de metanol, o qual foi removido por evaporação sob vácuo a 45°C por 2 h. Os compostos foram dissolvidos em 1 mL de metanol e 100 µL foram analisados usando um cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu, Japão) e uma coluna Supelco Analytica C18 (30 cm x 3,9 mm, 5 µm, 100 Å). A fase móvel foi um gradiente de ácido fosfórico 1% e metanol (20 - 80%) por 60 minutos bombeados a uma taxa de fluxo de 1,0 mL / min. Os compostos foram detectados por absorvância ultravioleta a 254 nm. A identificação e quantificação foram baseadas, respectivamente, no tempo de retenção e na curva de calibração dos seguintes compostos: triptofano, ácido indol-3-acético (AIA), indol-3-aldeído (IAld), indol-3-acetal aldeído (IAAld), triptamina, ácido indol-acrílico (IAcrA) e quinurenina (Sigma Aldrich) (RODRIGUES *et al.*, 2016).

4.5 Modelo murino de mucosite intestinal por 5-FU

Foram utilizados camundongos convencionais C57BL6/J, fêmeas, com quatro e/ou oito semanas de idade, em experimentos diferentes. O protocolo de indução da mucosite intestinal com o quimioterápico 5-FU consistiu em uma dose diária de 75 mg/kg/d. administrada durante 3 dias consecutivos pela via intraperitoneal (i.p).

4.6 Administração de *W. paramesenteroides* WpK4

Os grupos experimentais tratados com probiótico (com e sem mucosite induzida por 5-FU) receberam diariamente, por gavagem, um inóculo de 10^8 UFC de *W. paramesenteroides* WpK4 (100 μ L de suspensão de WpK4 contendo 10^9 UFC/mL). Os grupos controle (com e sem mucosite induzida por 5-FU) foram inoculados com 0,1 mL de solução salina (0,9%). A administração da suspensão bacteriana contendo células viáveis, bem como de salina 0,9% foi realizada em dois esquemas diferentes. Num deles, a administração se iniciou 10 dias antes da primeira administração do 5-FU e no outro, a administração foi iniciada concomitantemente com o 5-FU. Em ambos os casos, a administração diária da suspensão bacteriana ou solução salina ocorreu durante todo o período de experimentação.

4.7 Avaliação da sobrevivência dos animais após indução da mucosite

Para esse experimento, foram utilizados 10 ou 11 animais por grupo, seguindo desenho experimental apresentado na figura 4. O esquema de administração dos tratamentos está apresentado na tabela 2. Os parâmetros avaliados foram:

- a. Variação de peso: Os animais foram pesados a cada dois dias, do 1º ao 30º dia de experimento.
- b. Escore clínico: Nos dias 10, 14 e 25 de experimento, foram coletadas fezes dos animais para avaliação da textura e pesquisa de sangue oculto.
- c. Monitoramento da taxa de sobrevivência: O número de animais que foram a óbito ao longo do procedimento experimental foi anotado em seus respectivos dias para posterior avaliação da taxa de sobrevivência em cada grupo experimental.

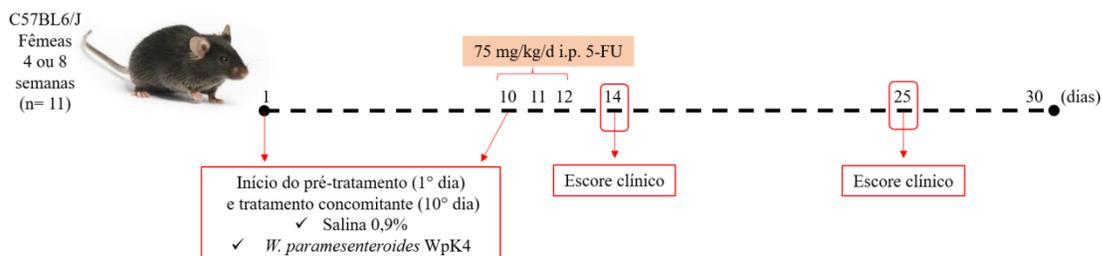


Figura 4 - Desenho experimental do ensaio de sobrevivência dos animais após indução da mucosite por 75 mg/kg/d de 5-FU.

Tabela 2 - Esquema de tratamentos por grupo do ensaio de sobrevivência dos camundongos após indução da mucosite por 75 mg/kg/d de 5-FU.

Grupo	Tratamento pré-quimioterapia (1º ao 9º dia)	Quimioterapia a (10º a 12º dia)	Tratamento após início da quimioterapia (10º ao 25º dia)
Controle	0,1 mL de salina 0,9%	5-FU,	0,1 mL de salina 0,9%
Tratamento 1	10 ⁸ UFC de WpK4 viável	75mg/kg/d	10 ⁸ UFC de WpK4 viável
Tratamento 2	-		10 ⁸ UFC de WpK4 viável

4.5 Avaliação de parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos após indução da mucosite

A administração diária, por gavagem, da suspensão bacteriana, bem como de salina 0,9% foi realizada 10 dias antes da primeira administração do 5-FU e continuou durante todo o período de experimentação. Os animais foram eutanasiados após o período experimental, por deslocamento cervical, com administração prévia de anestésico (xilazina 10 mg/kg + cetamina 100 mg/kg).

As amostras coletadas e os parâmetros avaliados foram:

- Variação de peso: Os animais foram pesados a cada dois dias, do primeiro ao último dia de experimento.
- Coleta de fezes: No 10º, 14º e 17º dia de experimento, foram coletadas fezes dos animais para avaliação da textura e pesquisa de sangue oculto e para cultivo em meio sólido (água MRS e água MacConkey) para avaliação de disbiose;

- c) Coleta de sangue: Após a anestesia, foi coletado o sangue através de punção intracardíaca para contagem de leucócitos totais;
- d) Coleta de órgãos: Fígado e baço: avaliação de translocação intestinal (ágar MRS e ágar MacConkey); Intestino delgado: Avaliação do comprimento intestinal total; Íleo: ensaios de MPO e EPO para avaliação da infiltração de neutrófilos e eosinófilos; avaliação histopatológica de cortes histológicos corados com PAS (Ácido periódico de Schiff) e H&E (Hematoxilina e eosina); qPCR para avaliação da expressão de genes de citocinas e moléculas envolvidas no metabolismo do TRP, remoção do conteúdo luminal para avaliação de disbiose;

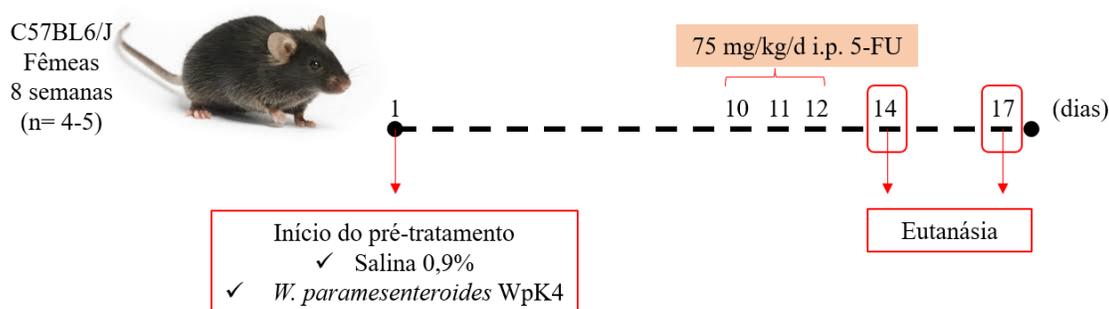


Figura 5 - Desenho experimental do ensaio de avaliação de parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos após indução da mucosite por 75 mg/kg/d de 5-FU.

Tabela 3 - Esquema de tratamentos por grupo do ensaio de avaliação de possíveis mecanismos de ação da linhagem *Weissella paramesenteroides* após indução da mucosite por 75 mg/kg/d de 5-FU.

Grupo	Gavagem (1° até último dia experimental)	Quimioterapia (10° a 12° dia)
Controle 1	0,1 mL de salina 0,9%	5-FU, 75mg/kg/d
Controle 2	0,1 mL de salina 0,9%	-
Tratamento 1	10 ⁸ UFC de WpK4 viável	5-FU, 75mg/kg/d
Tratamento 2	10 ⁸ UFC de WpK4 viável	-

4.5.1 Determinação do escore clínico

A análise do escore clínico dos animais foi baseada na avaliação da alteração da consistência fecal (0= normal, 1= pastosa ou 2= líquida) e da presença de sangue oculto nas fezes (0= ausente, 1= traços ou 2= presente), por meio do teste de papel guáiacó (Feca/cult, INLAB, Brasil). Esse método colorimétrico se baseia na reação guáiacó, na qual a hemoglobina irá oxidar os compostos fenólicos do papel guáiacó (incolor) em quinonas (azul) após a adição da solução reveladora (RICE; IHLE, 1994). A avaliação da perda percentual de peso corporal (0 = perda de até 5% do peso corporal; 1= perda de até 10% do peso corporal; 2= perda de até 15% do peso corporal; 3= perda de até 20% do peso corporal; 4= perda de peso corporal superior a 20%) também foi considerada no escore clínico (BATISTA, 2019).

4.5.2 Contagem total de leucócitos no sangue

Após a anestesia, foi coletado o sangue através de punção intracardíaca, do volume total de sangue retirado, 10 μ L de sangue foi adicionado em 90 μ L do corante Turk. As células foram contadas em câmara de Neubauer, visualizadas em microscópio óptico. Foi realizada a contagem em dois quadrantes e feita a média entre eles (CAMACHO-FERNANDEZ *et al.*2018).

4.5.3 Avaliação do comprimento do intestino

O comprimento do intestino delgado, que compreende a distância entre o piloro gastroduodenal e o óstio ileal, foi determinado com auxílio de uma régua logo após ser removido. O resultado foi expresso em centímetros. O intestino foi dividido em três partes para análises posteriores: íleo (porção 25% distal), jejuno (55% medial), duodeno (porção 20% proximal) (BATISTA, 2019).

4.5.4 Análise histopatológica

Após a retirada do intestino delgado, a porção referente ao íleo foi lavada com solução salina 0,9%, colocada em uma superfície plana e imersa em solução fixadora de Bouin com 1,5% de ácido acético para prefixação, durante 15 minutos. Após prefixação, foram enroladas como uma espiral com a mucosa voltada para dentro, de modo a formar rolos (“swissrolls” ou rocambole). Os rolos foram fixados em formol tamponado 10% pH 7,2 por 72 horas. Na sequência, foram obtidos dois fragmentos de cada rolo, os quais foram desidratados em soluções alcóolicas de concentrações crescentes, diafanizados em xilol, embebidos e incluídos em parafina. Em seguida, foram obtidos cortes com 4 µm de espessura, corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) para análise histopatológica. As lâminas também foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para interpretação histológica de rotina. Todas as lâminas foram codificadas e observadas sequencialmente pelo mesmo patologista, que não teve acesso aos códigos. As amostras foram decodificadas somente após o laudo ter sido emitido pelo patologista. As imagens obtidas ao microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) foram transferidas por meio de vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) para um sistema de vídeo acoplado ao computador por meio do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) (PRADO *et al.*, 2020). A avaliação histopatológica foi baseada segundo os seguintes parâmetros: infiltrado inflamatório de mononucleares e polimorfonucleares (0 a 4: ausente, leve, moderado, intenso, muito intenso); arquitetura das vilosidades e criptas (0 a 2: sem alterações, perda parcial, perda total da arquitetura); edema (0 a 1: ausente, presente); erosão (0 a 3: ausente, presente, erosão e ulceração, ulceração). O escore máximo é 13 (BATISTA, 2019).

4.5.5 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A avaliação do acúmulo de neutrófilos no intestino foi realizada pelo ensaio de quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO). Os fragmentos dos tecidos armazenados a -20°C foram descongelados, pesados e homogeneizados em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M de Na₃PO₄, 0,015 M de Na₂EDTA), utilizando homogeneizador

elétrico (Power Gen 125-Fischer Scientific Pennsylvania, USA) e centrifugados a 10000 rpm por 10 min a 4°C. O precipitado foi submetido à lise hipotônica por meio da adição de mesmo volume de solução NaCl 0,2% e NaCl 1,6% com glicose 5%, após 30 segundos. As amostras foram centrifugadas novamente e o precipitado ressuspensionado em tampão Na₃PO₄ 0,05 M (pH = 5,4) com brometo hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% (p/v), seguido de homogeneização. Alíquotas de 1 mL de suspensão foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 min a 10000 rpm a 4°C e os sobrenadantes coletados. A atividade da mieloperoxidase no precipitado ressuspensionado foi determinada pela medida das alterações em densidade óptica, utilizando tetrametilbenzidina (TMB) (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM). A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm (BRADLEY *et al.*, 1982; BATISTA, 2019).

4.5.6 Determinação da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO)

A determinação do influxo de eosinófilos foi realizada conforme descrito por Strath & Sanderson, 1985. Amostras de íleo foram processadas utilizando homogeneizador elétrico (Power Gen 125-Fischer Scientific Pennsylvania, USA), seguindo a proporção de 1,9 mL de PBS (tampão fosfato-salino) para cada 100 mg de tecido para homogeneização, seguida de centrifugação em 10.000 rpm por 10 minutos. O mesmo volume de solução NaCl 0,2% e NaCl 1,6% com glicose 5%, após 30 segundos foram adicionados, para a lise de hemácias. As amostras foram centrifugadas novamente, o sobrenadante descartado e o precipitado suspenso em 1,0 ml de 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio – HTAB, em PBS. Posteriormente, esse homogenato final foi congelado três vezes em nitrogênio líquido e centrifugado a 4 °C, 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático com a adição de um montante igual de substrato (1,5 mmol/L o-fenilenodiamina e 6,6 mmol/L de H₂O₂ em 0.075 mmol/L Tris-HCl (pH 8)). A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1 M e lida na absorbância de 492 nm em espectrofotômetro.

4.5.7 Avaliação da microbiota intestinal e translocação bacteriana

Amostras de fezes, conteúdo luminal ileal, fígado e baço foram pesadas, diluídas em NaCl 0,9% (p/v) e cultivadas ágar MacConkey (HiMedia) e ágar MRS, para análise do número de unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g) de Enterobactérias e bactérias ácido-láticas, respectivamente. Os períodos de incubação foram de 24 horas para MacConkey e 48 horas para MRS.

Além disso, o conteúdo do íleo foi coletado e avaliado por método molecular quantitativo, conforme descrito por Castillo e colaboradores (2006), para detecção de bactérias da ordem enterobacteriales e de *E. coli*. O DNA total do conteúdo do íleo foi extraído com o ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (D4300S), quantificados por nanodrop e fluorômetro Qubit (ambos Thermo Fisher Scientific) e diluídos para uma concentração de 10 ng/uL. As reações de qPCR foram realizadas usando o *kit* iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos) e os *primers* gene-específicos (tabela 4). O gene 16S rDNA foi usado como referência para as normalizações (DUNIÈRE *et al.* 2015) reações foram otimizadas ajustando a concentração dos *primers* para uma especificidade e eficiência ótimas. Foram utilizadas diferentes temperaturas de anelamento para os *primers* 16S (60°C), E1 (66°C) e EC (64°C).

Tabela 4 - Pannel de primers para genes específicos para detecção de bactérias.

Grupo alvo	Símbolo	Primer	Sequência (5'-3')	Conc (nM)	Qtd. cDNA (ng)	Slope	Referência
Total de bactéria (16S rDNA)	16S	16SF	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	500	1	-3.62	Dunière <i>et al.</i> (2015)
		16SR	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT				
Enterobacteriales	E1	E1F	GGG GAT AAC YAC TGG AAA CGG TRG C	500	1	-3.255	Resendiz-Nava <i>et al.</i> , (2022)
		E1R	GCA TGG CTG CAT CAG GST TKC				
<i>E. coli</i>	EC	ECF	TGA TTG GCA AAA TCT GGC CG	500	1	-3.37	Walker <i>et al.</i> (2017)
		ECR	GAA ATC GCC CAA ATC GCC AT				

4.5.8 Quantificação relativa da expressão de moléculas no fígado

Cerca de um terço do fígado dos animais eutanasiados foi destinado a análise de citocinas (tabela 5) e moléculas envolvidas no metabolismo do TRP (tabela 6). As amostras foram armazenadas em 500 µL de trizol (Invitrogen) e armazenadas a -80°C até o seu processamento. As amostras foram maceradas, e adicionadas a 100µl de clorofórmio (MERCK) seguido de centrifugação. Após a formação de fases, em que o RNA fica na fase aquosa, essa fase foi então transferida para outro microtubo, com adição de 250 µL isopropanol (MERCK) de alta qualidade para precipitação do RNA. As amostras foram lavadas com 500 µL de etanol 70% (-20°C), ressuspendidas em 50 µL água DEPC e armazenadas em -20°C. A quantidade e a qualidade das amostras foram avaliadas em eletroforese em gel de agarose, além de análises espectrofotométricas em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), onde foram levadas em consideração as razões de absorbância 280/260 e 260/230 nm. As amostras foram tratadas com kit DNase I (Invitrogen) e livres de RNase (ThermoScientific) e seguiu-se com síntese do DNA complementar (cDNA). Esta etapa foi realizada usando 1 µg de RNA e o *kit high-capacity cDNA reverse transcription* (Applied Biosystems), de acordo com o manual do fabricante.

As reações de qPCR foram realizadas usando o *kit SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) e os *primers* gene-específicos (tabelas 5 e 6). O gene constitutivo codificador de beta-actina (*Actb*) foi usado como referência para a normalização (GIULIETTI *et al.*, 2001). As reações foram otimizadas ajustando a concentração dos *primers* para uma especificidade e eficiência ótimas. Os níveis de expressão gênica do grupo controle, sem qualquer tipo de tratamento, foram usados como calibradores e os resultados obtidos dos grupos experimentais foram apresentados graficamente como razão de quantidade (*fold change*), usando as médias e os desvios-padrões da expressão gênica dos alvos estudados, de acordo com Hellemans *et al.*, 2007 e Steinberg *et al.*, 2014.

Tabela 5 - Paineis de *primers* para genes codificadores de citocinas e gene constitutivo.

Citocina	Símbolo	Primer	Sequência (5'-3')	Conc. (nM)	Qtd. cDN A (ng)	Slope	Referência
Fator de necrose tumoral	<i>Tnf</i>	TNFF	CATCTTCTCAAAAATTTCGAGTGACA	500	5	-3.63	GIULIETTI <i>et al.</i> , 2001
		TNFR	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC				
Beta actina	<i>βact</i>	β-ActF	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	500	5	-3.56	GIULIETTI <i>et al.</i> , 2001
		β-ActR	CAATAGTGATGACCTGGCCGT				

Tabela 6 - Paineis de *primers* para genes codificadores de moléculas relacionadas ao metabolismo de triptofano.

Molécula	Símbolo	Primer	Sequência (5'-3')	Conc. (nM)	Qtd. cDN A (ng)	Slope	Referência
Aryl-hydrocarbon receptor	<i>Ahr</i>	AhrF	CCAGGACCAGTGTAGAGCAC	500	5	-3.53	SANDES <i>et al.</i> , 2019
		AhrR	AGCCATTCAGCGCCTGTAAC				
Indoleamine 2,3-dioxygenase 1	<i>Ido1</i>	Ido1F	CCTTCTGGGAATAAAACACGAGG	500	5	-3.59	DONLEY <i>et al.</i> , 2016
		Ido1R	CTAAGAAGAAAAGGAAGTTCCG				
Citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 1.	<i>Cyp1a1</i>	Cyp1a1F	CATCACAGACAGCCTCATTGAGC	500	5	-3.71	STRAUSBERG <i>et al.</i> , 2002
		Cyp1a1R	CTCCACGAGATAGCAGTTGTGAC				
Tryptophan hydroxylase 2	<i>Tph1</i>	Tph1F	ACTGCGACATCAGCCGAGAA	500	5	-3.32	HATA <i>et al.</i> , 2017
		Tph1R	CGCAGAAGTCCAGGTCAGAAATC				

4.6 Análise estatística

Foi realizado teste de normalidade para verificar se as amostras apresentavam distribuição Gaussiana. As comparações estatísticas entre as médias de cada grupo em um determinado tempo foram feitas por ANOVA “one way” seguida de pós-teste Newman-Keuls. Essa análise inclui os parâmetros avaliados a partir da eutanásia, como contagem de leucócitos, comprimento do intestino, UFCs de bactérias, MPO, EPO e qPCR, além do peso e escore clínico, quando são obtidos apenas em um tempo específico. Por outro lado, quando o peso corporal e escore clínico dos animais de diferentes grupos foram acompanhados ao

longo do tempo, utilizou-se a análise ANOVA “*two way*” seguida de pós-teste Tukey. A taxa de sobrevida foi analisada pela comparação de curvas de sobrevida “*logrank*”. Para comparação entre dois grupos, quando necessário, foi utilizado o teste “*t de student*”. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão médio. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM versão 9.0 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Análise do genoma da linhagem *W. paramesenteroides* WpK4

As informações do genoma da linhagem *W. paramesenteroides* WpK4 se encontram no domínio do NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_004214915.1/ Acesso 11/01/2023 às 11:49). Foi realizada uma busca pelas proteínas envolvidas na biossíntese do TRP codificadas por genes presentes no genoma da linhagem WpK4 e foi encontrado a presença do *operon* TRP contendo 7 genes importantes para a síntese do aa (tabela 8).

Tabela 7 - Sequências gênicas codificadoras de proteínas envolvidas na síntese do TRP presentes no genoma de *W. paramesenteroides* WpK4.

Proteína	Locus	Função (atividade catalítica)	Proteínas em WpK4 (código de acesso)
Triptofano sintase subunidade α	<i>trpA</i>	Glicerol-3-fosfato + L -serina \rightarrow	WP_131473291.1
Triptofano sintase subunidade β	<i>trpB</i>	D -gliceraldeído 3-fosfato + H ₂ O + L -triptofano	WP_131473292.1
Fosforibosil antranilato isomerase	<i>trpF</i>	N-(5-fosfo- β -D-ribosil) antranilat o \rightarrow 1-(2-carboxifenilamino) -1-desoxi-D-ribulose 5-fosfato	SGAX01000001.1
Indol-3-glicerol fosfato sintase	<i>trpC</i>	(2-carboxifenilamino) -1-desoxi-D-ribulose 5-fosfato + H ⁺ \rightarrow Glicerol 3-fosfato + CO ₂ + H ₂ O	WP_131473294.1
Antranilato fosforibosil transferase	<i>trpD</i>	Difosfato + N- (5-fosfo- β -D-ribosil) antranilato \rightarrow 5-fosfo- α -D-ribose 1-difosfato + antranilato	WP_131474174.1
N-metil-L-Triptofano oxidase	<i>solA</i>	H ₂ O + N α -metil- L-triptofano + O ₂ \rightarrow Formaldeído + H ₂ O ₂ + L-triptofano	WP_131474217.1
Triptofano - tRNA ligase	<i>trpS</i>	ATP + L-triptofano + tRNA ^{TRP} \rightarrow AMP + difosfato + H ⁺ + L-triptofanil-tRNA ^{TRP}	WP_002828703.1

Obs.: Genes do *operon* TRP ausentes: *trpR*, *trpL* e *trpE*

Apesar da ausência de genes relacionados a regulação do *operon* TRP (*trpR* e *trpL*), verificamos a presença do gene codificador do domínio de proteína PRD, responsável pela regulação de *operons* catabólicos em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ([SGAX01000001.1](#), Acesso 12/01/2023 às 15:24).

Investigamos as sequências de aa das enzimas responsáveis pela degradação do TRP em moléculas sinalizadoras do AhR. Muitas das enzimas investigadas foram anotadas por outro nome no domínio do NCBI, sendo assim elas foram encontradas pelo nome sugerido na busca de grupos de proteínas idênticas. Apenas uma enzima foi encontrada sem a necessidade de buscar por outros nomes anotados no domínio *proteinbank*, a aldeído desidrogenase (ALD). As sequências de aa alinhadas com o banco de dados do NCBI com identidade maior que 30% e *e-value* menor que 10^{-7} estão apresentadas na tabela 9.

Tabela 8 - Sequências gênicas codificadoras de proteínas envolvidas no catabolismo do triptofano contidas no genoma de *W. paramesenteroides* WpK4.

Genes	Grupos de proteínas idênticas	Função	Id (%)	<i>e-value</i>	Proteínas em WpK4 (código de acesso)
<i>AraT</i>	Pridoxal phosphate-dependent aminotransferase	TRP → IPYA	99.7	6.40^{-220}	WP_131473747.1
	ou		99.7	2.7^{-226}	WP_131474084.1
	Aminotransferase class I/II-fold pyridoxal phosphate-dependent enzyme		99.0	7.7^{-218}	WP_131474131.1
<i>Ald</i>	Aldehyde dehydrogenase	IAAld → AIA*	81.9	8.8^{-219}	WP_131473597.1
<i>AST</i>	Aspartate aminotransferase family protein	AIA* → IAld*	99	2.70^{-226}	WP_131473455.1
<i>FidH</i>	2-hydroxyacid dehydrogenase ou lactate dehydrogenase	IPYA ↔ ILA*	59	8.8^{-37}	WP_131473616.1
<i>FldBC</i>	3-hydroxyacyl-ACP dehydratase FabZ	ILA → IAcrA*	100	2.8^{-76}	WP_002827591.1
			100	1.1^{-80}	WP_040760323.1

Moléculas ligantes do receptor AhR estão marcadas com *.

As sequências de aa da linhagem *W. paramesenteroides* WpK4 não alinhadas com as sequências disponíveis no banco de dados foram *Tryptophanase* (TNA), Idoleamine 2,3 dioxigenase (IDO), *Tryptophan 2 monooxygenase* (TMO), *Indole acetamide hydrolase* (IAAH), *Indole pyruvate decarboxylase* (IPDC), *Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase* (AAD), *Pyruvate ferroxidase B and C* (PORB, C) e *Acetyl coA dehydrogenase* (ACDA).

Após a análise das proteínas envolvidas no catabolismo do TRP e a análise do genoma de *W. paramesenteroides* WpK4, elaborou-se uma proposta das possíveis vias metabólicas utilizadas por *W. paramesenteroides* WpK4 e as limitações de cada via, devido à ausência de sequências codificantes para certas enzimas do catabolismo (figura 6). Com os dados obtidos

até aqui, a única via completa possível para a linhagem WpK4 seria a via IPYA-IAcrA (figura 6A). Na via IPYA-IAAld não foi verificado a presença da informação gênica codificante de *ipdC*, no entanto a produção de IAAld poderia acontecer pela via TSO, com consequente produção de AIA e, IAld (figura 6B). A via TSO, é responsável pela conversão do TRP diretamente em IAAld (sem sintetizar IPyA), catalisada por uma monooxigenase de cadeia lateral de TRP. Apesar de ser uma via rara em bactérias, não podemos descartar a hipótese de que a WpK4 seja capaz de realizá-la.

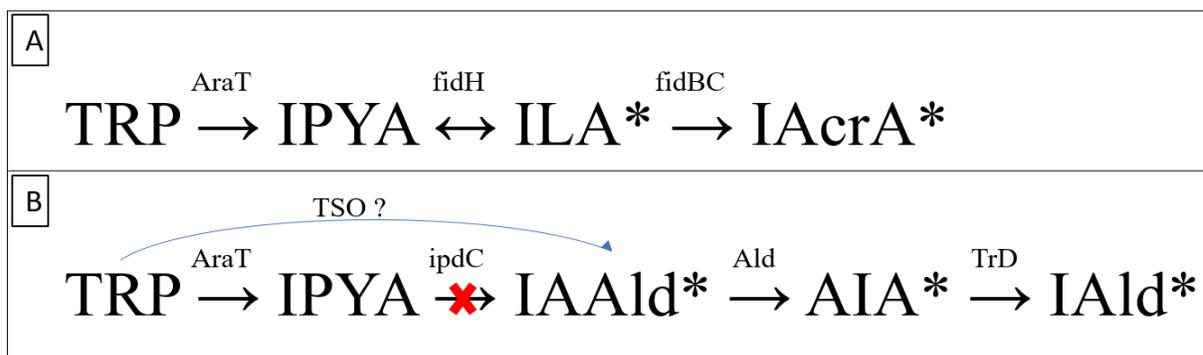
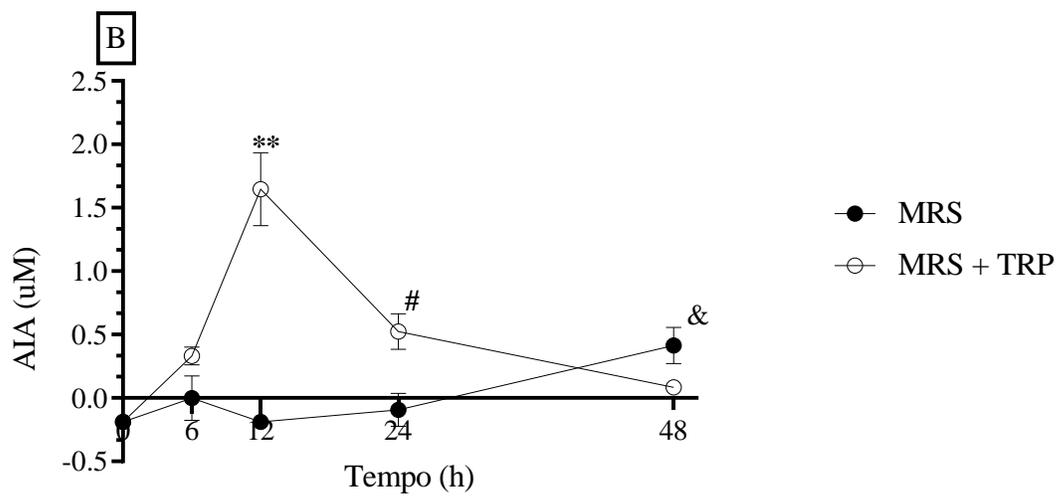
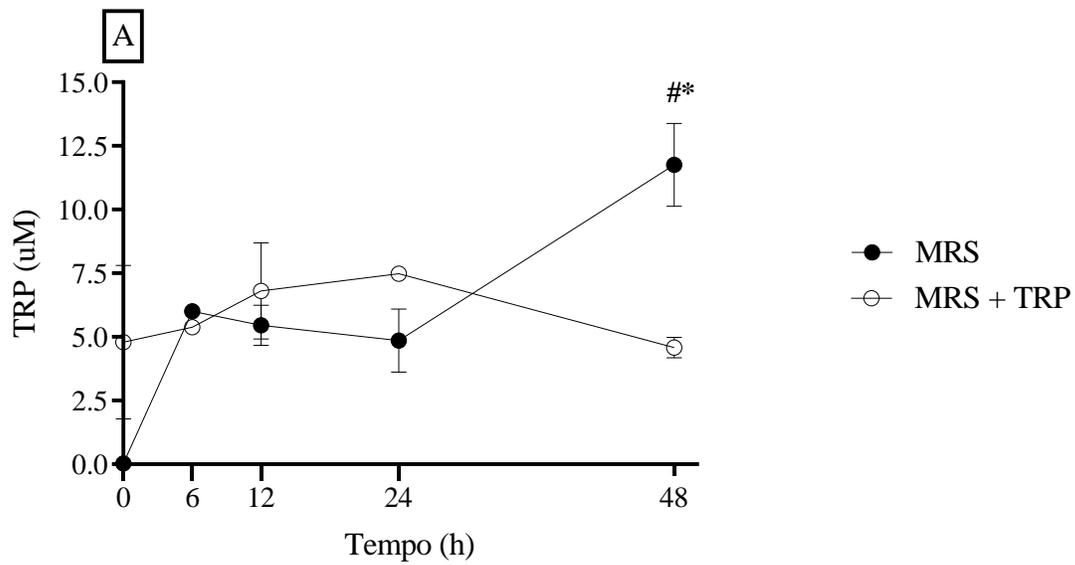
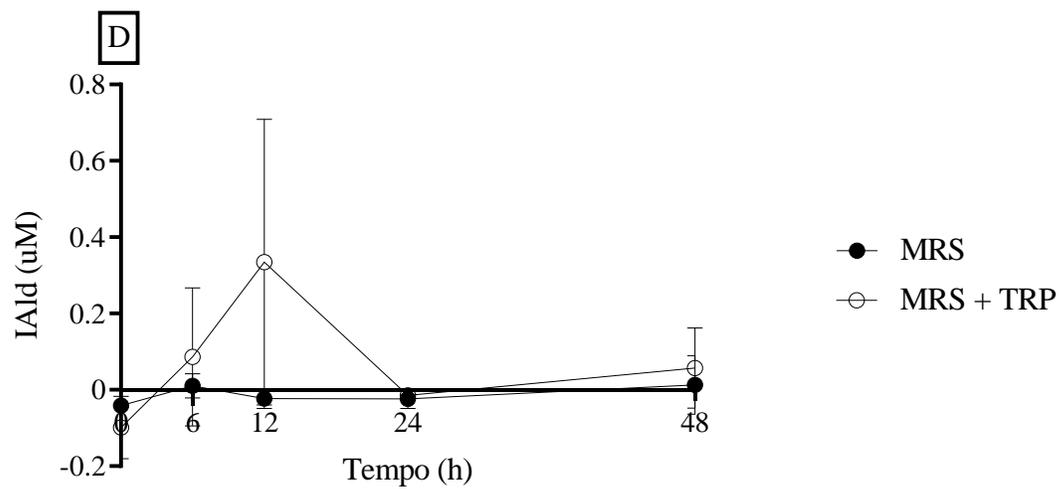
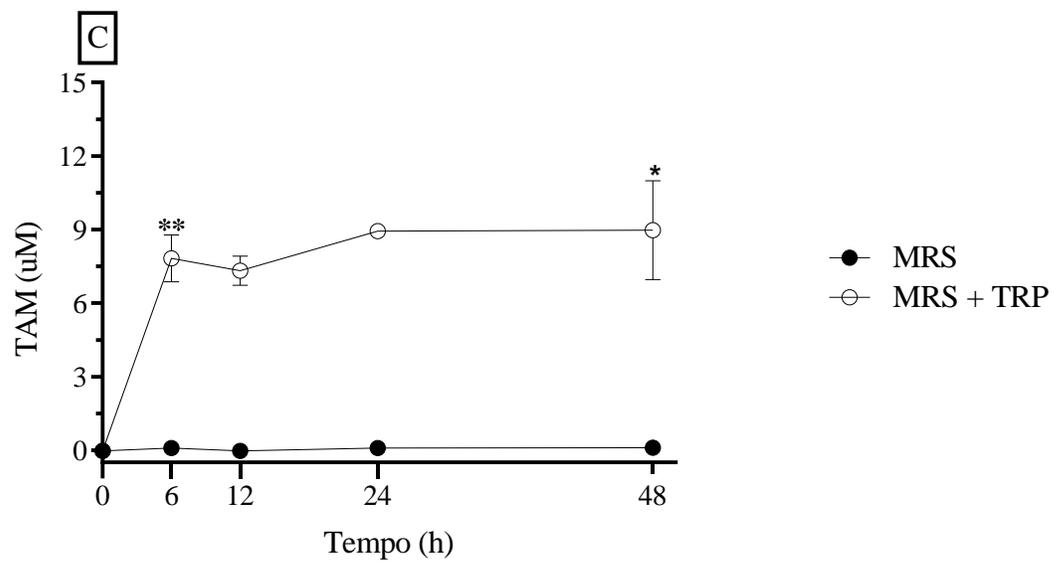


Figura 6 - Possíveis vias do catabolismo do TRP em *W. paramesenteroides* WpK4, de acordo com a presença ou ausência da sequência de aminoácidos para cada enzima. *Significa metabólitos capazes de se ligar ao receptor AhR.

5.2 Avaliação da produção de TRP e seus metabólitos por *W. paramesenteroides* WpK4 *in vitro*.

Após análise dos sobrenadantes do cultivo de WpK4 em caldo MRS e caldo MRS suplementado com TRP, nos diferentes tempos, foi detectada a presença de TRP (figura 7A), AIA (figura 7B), TAM (figura 7C) e IAld (figura 7D).





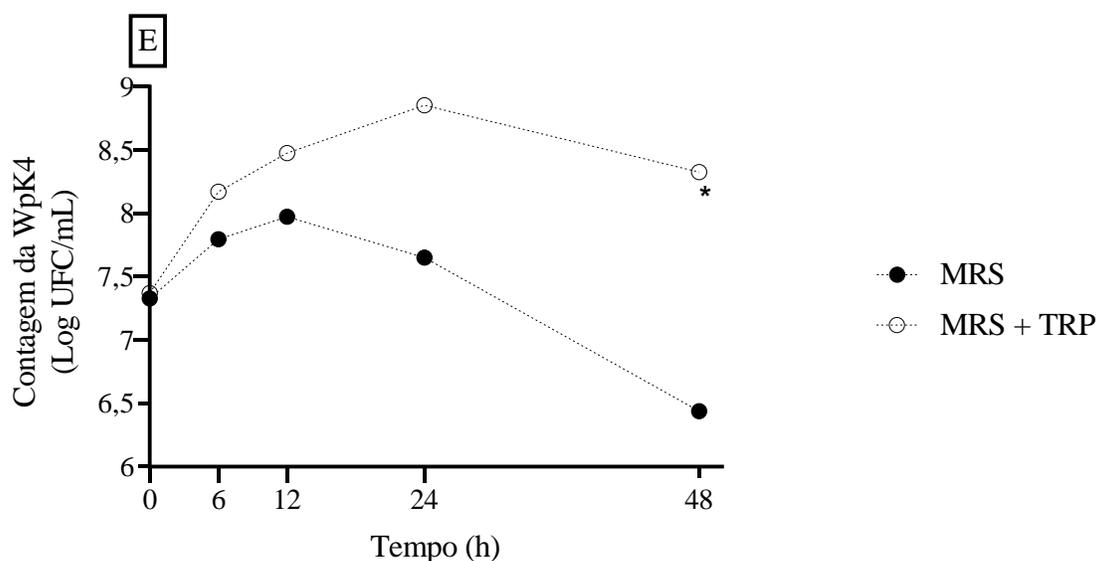


Figura 7 - Dosagem de metabólitos no sobrenadante de WpK4 por HPLC-UV: triptofano (A), ácido indol-3-acético (B) triptamina (C), ácido indol-3-aldeído (D) e curva de crescimento da bactéria (E). Os resultados de concentração foram expressos em média \pm desvio padrão (μ M). Em (A), valores estatisticamente diferentes estão representados pelos símbolos: * $p = 0,0095$ quando comparados ao tempo 0h na mesma condição e # $p = 0,0263$ comparado ao tempo 48h em meio MRS. Em (B) houve diferença significativa (& $p = 0,0279$; ** $p = 0,0088$; # $p = 0,0123$) quando comparado ao tempo 0h de incubação na mesma condição. Em (C) O símbolo ** significa diferença estatisticamente significativa quando foi comparado ao tempo 0h de incubação em meio suplementado com TRP ($p = 0,0073$). (E) Os resultados de crescimento microbiano foram apresentados como Log UFC/mL, na qual a análise da área sob a curva foi realizada, e a diferença significativa entre os dois meios de culturas testados foi expressa pelo símbolo * $p = 0,0209$.

Na figura 7E, foi apresentado a curva de crescimento de WpK4 a fim de demonstrar os estágios do crescimento microbiano nos diferentes meios testados em relação à concentração dos metabólitos. Em MRS, a linhagem entra em fase de morte celular aproximadamente com 24 h, enquanto em MRS+TRP no mesmo tempo, o crescimento microbiano parece estar estacionário. A produção de TRP foi observada no meio MRS (Figura 7A) a partir do tempo 6 h de incubação (em média $6,01 \mu$ M), com um aumento significativo no tempo 48 h (em média $11,75 \mu$ M, * $p = 0,0095$). Em meio suplementado com o aa, os níveis de TRP (5μ M) se mantêm estáveis até 24 h e há redução no tempo 48 h (em média $4,58 \mu$ M, # $p = 0,0263$), sugerindo consumo de TRP pelo microrganismo. A produção de ácido-3-indolacético (AIA) (Figura 7B) em MRS+TRP no tempo 12 h e 24 h foi estatisticamente maior que no tempo 0 h no mesmo meio (em média $1,645 \mu$ M, # $p = 0,0123$; $0,52 \mu$ M, ** $p = 0,0088$), porém não foi detectado tal metabólito no tempo 48 h. Em caldo MRS puro, foi possível observar uma

produção tardia de AIA no tempo 48 h (0,41 uM, * $p = 0,0279$) comparado ao tempo 0 h. Apenas em MRS + TRP, foi possível observar a produção de triptamina (TAM) a partir do tempo 6 h, permanecendo constante até 48 h de incubação (em média 7,49 uM, ** $p = 0,0073$). Assim como a TAM, IAId foi produzido apenas em MRS suplementado, a partir de 6 h de incubação, apresentando um pico de produção em 12 h (em média 0,33 uM), valor este não estatisticamente diferente quando comparado ao tempo 0 h. Provavelmente a concentração de TRP do meio foi suficiente para silenciar o *operon* TRP e desencadear o catabolismo do TRP.

5.3 Avaliação da sobrevivência dos animais após indução da mucosite

Foram realizados dois experimentos de indução de mucosite com animais de diferentes idades (quatro e oito semanas). Já foi demonstrado anteriormente por Batista (2019) e Marchiori (2020), que animais de oito semanas desenvolvem mucosite intestinal com taxa de sobrevivência de 50% após receberem três doses diárias de 75 mg/kg de 5-FU (Fauldfluor®). Levando-se em consideração que o início da colonização da microbiota é marcado por baixa diversidade e grande instabilidade, utilizamos animais de quatro semanas, recém-desmamados, para avaliar se haveria mudança na taxa de sobrevivência à mucosite intestinal induzida nas mesmas condições.

No entanto, foi observado que todos os animais de quatro semanas sobreviveram após a indução da mucosite (figura 8A). Por outro lado, de forma similar ao encontrado por outros autores, 40% dos animais de oito semanas, tratados com salina, sucumbiram após a administração de 5-FU (figura 8B). A administração diária da linhagem WpK4, com início 10 dias antes da indução da mucosite (pré-tratamento – PT) ou com início concomitante à administração do quimioterápico (CC) não resultou em nenhuma alteração significativa no padrão de sobrevivência dos animais de quatro semanas (figura 8A). Nos animais de oito semanas, foi observada uma taxa de sobrevivência de 100% para o grupo que recebeu 10^8 UFC de WpK4 diariamente, com início dez dias antes da administração de 5-FU e de 50% para o grupo controle (salina 0,9% + 5-FU), assim como demonstrado por MARCHIORI (2020).

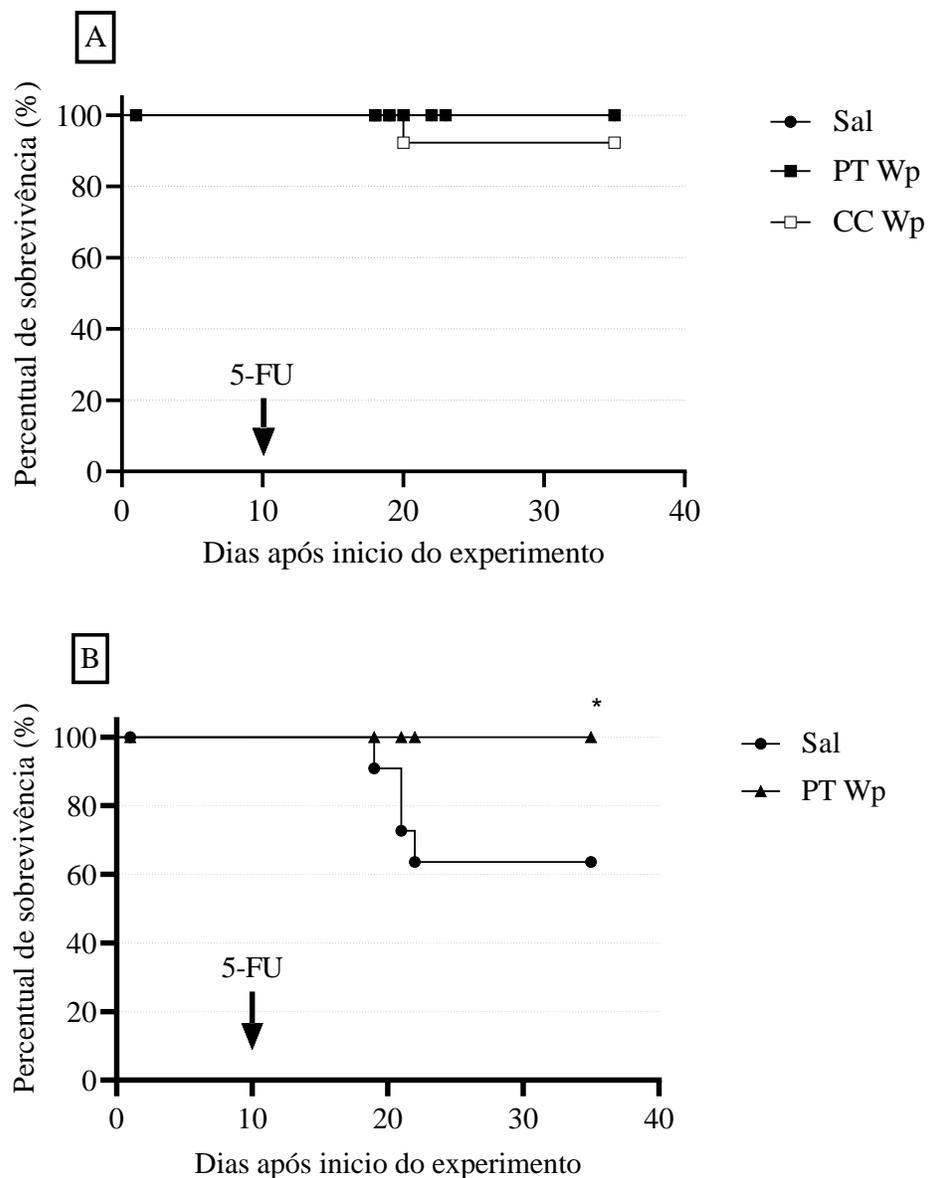


Figura 8 - Curva percentual de sobrevivência de camundongos com (A) quatro e (B) oito semanas, tratados ou não com *W. paramesenteroides* WpK4, após indução de mucosite intestinal com 75 mg/kg/3dias de 5-FU. Sal = Controle com administração prévia de salina 0,9%. PT Wp= administração prévia de WpK4 (início 10 dias antes da primeira dose de 5-FU). CC Wp= administração concomitante de WpK4 (início no dia da primeira dose de 5-FU). * Diferença estatisticamente significativa entre o percentual de sobrevivência do grupo controle (salina 0,9%) e o grupo tratado previamente com WpK4 ($p = 0.0161$) ($n = 11$).

Apesar da ausência de significância entre os valores do escore clínico, houve um aumento discreto dos sinais clínicos observados em todos os grupos com mucosite induzida, após 5 dias; e uma melhora desses sinais após 10 dias, tanto em animais com quatro como com oito semanas (Figura 9). Em animais de quatro semanas, o grupo com mucosite que recebeu salina 0,9%,

apresentou uma tendência de aumento discreto no escore clínico, no 5º dia após início da indução, que o grupo que recebeu *W. paramesenteroides* WpK4 como pré-tratamento (PT), ou seja, esse microrganismo pareceu atenuar os sinais clínicos observados após indução da mucosite intestinal (figura 9A). Camundongos de quatro semanas que receberam WpK4 concomitante à quimioterapia apresentaram escore clínico semelhante ao grupo controle e mortalidade de 10%. Por esse motivo, esse tratamento foi excluído dos ensaios com animais de oito semanas. No escore clínico do 5º dia após o desafio de animais com oito semanas, o grupo tratado previamente com *W. paramesenteroides* WpK4 também apresentou uma atenuação discreta não significativa dos sinais clínicos quando comparado ao grupo controle (figura 9B).

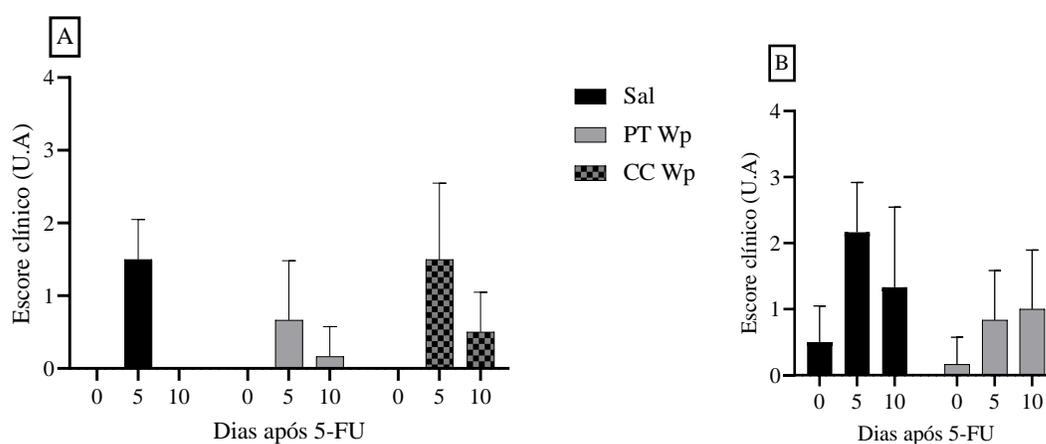


Figura 9 - Avaliação do escore clínico de animais com (A) quatro e (B) oito semanas, tratados ou não *W. paramesenteroides* WpK4, após indução de mucosite intestinal com 75 mg/kg/3dias de 5-FU. Sal = controle com administração prévia de salina 0,9%. PT Wp = administração prévia de WpK4 (início 10 dias antes da primeira dose de 5-FU). Sal = administração concomitante de WpK4 (início no dia da primeira dose de 5-FU). Os animais (n = 6/grupo) foram avaliados quanto ao escore clínico da doença nos tempos 0, 5 e 10 dias após o início da administração de 5-FU (75 mg/kg/3dias; i.p). Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão.

Em relação ao peso (figura 10), foi observado o mesmo comportamento nos animais com quatro e oito semanas, onde observou-se que até o 10º dia houve um ganho de peso e depois da primeira dose de 5-FU, todos os grupos apresentam queda significativa do peso (indicado por seta vermelha), inclusive os grupos tratados. Todos os grupos recuperaram a média de peso após o 5º dia de indução.

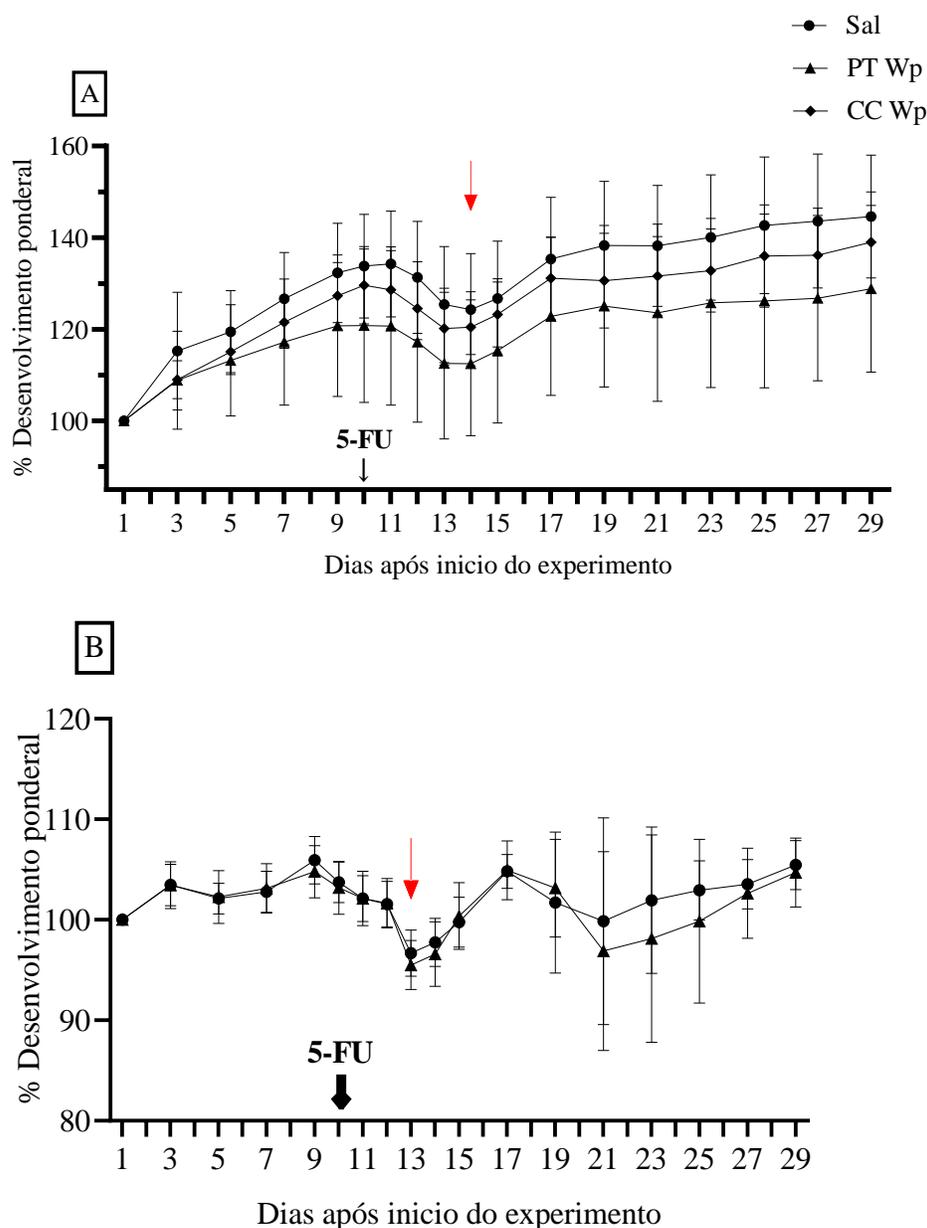


Figura 10 - Avaliação do desenvolvimento ponderal (n = 11/grupo) em animais com (A) quatro e (B) oito semanas tratados ou não com *W. paramesenteroides* WpK4, após indução de mucosite intestinal com 75 mg/kg/3dias de 5-FU. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. (A) A média geral dos pesos dos grupos pré tratados (PT Wp) e tratamento concomitante (CC Wp) com *W. paramesenteroides* WpK4 foram estatisticamente iguais quando comparados ao grupo controle (Sal) administrado apenas com salina 0,9%. (B) A média geral dos pesos entre os grupos pré tratados com *W. paramesenteroides* WpK4 foram estatisticamente iguais quando comparados ao grupo controle (Sal) administrado apenas com salina 0,9%. Setas vermelhas indicam a queda de peso após desafio com 5-FU.

Levando-se em consideração o impacto da administração de WpK4 sobre a sobrevivência dos animais de oito semanas, decidimos dar continuidade às análises da mucosite intestinal apenas com animais dessa idade.

Em experimento subsequente, no quinto dia após início da administração de 5-FU, os animais apresentaram sinais clínicos de mucosite intestinal como perda de peso, alteração da consistência fecal, presença de sangue oculto nas fezes quando comparados aos animais que não receberam o quimioterápico, tratados ou não com WpK4 (figura 11). Apesar da ausência de significância entre os grupos experimentais, os camundongos que receberam 5-FU e foram tratados com WpK4 apresentaram sinais clínicos discretamente atenuados quando comparados ao grupo com mucosite e tratado com salina 0,9% (figura 11). Oito dias após início da indução da mucosite, os animais que receberam WpK4 também apresentaram escore clínico discretamente menor que os animais tratados com salina 0,9% (figura 11).

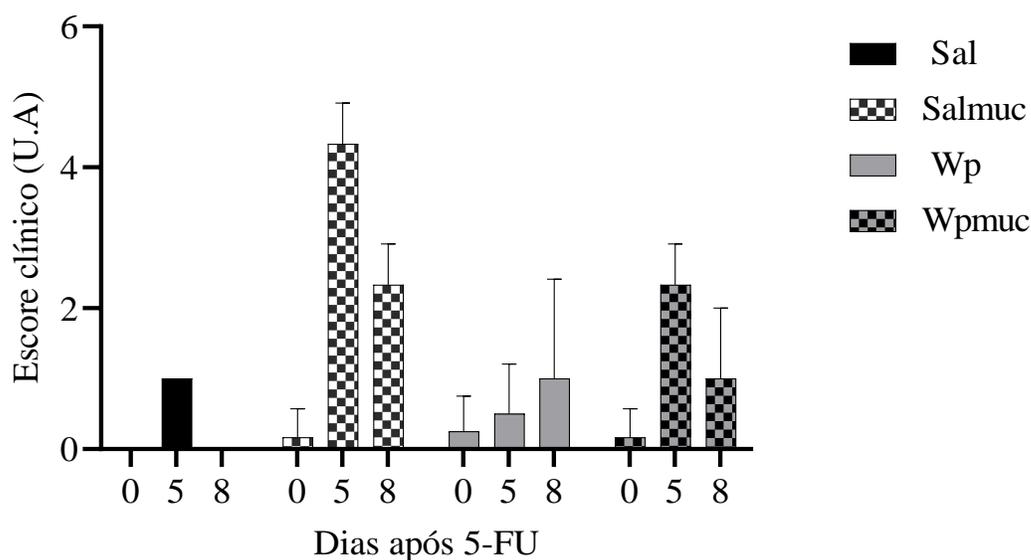


Figura 11 - Avaliação do escore clínico da mucosite intestinal em animais tratados ou não com *W. paramesenteroides* WpK4 e eutanasiados com cinco dias ou oito dias após o início administração de 75 mg/kg/dia de 5-FU. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. (n= 4-6/grupo).

Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos ao avaliar a área sob a curva do desenvolvimento ponderal, é possível observar que os grupos com mucosite intestinal apresentaram uma perda de peso progressiva (indicada por seta vermelha) a partir da primeira dose de quimioterápico, no 10º dia, até o 14º (figura 12A) e posterior recuperação gradual do peso indicado com seta azul (figura 12B).

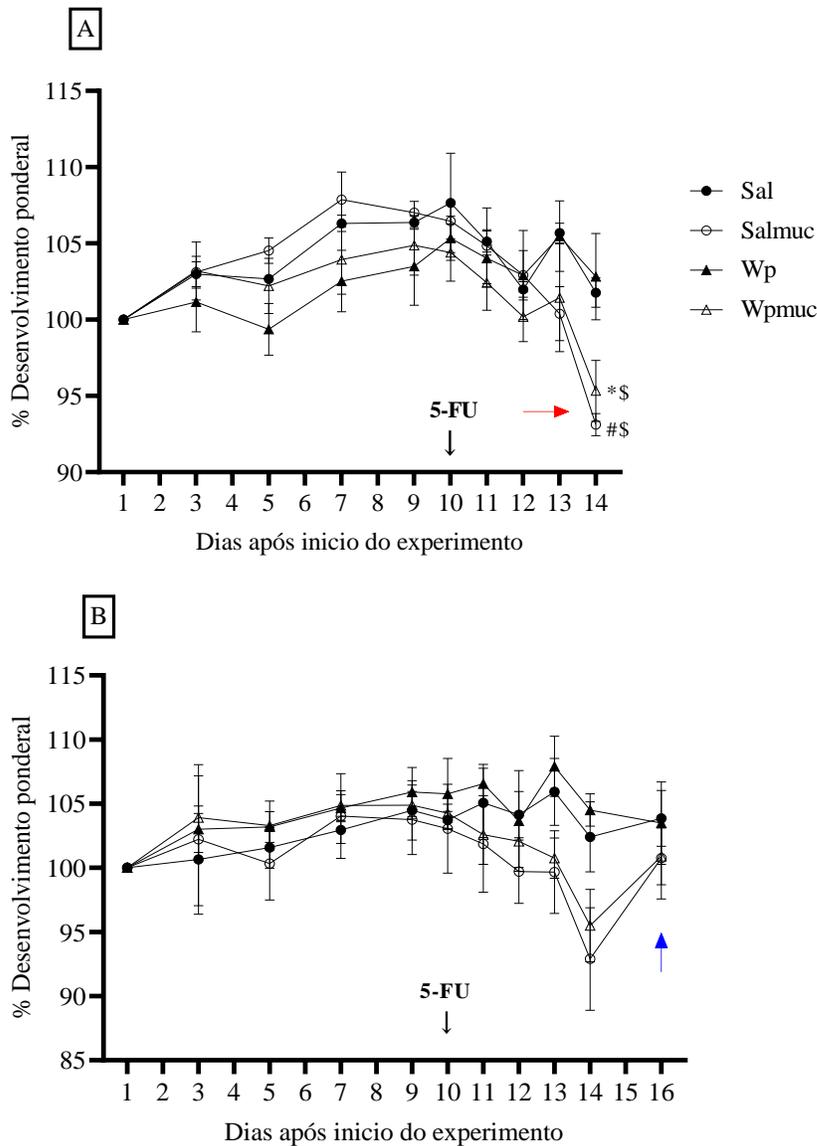


Figura 12 - Avaliação do desenvolvimento ponderal em animais tratados ou não com *W. paramesenteroides* WpK4 e eutanasiados no (A) quinto e (B) oitavo dia após início da administração de 75 mg/kg/dia de 5-FU. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. Os símbolos representados por # ($p < 0,0001$) ou * ($p = 0,0019$) representam diferenças significativas entre o peso do 14º dia com o do 1º dia para o mesmo grupo. \$ ($p < 0,0001$) representa diferença estatisticamente significativa entre o peso do 14º dia com o do 10º dia para o mesmo grupo em ($n = 4-5$).

6. Análise do comprimento intestinal dos animais após indução da mucosite

No quinto dia houve uma redução discreta do comprimento intestinal no grupo tratado com WpK4 + 5-FU (média 29,74 cm) quando comparado ao grupo controle WpK4 (média

33,79 cm) (Figura 13A). Não houve redução do comprimento do intestino delgado (Figura 13B) no oitavo dia em nenhum dos grupos com mucosite intestinal.

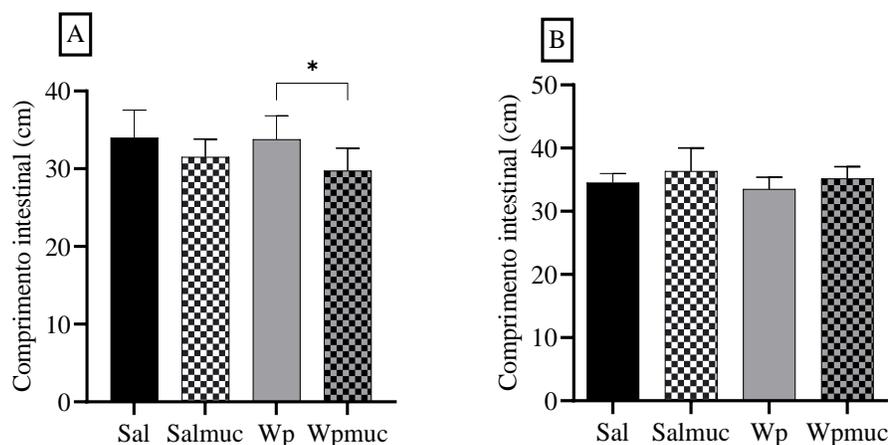


Figura 13 - Avaliação do comprimento intestinal em animais tratados ou não com *W. paramesenteroides* WpK4 e eutanasiados no (A) quinto e (B) oitavo dia após início da administração de 75 mg/kg/dia de 5-FU. * significa diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0174$). (n = 9-10/grupo).

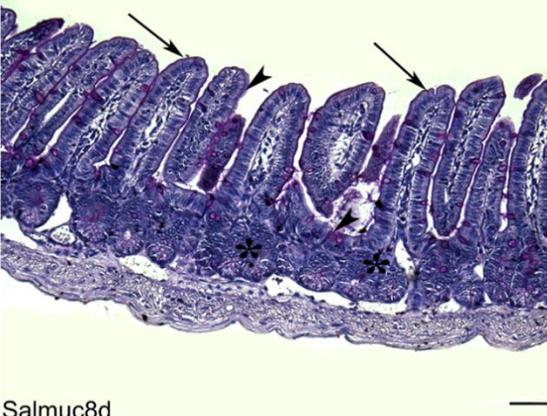
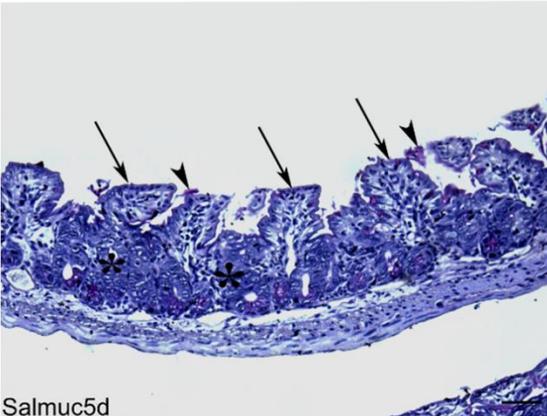
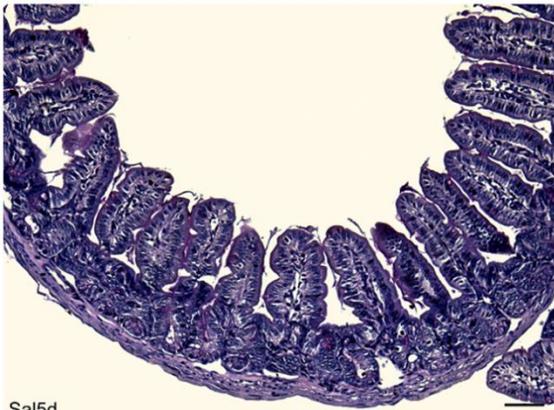
7. Análise dos parâmetros histopatológicos dos animais após indução da mucosite

Para análise histopatológica, amostras de íleo foram coletadas e coradas com PAS (figura 14) ou H&E (figura 15). Na figura 14A, é possível observar que os grupos controles, sem mucosite, estão com os aspectos histológicos normais. Tanto o grupo controle WpK4 quanto WpK4 com mucosite possuem áreas PAS⁺ aumentadas em relação aos grupos que receberam salina. Esse aumento da área de muco (PAS⁺) ocorreu no quinto e oitavo dia após indução de mucosite com 5-FU (figura 14B). No quinto dia, houve mudanças significativas dos grupos com mucosite intestinal, apresentando vilosidades encurtadas e hiperplasia de criptas, no oitavo dia notou-se uma recuperação histopatológica desses grupos (figura 14A). No oitavo dia foi observado um restabelecido da altura das vilosidades, em especial no grupo com mucosite tratado com WpK4. Houve um aumento significativo da altura das criptas nos grupos com mucosite intestinal, tratados com salina e WpK4, com 5 dias em relação ao grupo salina controle (figura 14D). No oitavo dia, os animais com mucosite tratados com WpK4 apresentaram um aumento estatisticamente significativo da altura de criptas, quando comparado ao grupo salina controle (sem mucosite). A razão entre vilosidade e cripta,

demonstrou-se diminuída nos grupos com mucosite tratado com salina e WpK4 no quinto dia (figura 14E).

Como esperado, não foram observadas lesões nos grupos controles, sem mucosite intestinal (figura 15A). O escore histopatológico dos grupos com mucosite tratado com salina ou WpK4 apresentaram pontuações não significativas entre eles, classificando em leves os danos causados pelo 5-FU (Figura 15B). Interessantemente, houve um aumento no infiltrado inflamatório ($p = 0,026$) no grupo Wpmuc5d quando comparado ao grupo controle WpK4 (Figura 15C).

A



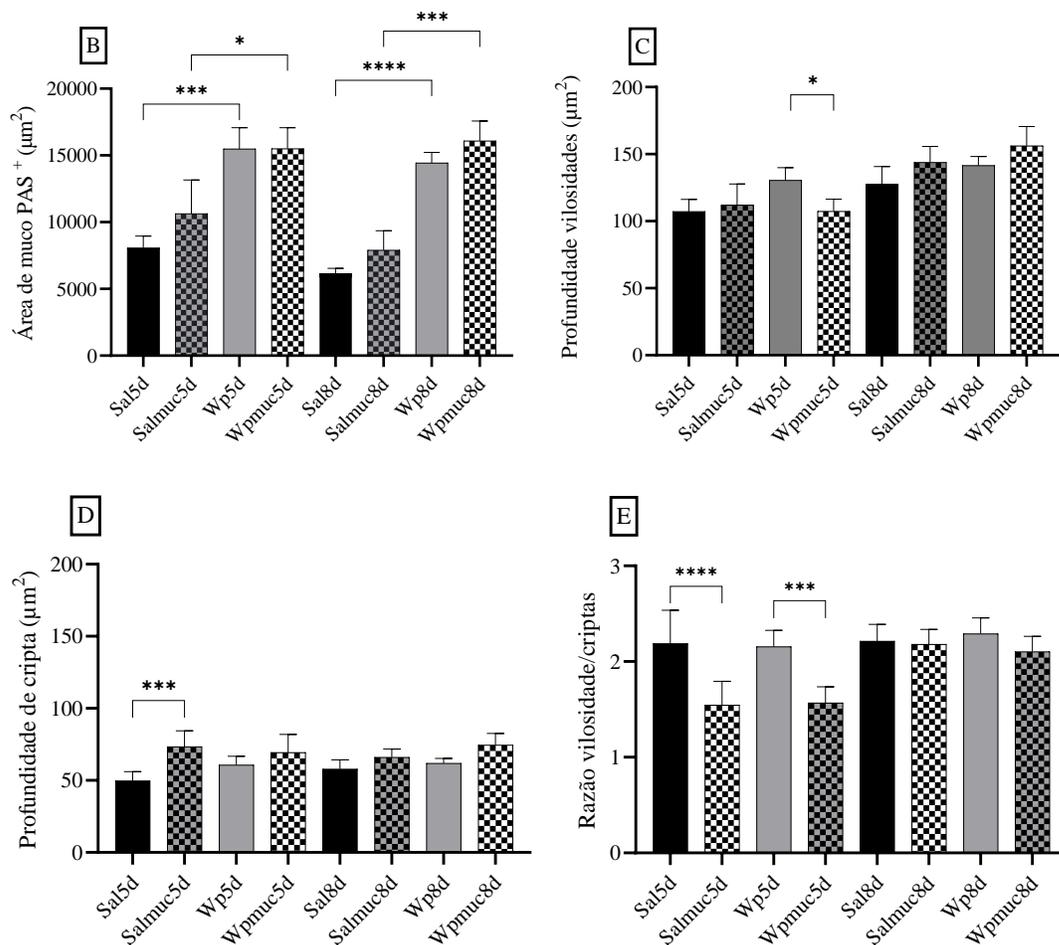


Figura 14 – (A) Histopatologia do íleo de camundongos C57/BL4J dos grupos Sal5d, Wp5d, Salmuc5d, Salmuc8d, Wpmuc5d e Wpmuc8d: Sal5d íleo com aspecto histológico normal. Wp5d: notar o aumento das áreas PAS⁺ (cabeças de setas). Salmuc5d: vilosidades encurtadas (setas), hiperplasia de criptas (*) e redução de áreas PAS⁺ (cabeças de seta). Wpmuc5d: aumento das áreas PAS⁺ (cabeças de setas) e vilosidades encurtadas (setas). Salmuc8d: parede intestinal de aspecto histológico normal, demonstrando a regeneração das vilosidades (setas), hiperplasia de criptas (*) e áreas PAS⁺ normais (cabeças de seta). Wpmuc8d: hiperplasia de criptas (*), vilosidades regeneradas (setas) e aumento das áreas PAS⁺ (cabeças de setas). Ácido periódico de Schiff (PAS). Barra = 50 µm; **(B) Área de muco PAS⁺ na mucosa do íleo de camundongos C57/BL4J dos grupos Sal5d, Salmuc5d, Salmuc8d, Wp5d, Wpmuc5d e Wpmuc8d.** Sal5d vs. WP5d: ***P=0,0003; Sal5d vs. WPmuc5d: ***P=0,0008; Salmuc5d vs. WPmuc5d: *P=0,0317. Sal8d vs. WP8d: ****P<0,0001; Sal8d vs. WPmuc8d: ***P=0,0003; Salmuc8d vs. WP8d: *P=0,0008; Salmuc5d vs. WPmuc8d: *P=0,0004. **(C) Altura de vilosidade da mucosa do íleo de camundongos C57/BL4J dos grupos Sal5d, Salmuc5d, Salmuc8d, Wp5d, Wpmuc5d e Wpmuc8d.** Sal5d vs. WP5d: *P=0,0226; Wp5d vs. WPmuc5d: *P=0,0231; Sal8d vs. WPmuc8d: **P=0,0024. **(D) Altura de cripta da mucosa do íleo de camundongos C57/BL4J dos grupos Sal5d, Salmuc5d, Salmuc8d, Wp5d, Wpmuc5d e Wpmuc8d.** Sal5d vs. Salmuc5d: ***P=0,0002; Sal5d vs. WPmuc5d: **P=0,0022; Sal8d vs. WPmuc8d: *P=0,0156. **(E) Relação entre criptas e vilosidades intestinais em camundongos C57/BL4J dos grupos Sal5d, Salmuc5d, Salmuc8d, Wp5d, Wpmuc5d e Wpmuc8d.** Sal5d vs. Salmuc5d: ****P=0,0001; Sal5d vs. WPmuc5d: ***P=0,0001; Wp5d vs. WPmuc5d: ***P=0,0004; Salmuc5d vs. WP5d: ***P=0,0002.

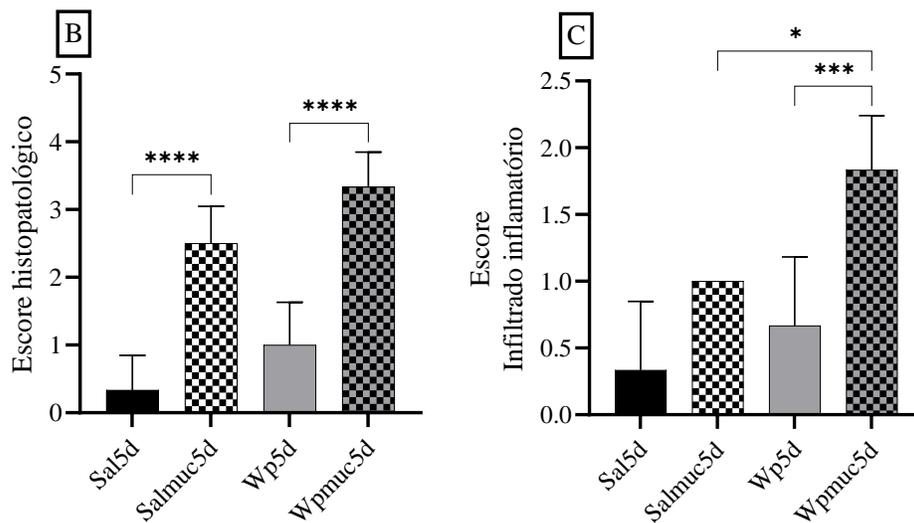
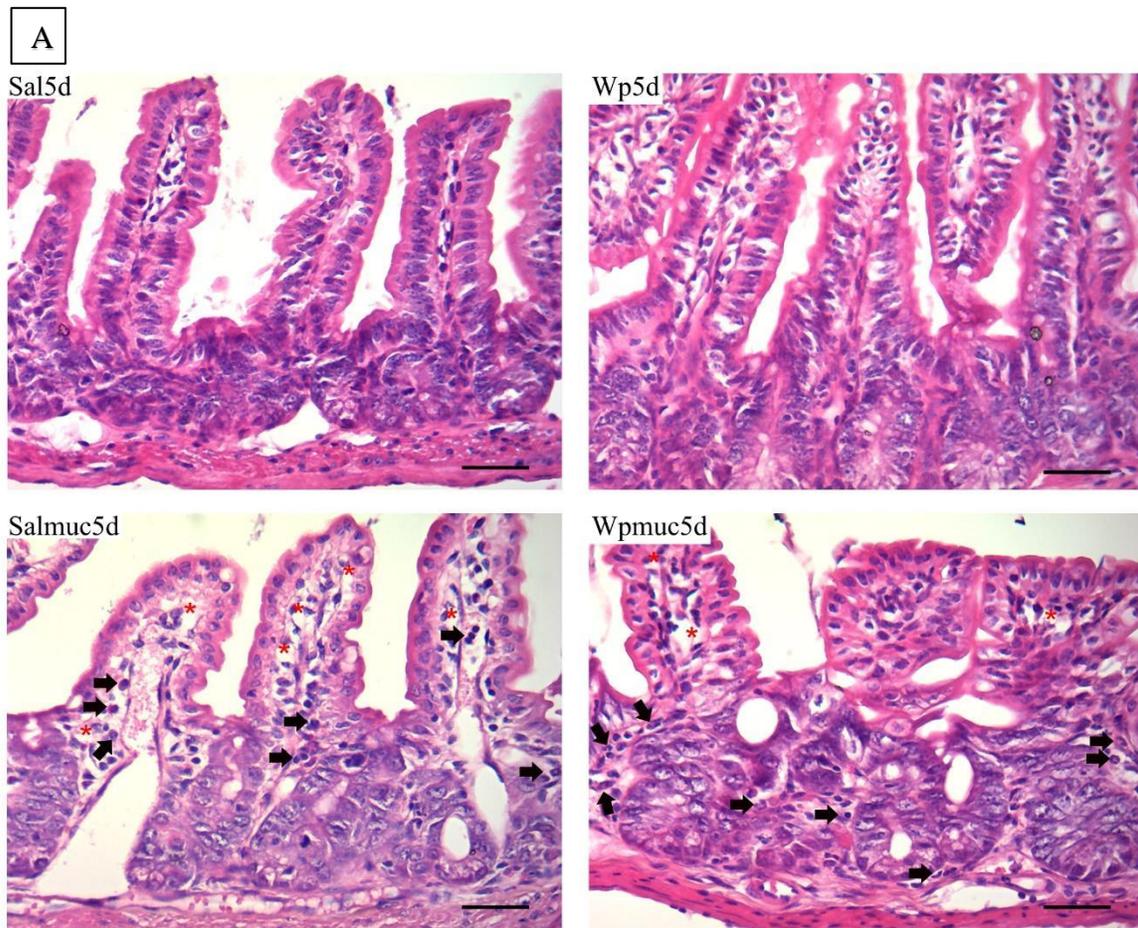


Figura 15 - (A) Histopatologia do íleo de camundongos C57/BL4J dos grupos Sal5d, Wp5d, Salmuc5d, Wpmuc5d: Sal5d íleo com aspecto histológico normal. Wp5d íleo com aspecto histológico normal. Salmuc5d: íleo com áreas de edema e infiltrados inflamatório discreto. Wpmuc5d: íleo com áreas de edema e infiltrados inflamatório discreto. Asteriscos vermelhos indicam área de edema; setas pretas apontam células inflamatórias. (H&E). Barra = 50 μ m; (B) Escore da lesão histológica do íleo de camundongos C57/BL4J

dos grupos Sal5d, Wp5d, Salmuc5d e Wpmuc5d. **** $P < 0,001$. (C) Escore do infiltrado inflamatório do íleo de camundongos C57/BL4J dos grupos Sal5d, Wp5d, Salmuc5d e Wpmuc5d. **** $P < 0,001$; *** $P = 0,005$; * $P = 0,05$.

8. Avaliação dos parâmetros imunológicos sistêmicos dos animais após mucosite intestinal

Em geral, o tratamento com a bactéria não melhorou os parâmetros imunológicos. Houve leucopenia no quinto dia após o início do uso do quimioterápico para ambos os grupos (tratado ou não tratado com WpK4), apresentando uma variação significativa quando comparados aos respectivos controles sem mucosite (figura 16A). Entretanto, no oitavo dia, foi observado uma restauração dos valores de leucócitos circulantes nos grupos com mucosite tratado com salina e WpK4 (figura 16B). No quinto dia após a indução da mucosite intestinal houve um aumento significativo da atividade da enzima MPO, marcador indireto do infiltrado de neutrófilos, nos grupos com mucosite tratados com salina ou WpK4, quando comparados ao grupo controle. No oitavo dia, no entanto, os níveis de MPO foram restabelecidos aos níveis fisiológicos (figura 17A). Com relação ao número de eosinófilos pelo ensaio de EPO, não houve diferença significativa entre os grupos, apesar do aumento discreto nos grupos com mucosite no 5º dia (figura 17B).

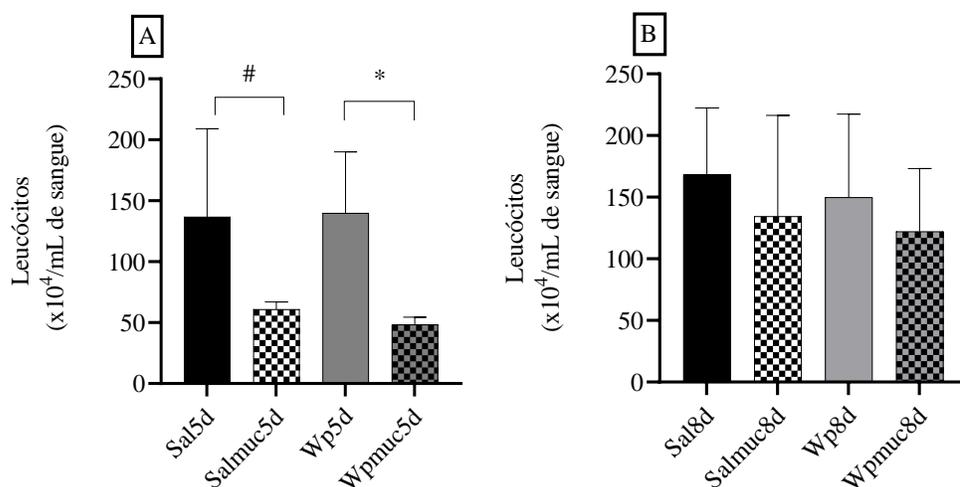


Figura 16 - Contagem total de leucócitos no sangue de animais com e sem mucosite, tratados com salina ou WpK4. (A) Animais eutanasiados no quinto ou (B) oitavo dia após início da administração de 75 mg/kg/dia de 5-FU. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n = 10-11/grupo). # significa diferença estatisticamente significativa dos valores de leucócitos $\times 10^4$ /mL de sangue entre o grupo com e sem

mucosite, tratado com salina ($p = 0,0011$), * significa diferença estatisticamente significativa dos valores de leucócitos $\times 10^4/\text{mL}$ de sangue entre o grupo com e sem mucosite, tratado com WpK4 ($p = 0,0015$).

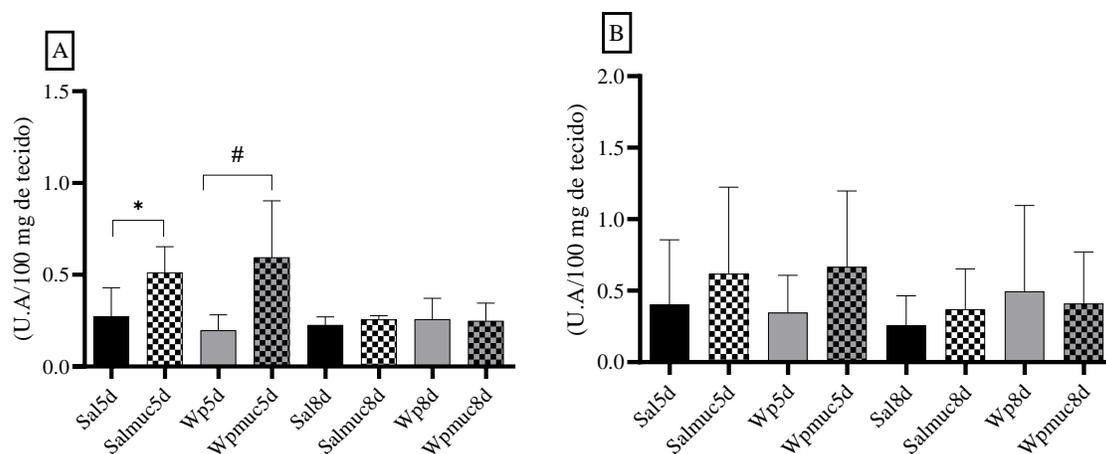


Figura 17 - Atividade das enzimas mieloperoxidase (A) e peroxidase eosinofílica (B) a partir de fragmentos de íleo. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão ($n = 10-11/\text{grupo}$). U.A: unidades arbitrárias. * Significa diferença estatisticamente significativa dos valores de atividade enzimática entre os grupos tratados com salina, sem e com mucosite ($p = 0,0028$), # Significa diferença estatisticamente significativa dos valores de atividade enzimática entre os grupos tratados com WpK4, sem e com mucosite ($p = 0,0017$).

Com relação a expressão de genes de citocinas, não foi observado no quinto dia, diferença significativa na expressão de *Tnfa* (Figura 18A). No oitavo dia, os animais tratados com salina 0,9% e com mucosite, apresentaram um pequeno aumento (não significativo) da expressão de *tnf* quando comparado ao grupo controle sem mucosite (Figura 18B). Os níveis de expressão do gene que codifica essa citocina pró inflamatória, nos grupos tratados com WpK4 com e sem mucosite, foram iguais ao grupo controle salina.

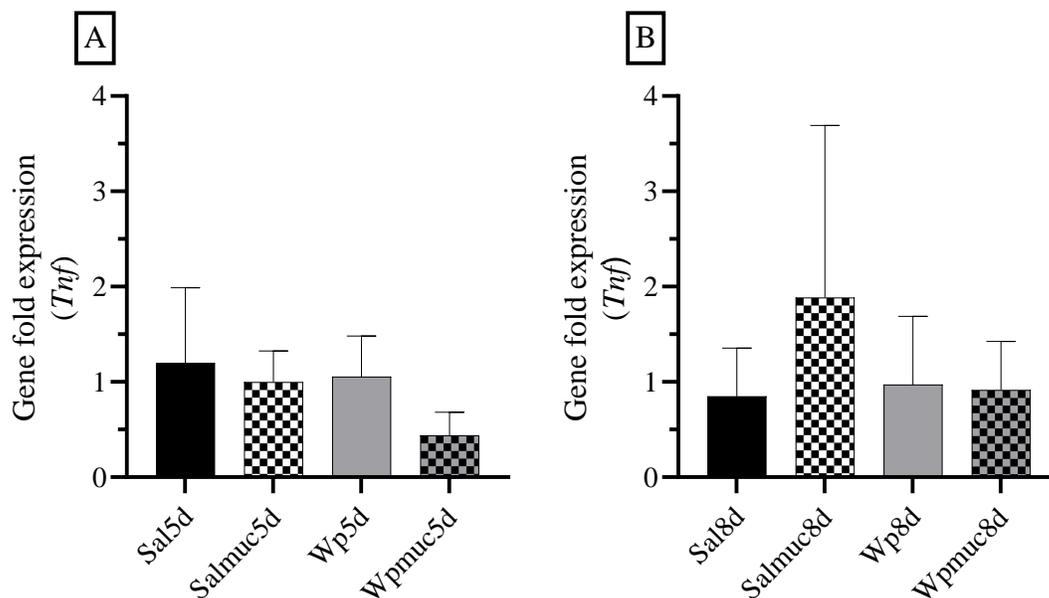


Figura 18 - Expressão relativas do gene *tnf* (A, B) no íleo de animais eutanasiados no 5° dia (A) e no 8° dia após indução de mucosite intestinal por 5-FU (B). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, n= (6/por grupos).

9. Avaliação da microbiota dos animais após mucosite intestinal

A avaliação da microbiota foi realizada por meio da quantificação de UFCs por grama de fezes ou conteúdo intestinal, no quinto e oitavo dia após início da administração de 75 mg/kg/dia de 5-FU. As amostras foram diluídas e semeadas em ágar MRS ou ágar MacConkey para enumeração de bactérias do ácido láctico e enterobactérias, respectivamente. Com relação à população de bactérias do ácido láctico nas fezes ou conteúdo intestinal, no quinto dia, foi possível observar uma estabilidade em todos os grupos (média 8,04 Log UFC/g de fezes e 7,23 Log UFC/g de conteúdo intestinal (figura 19A e C). Nesse mesmo tempo, houve um aumento significativo na população de enterobactérias nas fezes dos grupos Salina 0,9% + 5FU (5,04 Log UFC/g de fezes), WpK4 (5,18 Log UFC/g de fezes) e WpK4 + 5FU (4,41 Log UFC/g de fezes) quando comparados ao grupo tratado com Salina 0,9% sem mucosite, no qual a contagem não foi detectada pelo método ($<1,3$ Log UFC/g de fezes) (figura 19B). A população de enterobactérias no conteúdo intestinal do grupo sem mucosite e tratado com Salina 0,9% foi significativamente menor (3,14 Log UFC/g de conteúdo intestinal) quando comparada à dos grupos: Salina 0,9% + 5FU (4,55 Log UFC/g de conteúdo

intestinal), WpK4 (4,76 Log UFC/g de conteúdo intestinal) e WpK4 + 5FU (5,04 Log UFC/g de conteúdo intestinal) (figura 19D).

No oitavo dia após indução da mucosite, foi possível observar alteração significativa entre os grupos apenas na população de BAL do conteúdo intestinal (figura 19C e D). A população de BAL do grupo Salina 0,9%, foi significativamente menor (5,22 Log UFC/g de conteúdo intestinal) quando comparada à dos grupos: Salina 0,9% + 5FU (6,50 Log UFC/g de conteúdo intestinal), WpK4 (8,23 Log UFC/g de conteúdo intestinal) e WpK4 + 5FU (8,45 Log UFC/g de conteúdo intestinal) (figura 19C). A redução da comunidade de enterobactérias (figura 18B) nas fezes dos animais tratados com WpK4 + 5FU, comparado ao grupo controle tratado com a bactéria foi estatisticamente significativa ($P=0,0292$).

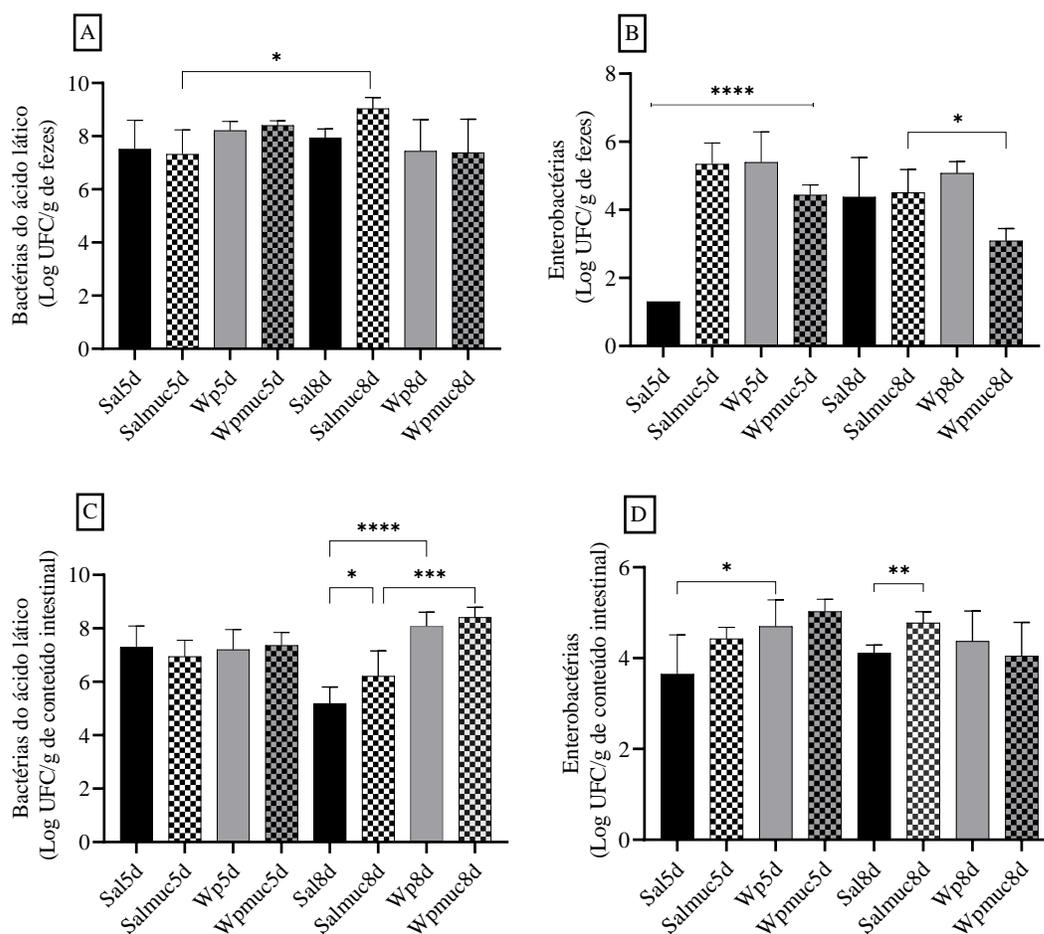
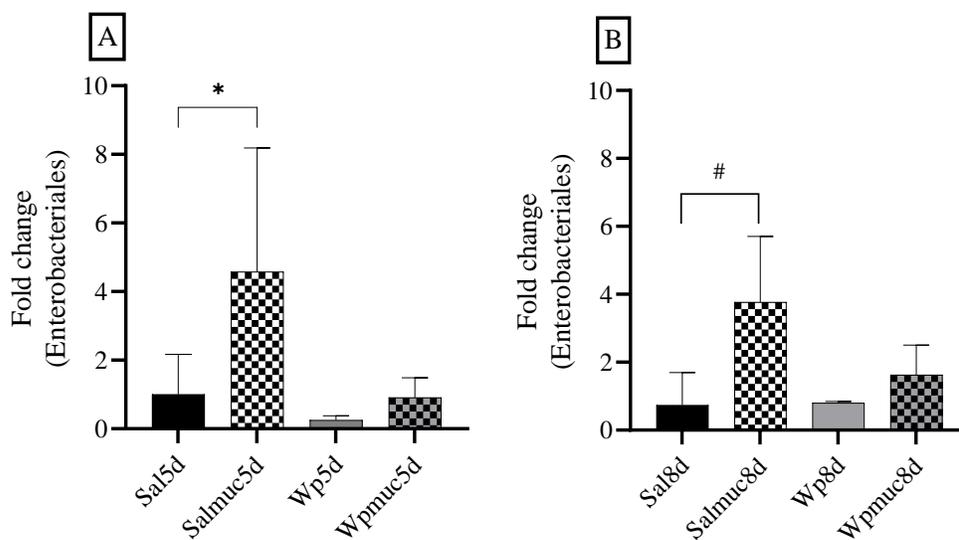


Figura 19 - Avaliação da população de bactérias do ácido láctico (A, C) e enterobactérias (B, D) nas fezes (A, B) e conteúdo intestinal (C, D) no quinto dia após indução da mucosite. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. * ($p<0,05$); ** ($p<0,01$); *** ($p<0,001$); **** ($p<0,0001$) significam diferença

estatisticamente significativa quando comparado ao grupo tratado com salina 0,9% sem mucosite intestinal. (n=4-5/grupo).

Não foi possível observar translocação microbiana para fígado e baço nos tempos analisados, em nenhum dos grupos experimentais. As contagens de colônias, quando observadas, estavam próximo ao limite de detecção do método (log 2 UFC/g).

A fim de confirmar a população microbiana de enterobactérias por métodos moleculares, foi realizado a quantificação relativa e absoluta de bactérias após a extração de DNA do conteúdo intestinal e PCR em tempo real. Houve um aumento significativo da população relativa de enterobacteriales no grupo tratado com salina e com mucosite no quinto (figura 20A) e oitavo dia (Figura 20B) após indução com 5-FU. A quantificação relativa da população de *E. coli* apresentou diferenças significativas no quinto (Figura 19C) e oitavo dia (Figura 20D).



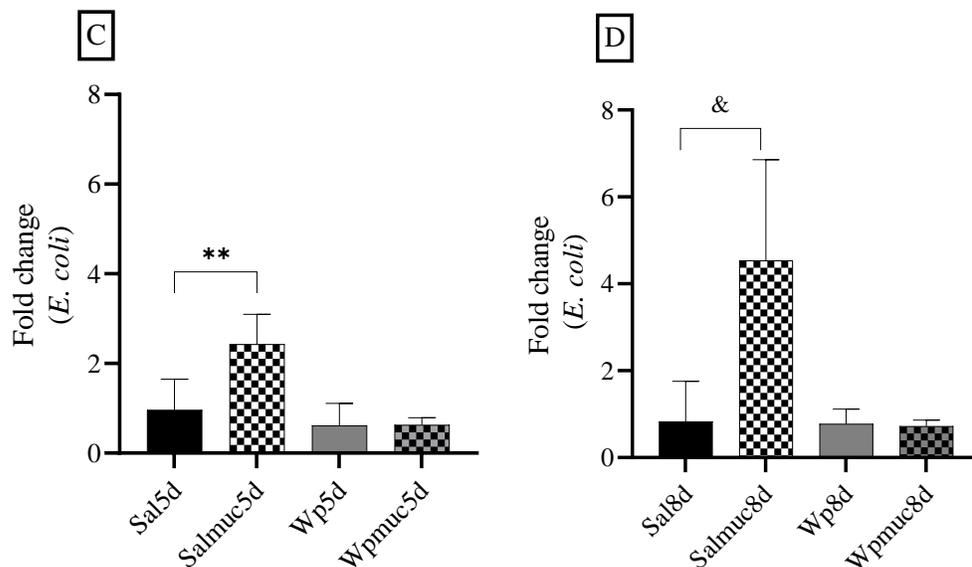
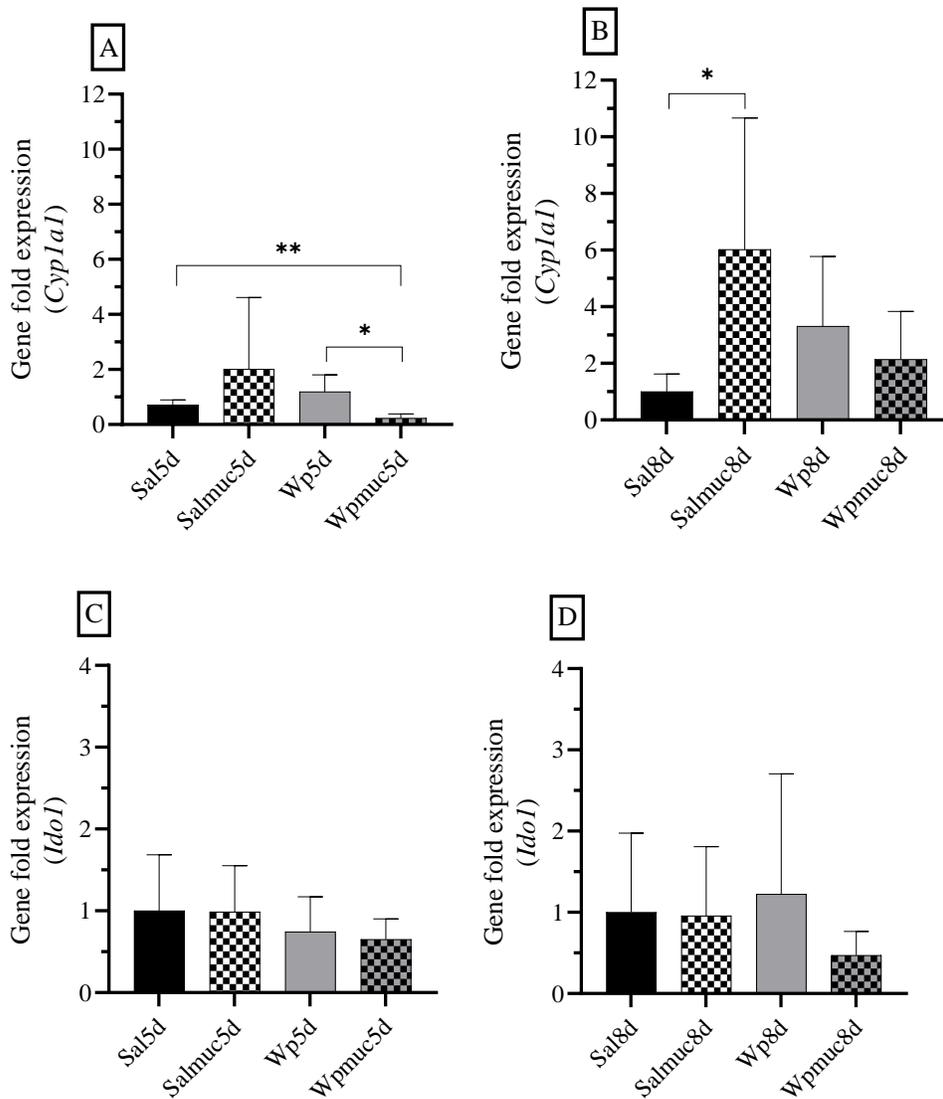


Figura 20 - Expressão relativa da população de enterobacterias (A, B) e *E. coli* (C, D) no conteúdo intestinal de camundongos eutanasiados no quinto (A, C) ou oitavo dia após indução da mucosite (B, D). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, n= (4-6) por grupo. * (P= 0,0493); # (P=0,0227); ** (P=0,0057); & (P=0,0130); significam diferença estatisticamente significativa quando comparado entre os grupos com e sem mucosite intestinal. (n=3-6/grupo).

10. Avaliação da expressão de moléculas envolvidas no metabolismo de TRP

A expressão de genes codificadores de moléculas envolvidas no metabolismo de TRP no íleo está demonstrada na figura 21. A diminuição da expressão da molécula CYP1A1 foi estatisticamente significativa no grupo Wpmuc eutanasiado no 5º dia (Figura 21A), no entanto, a expressão aumentou nos grupos tratados com WpK4 no oitavo dia após a indução de mucosite intestinal. Com relação ao grupo com mucosite intestinal no oitavo dia, tratado com salina, a expressão de *Cyp1a1* foi amplificada quando comparado ao controle sem mucosite intestinal (Figura 21B). A expressão da enzima IDO1, responsável pela formação da quinurenina a partir da degradação do aminoácido essencial TRP, não apresentou diferença significativa entre os grupos no quinto dia (Figura 21C), apesar da redução discreta da expressão de *Ido1* no oitavo dia do grupo com mucosite tratado com WpK4 (Figura 21D). No quinto dia, a expressão do *Ahr* não apresentou diferença entre os grupos (Figura 21E). No entanto, no oitavo dia é possível observar um aumento discreto da expressão desse receptor nos grupos tratados com WpK4 (Figura 21F). Estatisticamente, a expressão do

receptor foi superior apenas nos grupos tratados com WpK4 (Wpmuc P = 0,0405) quando comparado ao grupo saudável. Já a expressão de *Tph1*, responsável pela síntese de serotonina, no quinto dia, não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 21G). No oitavo dia, houve um aumento discreto na expressão de *Tph1* no grupo com mucosite tratado com salina 0,9% (Figura 21H).



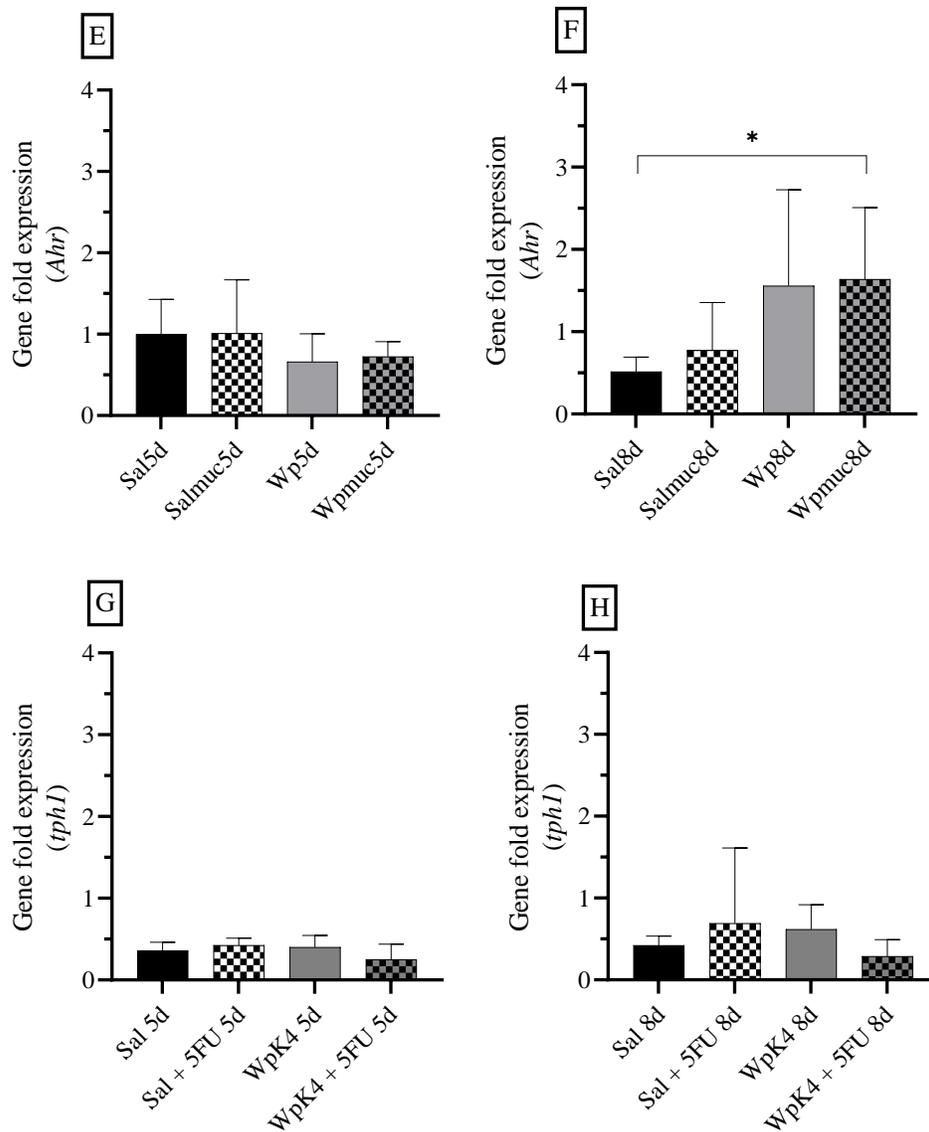


Figura 21 - Expressão relativa dos genes relacionados ao metabolismo do TRP em camundongos *Cyp1a1* (A, B); *Ido1* (C, D); *Ahr* (E, F) e *Tph1* (G, H) no íleo de animais eutanasiados no 5º dia (A, C, E, G) e no 8º dia após indução de mucosite intestinal por 5-FU (B, D, F, H). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, n= (6/ grupo).

6. DISCUSSÃO

Foi observado após sequenciamento e montagem do genoma da linhagem *W. paramesenteroides* WpK4 a presença do *operon* TRP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=weissella+wpk4>, Acesso 17/01/2023 às 18:37), com a presença de sete genes importantes para biossíntese do aminoácido triptofano (*trpS*, *sola*, *trpD*, *trpC*, *trpF*, *trpB* e *trpA*). O *operon* TRP é comumente formado pelos genes *TRPEDCBA*, cuja expressão é regulada pela expressão dos genes *trpL* e *trpR* (NELSON & COX, 2018). O triptofano (TRP) é um dos aminoácidos (aa) mais raros na maioria das proteínas e é o mais caro para sintetizar (MERINO *et al.*, 2008). Por se tratar de um aa essencial de baixa disponibilidade e não sintetizado por seres humanos, a produção dele se dá em grande parte por bactérias, fungos e plantas (STAVRUM *et al.*, 2013; YANG; SAUVE, 2017; ROAGER; LICHT, 2018). Algumas bactérias presentes em solos, como *Sinorhizobiu meliloti*, possuem genes de biossíntese do TRP, que estão organizados em três *operons* distintos (*trpE(G)*, *trpDC* e *trpFBA*) mostrando assim que é possível diferentes organizações do *operon* para síntese desse aa (EVGUENIEVA-HACKENBERG *et al.*, 2022; JOHNSTON *et al.*, 1978). Apesar de alguns autores demonstrarem diferentes conformações do *operon*, segundo SIMAO e colaboradores (2005), a presença do gene *trpE* é fundamental para produção de TRP a partir do corismato e para a regulação do *operon*, uma vez que a enzima antranilato sintase componente I (expressa por *trpE*) catalisa a primeira etapa da via biossintética do triptofano, ou seja, a conversão do corismato e glutamina em antranilato, piruvato e glutamato. Em alguns casos, a antranilato sintase componente I pode estar combinada à enzima antranilato sintase II (expressa por *trpD*), responsável pela conversão do antranilato em N-fosforibosil antranilato, funcionando assim como monômero (ASHENAFI *et al.*, 2015). Com relação a linhagem estudada, não foi encontrado sequências de aa que expressam *trpE* ou que possam comprovar esse arranjo entre *trpE* e *trpD*. A bactéria, no entanto, poderia começar a sintetizar o TRP a partir do antranilato ou até mesmo utilizar uma outra via de biossíntese que ainda não elucidada.

Supostamente não há em *W. paramesenteroides* WpK4 a presença dos genes *trpL*, *trpR*. Os genes *trpL* e *trpR* estão relacionados à regulação e repressão da transcrição, respectivamente (SIMÃO, 2006). No entanto, foi verificado a presença do gene codificador de proteínas do domínio contendo PRD. O domínio é encontrado em bactérias Gram-

negativas e Gram-positivas, cuja função é regular positivamente a transcrição de *operon* envolvidos no catabolismo de açúcares (ROM *et al.*, 2021; STÜLKE *et al.*, 1998). Não há relatos na literatura que corrobora que o domínio PRD seja capaz de regular o *operon* TRP, apesar da semelhança entre a regulação PRD e TRAP (WINKLER *et al.*, 2005). Muitas bactérias Gram-positivas desenvolveram estratégias diferentes para atenuação da transcrição do *operon* TRP. Por exemplo, a bactéria *Bacillus subtilis* utiliza uma proteína de ligação de RNA ativada por TRP enquanto outras bactérias Gram-positivas, como *Streptococcus*, abrigam uma estrutura de detecção de ^{TRP} tRNA (T-box) na região líder do mRNA.

O mecanismo de regulação TRAP é dependente da concentração de TRP assim como o *operon* TRP. A proteína TRAP é composta por 11 subunidades idênticas dispostas em um anel, o TRP se liga cooperativamente entre as subunidades adjacentes da proteína. À medida que a concentração intracelular de TRP aumenta, a TRAP ligada interfere na ligação do ribossomo, interrompendo assim a expressão de TRP (WINKLER *et al.*, 2005; BARBOLINA *et al.*, 2007).

A regulação do *operon* TRP pelo mecanismo T-box é quase exclusivamente restrita ao filo Bacillota. Algumas bactérias podem ainda regular a produção do TRP pós-transcricionalmente por mecanismos alternativos, com RNA anti-senso (GOLLNICK *et al.*, 2005; BAUMGARDT *et al.*, 2016; MELIOR *et al.*, 2019). A regulação mediada por T-box funciona de forma antagônica ao TRAP. O T-box é um elemento anti-terminação que monitora as quantidades relativas de espécies carregadas *versus* não carregadas de um tRNA específico por meio da ligação direta do tRNA pela RNA líder (revisto por GREE *et al.*, 2010). Quando há um suprimento suficiente de tRNA carregado em uma célula, esse sistema regulatório se dobra em uma estrutura terminadora, bloqueando assim a transcrição adicional. A transcrição só pode prosseguir após a conversão da estrutura terminadora em uma estrutura anti-terminadora, que é induzida pela ligação de um 5'-NCCA-3' altamente conservado do tRNA não carregado com uma sequência conservada '5-UGGN-3' (WELS *et al.*, 2009). Alguns autores afirmam que a região T-box codifica uma proteína inibidora de TRAP (anti-TRAP), que se liga a TRAP e permite o mRNA do *operon* TRP ser completamente transcrito (GREEN *et al.*, 2010).

Chlamydia trachomatis, por exemplo, expressa os genes que codificam a síntese de TRP (*trpBA*), assim como o gene repressor de TRP (*trpR*), sendo funcionais os produtos dos genes codificados. E a repressão ocorre diferentemente do que observado em *E. coli*, onde o TRP reprime o *operon*. O indol (produto do catabolismo do TRP) e 5-fluorotriptofano (análogo de TRP) reprimem a expressão desses genes (triptofano sintase) em *C. trachomatis* (CARLSON *et al.*, 2006).

Apesar da ausência de informações no genoma da bactéria relacionado aos genes citados anteriormente para a síntese do TRP, há a presença do gene *solA* no genoma da linhagem WpK4 que é responsável pela expressão da enzima N-metiltriptofano oxidase (MTOX). Essa enzima catalisa a desmetilação oxidativa de aa N-metil-triptofano, gerando o aa em sua forma pura, formaldeído e peróxido de hidrogênio. Apesar de ser uma enzima constitutiva, sua expressão pode ser aumentada pelo crescimento em meios mínimos. A MTOX usa oxigênio como aceptor de elétrons, e pode catalisar a oxidação de outros aminoácidos N-metilados, incluindo a sarcosina (N-metilglicina) (LAHHAM *et al.*, 2021; KHANNA *et al.*, 2001; PEEYUSH *et al.*, 2001). Não há evidências sobre MTOX ser capaz de regular o *operon* TRP. O N-metil TRP foi encontrado em plantas e antibióticos policetídeos (ILARI *et al.*, 2008). Há evidências que o gene *solA* é expresso constitutivamente em *E. coli*, e os níveis de expressão foram aumentados quando cultivados em meio mínimo, como foi observado no meio Vogel Bonner (KHANNA; JORNS, 2001).

Outro gene presente no genoma da linhagem estudada, é o gene *trpS*, que codifica a enzima triptofanil-tRNA sintetase, responsável pela associação entre o aa e seu tRNA cognato. Alguns autores demonstraram um papel regulatório dessa enzima, quando havia uma mutação no gene *trpS* em *B. subtilis*, a bactéria codificou uma proteína parcialmente defeituosa e sensível à temperatura, resultando assim em um aumento da expressão dos genes que codificam as enzimas da via biossintética do L-triptofano mediada por TRAP (LEE *et al.*, 1996).

Foi observada a produção desse aa por WpK4 após 6 h de cultivo em caldo MRS sob agitação, atingindo um máximo de produção de TRP em 48 h (11,75 µM). A via metabólica pela qual a WpK4 produz o TRP ainda não é clara, no entanto pode-se sugerir que, apesar de haver deleções de alguns genes do *operon* TRP, a presença do gene *solA* participe do

processo. Devido às condições de cultivo de WpK4 para dosagem do aa serem em agitação, é possível a produção de TRP pela desmetilação do N-metil-triptofano, uma vez que o oxigênio serve como aceptor de elétrons gerando l -triptofano, formaldeído e peróxido de hidrogênio como produtos (WAGNER *et al.*, 1999; DODGE *et al.*, 2015). No meio suplementado com TRP foi detectado aproximadamente a concentração que foi suplementada, portanto não houve produção adicional do aa ao longo do cultivo. Acredita-se que houve a regulação do *operon* de forma dependente da concentração do aa, ou pela ligação do repressor TRP ao *operon* bloqueando a transcrição (correpressor) ou por outro mecanismo de regulação, como foi descrito anteriormente pela TRAP (NELSON & COX, 2018; WINKLER *et al.*, 2005). A fim de avaliar e confirmar qual a via metabólica utilizada pela WpK4 para produção de TRP, seria necessário ensaios para dosagem do metabólito na ausência de oxigênio, a fim de descartar a hipótese da produção pelo gene *sola*, e/ou engenharia genética para deleção do gene ou avaliar a expressão gênica nas condições de cultivo citadas anteriormente.

A produção de TRP por essa linhagem bacteriana é importante, uma vez que a degradação desse aminoácido pelo hospedeiro e microbiota é capaz de gerar subprodutos que podem se ligar ao receptor de hidrocarboneto de arila (AhR). A sinalização desencadeada via ativação do AhR resulta em resposta imune local e, portanto, é crucial para a homeostase intestinal, agindo na renovação epitelial, manutenção da integridade da barreira e de muitos tipos de células imunes, como linfócitos intraepiteliais, células TH17, células linfoides inatas, macrófagos, células dendríticas (DCs) e neutrófilos. Sabe-se que os ligantes do receptor AhR são indol-3-aldeído (IAld), ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-propiónico (IPA), indol-3-acetaldeído (IAAld) e ácido indoleacrílico (IacrA) (AGUS, *et al.*, 2018).

As vias de catabolismo do TRP são bem elucidadas em plantas ou microrganismos associados às mesmas, visto que o fitormônio AIA, responsável pelo crescimento da planta, é produzido por quatro vias de síntese, sendo elas: indol-3-acetamida (IAM), ácido indol-3-pirúvico (IpyA), triptamina (TAM) e indol-3-acetonitrila (IAN). Algumas delas foram postuladas em bactérias como é o caso da *Paenibacillus polymyxa* E681 que demonstrou sintetizar AIA pela via IpyA, pela expressão do gene chave *ipdC* (que codifica indol-3-piruvato descarboxilase). O fitopatógeno *Rhodococcus fascians* também utiliza essa via como principal rota biossintética, enquanto o *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 consegue

catabolizar o TRP pelas vias IAM, TAM, IpyA e TSO (*Tryptophan side chain oxidase*) (SHAO *et al.*, 2015; MCCLERKLIN *et al.*, 2018; JAHN *et al.*, 2021) .

A via IAM (TRP → Indole-3-Acetamide (IAM) → AIA) é a via mais bem caracterizada em bactérias, catalisada pelas enzimas triptofano-2-monooxigenase (TMO) e IAM hidrolase (IAAH), codificadas pelo gene *Iaah*, respectivamente. A flavoproteína Triptofano-2-monooxigenase (TMO), quando investigada no banco de dados do NCBI, apresentou outros nomes como: amino oxidase, NAD(P)/FAD-*dependent oxidoreductase* e *flavin monoamine oxidase family protein*. Segundo Gaweska e colaboradores (2013), após uma pesquisa utilizando o PSI-BLAST das sequências genômicas bacterianas disponíveis, foram identificadas muitas proteínas relacionadas que são anotadas como triptofano monooxigenase, monoamina oxidase ou amina oxidase, incluindo a TMO do plasmídeo de *Agrobacter tumefaciens*, o agente causador de tumores em planta. Levando em consideração a sequência dessa enzima, foi sugerido que TMO é um membro da família de enzimas monoamina oxidase (MAO), responsáveis por oxidar aminas de neurotransmissores, aminoácidos e enzimas. As L-aminoácidos-2-monooxigenases (L-AAOs) são enzimas dependentes de FAD e membros da família da monoamina oxidase contendo flavina (MAO). Em humanos, a MAO pode também oxidar TAM em IAAlD (VIKSTRÖM *et al.*, 2012). A maioria das L-AAOs mostra uma certa especificidade de substrato, no entanto foram relatadas três com estrita especificidade de substrato: L- Glu oxidase de *Streptomyces* sp., L- Phe oxidase de *Pseudomonas* sp. e L-TRP -2-monooxigenase de *Pseudomonas savastanoi*. Apesar da WpK4 possuir diversas enzimas *NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase* e *flavin monoamine oxidase family protein*, não se sabe ao certo se essas oxidases são específicas para TRP. A confirmação da existência dessa via em WpK4 poderia ser feita pela dosagem de IAM por métodos de cromatografia líquida (SOBRADO *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2013; DOHYUN *et al.*, 2018). No entanto, ainda há outra dúvida em relação à presença dessa via em WpK4, uma vez que a sequência de aa correspondente à enzima *Indole acetamide hydrolase* responsável pela conversão do IAM em AIA também não foi encontrada descrito no genoma da linhagem bacteriana.

Muitas bactérias são capazes de produzir AIA pela via IpyA. Nessa via, o TRP, por meio da ação de uma aminotransferase (*Aromatic amino acid aminotransferase* – ARAT) é convertido em ácido indol-3-piruvico (IpyA) e esse intermediário sofre ação da enzima

descarboxilase (*Indole pyruvate decarboxylase* – IPDC) produzindo indol-3-acetaldeído (SHAO *et al.*, 2015; JAHN *et al.*, 2021). O IAAld é oxidado em AIA pela enzima aldeído desidrogenase (SPAEPEN *et al.*, 2007) e em alguns organismos, como lactobacilos, pode haver a produção de Iald a partir de AIA (Zelante *et al.*, 2014). No genoma de WpK4 foram encontradas sequências gênicas que resultam em sequências de aa que fazem parte de enzimas chave da via IpyA como aminotransferases, aldeído desidrogenase, proteína da família da aspartato aminotransferase, fenilactato desidrogenase e fenilactato desidratase. No entanto, a falta de anotação de sequências bacterianas específicas para enzimas envolvidas no metabolismo de TRP nos bancos de dados dificulta a obtenção de informações mais apuradas do genoma de WpK4.

A aminotransferase dependente de fosfato de piridoxal catalisa a troca reversível de um grupo amino com um grupo cetônico de outra molécula, que é uma reação importante na síntese de aminoácidos. Os genes que codificam ARATs foram estudados em várias espécies de bactérias, incluindo *Azospirillum brasilense*, *Enterobacter cloacae* e *Pantoea agglomerans* (SZKOP *et al.*, 2013) e são encarregados de catalisar a transferência dependente de piridoxal-5-fosfato (PLP) de um grupo amino do TRP para 2-oxoglutarato, produzindo IpyA e glutamato (PARTHASARATHY *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018).

Foram relatadas duas vias possíveis para produção do ácido indolático (ILA), uma por meio da desaminação do TRP catalisada pela aminoácido oxidase (AAO) e a outra pela conversão do IpyA pela ação enzimática da fenilactato desidrogenase (FLDH). A FLDH foi anotada no domínio de famílias proteicas do NCBI com outros nomes (*2-hydroxyacid dehydrogenase* e *lactate dehydrogenase*). Esta enzima pertence à família das oxido redutases que catalisam a redução específica reversível de 2-cetoácidos nos 2-hidroxiácidos correspondentes, pela oxidação simultânea de NAD⁺ (MATELSKA *et al.*, 2018). O ILA, por se tratar de uma molécula indutora do receptor AhR, está envolvido em efeitos benéficos no hospedeiro como a eliminação de radicais livres, inibição da produção de IL-6 induzida por UVB, redução da polarização TH17 (SAKURAI *et al.*, 2019) e atenuação significativa do aumento de TNF e IL-8 induzido por LPS em células epiteliais intestinais (EHRlich *et al.*, 2020). Além disso, o ILA microbiano tem potencial como um alvo para o controle de distúrbios imunológicos intestinais e como biomarcador para doenças como a colite (FAN *et al.*, 2020). Além da sequência genômica correspondente à enzima

FIDH, foi verificado na *W. paramesenteroides* WpK4 a presença da informação gênica da enzima FLDBC, que catalisa a reação do ILA em IAcrA. Segundo a literatura, o agrupamento de genes *fldAIBC*, presente em *Clostridium sporogenes*, é crucial para o metabolismo da fenilalanina e está supostamente envolvido no metabolismo de outros aminoácidos aromáticos, incluindo o TRP. A hipótese criada para *Pseudomonas russellii*, que possui agrupamento de genes, demonstrou a metabolização de aminoácidos aromáticos, especificamente o TRP em ácido 3-indoleacrílico (IAcrA, 188,071 *m/z*) e ácido indol 3-propiónico (IPA, 190,087 *m/z*) (WLODARSKA *et al.*, 2017). Nesse mesmo trabalho, foi observado que o tratamento com IAcrA levou ao aumento da expressão de genes-alvo na via antioxidativa mediada pelo fator 2 relacionado ao NF-E2 e regulação positiva do gene *Cyp1a1* induzido por AhR, em modelo de colite induzida por DSS.

O IPA pode também ser metabolizado pelo agrupamento de genes *Fldaibc* presente em *Clostridium* (WLODARSKA *et al.*, 2017) e regular as funções de barreira gastrointestinal controlando a inflamação pela diminuição da expressão do fator de necrose tumoral (TNF) de enterócitos e aumentando a expressão de proteínas juncionais (SAKURAI *et al.*, 2019). Além disso, o IPA pode fortalecer a barreira intestinal ao estimular diretamente o receptor do pregnano X (PXR), e foi relatado possuir efeitos antioxidantes e propriedades neuroprotetoras (DODD *et al.*, 2017).

Há fortes evidências pela presença dos genes *Arat*, *Fidh*, *Fidbc* no conteúdo genético da WpK4, que indicam a possibilidade da expressão da via catabólica do TRP ser via IPyA com a produção de dois sinalizadores do AhR (ILA e IAcrA). Contudo, nas condições de cultivo realizadas não foi possível detectar no sobrenadante o metabólito final da via (IAcrA).

Dada a ausência de um gene codificador de IPDC no genoma da WpK4, acreditava-se que era improvável que a *W. paramesenteroides* usasse a via IPyA para sintetizar IAald. Segundo Mcclerklin e colaboradores (2018), a ausência do gene *ipdC* na linhagem *Pseudomonas syringae* DC3000, levou à hipótese de que a síntese do AIA seria por meio de uma via que envolve a conversão de TRP em IAald pela TSO. Anteriormente, a via da oxidase de cadeia lateral do TRP (TSO) foi demonstrada em *Pseudomonas fluorescens* CHA0, por Oberhansli e colaboradores (1991). Esses autores demonstraram a conversão de TRP diretamente em IAald (sem sintetizar IPyA), catalisada por uma

monooxigenase de cadeia lateral de TRP. Pode ser que a linhagem WpK4 siga esse mesmo caminho metabólico.

A aldeído desidrogenase catalisa a formação de AIA dependente de NAD a partir de IAAlD. As aldeído desidrogenases (ALDs) geralmente catalisam a conversão de aldeídos em ácidos carboxílicos. Em diversos organismos, várias ALDs funcionam em diferentes vias metabólicas e fornecem funções de manutenção, como a desintoxicação de aldeídos reativos produzidos por peroxidação lipídica (MCCLERKLIN *et al.*, 2018). Na última etapa, o AIA pode se converter em Indol-3-aldeído (IAld) pela ação de aminotransferases ARAT ou pela família proteica aspartato aminotransferase, enzima chave que é conservada filogeneticamente em muitas espécies bacterianas, incluindo lactobacilos (ZELANTE *et al.*, 2014). As sequências de aminoácidos dos bancos de dados dessas enzimas foram alinhadas com a sequência da *W. paramesenteroides* WpK4, constatando uma possível via independente de IPyA, utilizando-se o IAAlD proveniente da via TSO ou de outros microrganismos (JAHN *et al.*, 2021; MCCLERKLIN *et al.*, 2018).

Por meio das dosagens do sobrenadante de cultivo de WpK4 em caldo MRS acrescido de TRP, observamos a produção de AIA e IAld após 12 h de incubação, seguido de consumo desses metabólitos após esse período. Há três vias possíveis para a produção desses metabólitos: a via IAM, IPyA (citadas anteriormente) e TAM. Não há evidências genéticas de que a linhagem estudada possui uma das três vias metabólicas completas. Desta maneira, seria necessário a dosagem dos metabólitos Indole-3-Acetamida e Indol-3-acetaldeído para tentar definir qual a via de produção do AIA e IAld.

Na literatura há outros microrganismos produtores de AIA, dentre eles microrganismos capazes de produzir concentrações superiores de AIA quando comparado a WpK4 (1,645 μM), como é o caso em *Pseudomonas putida* (11 - 30 μM) (LIN *et al.*, 2015). No entanto, outras bactérias associadas a plantas, produzem AIA em concentrações inferiores a WpK4, por exemplo *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2 (21,6 $\mu\text{g/mL}$ = 0,742 pM) (MUJAHID *et al.*, 2011), *Enterobacter xiangfangensis* BWH6 (553 $\mu\text{g/mL}$ = 3 nM), *Enterobacter asburiae* STY10 (214 $\mu\text{g/mL}$ = 1,2 nM) (ZHANG *et al.*, 2021), *Arthrobacter pascens* ZZ21 (0,34 μM em meio LB suplementado com 1 μM de TRP e 0,102 μM em LB) (LI *et al.*, 2018). Comparando-se a produção de IAld pela WpK4 (0,33 μM) a alguns resultados relatados na literatura, observamos que essa linhagem produziu níveis maiores desse metabólito que as

seguintes bactérias: *Enterobacter cloacae* (quantidade não descrita) (YAP *et al.*, 2015), *Sporisorium scitamineum* ST4-2-8 (6,9 mg/L = 1,71 pM) (NZIOKI *et al.*, 2006), *Bifidobacterium longum* CCFM1029 (11,20 ng/mL = 0,00771 pM) (FANG *et al.*, 2022).

No tocante à produção de TAM, os microrganismos capazes de descarboxilar o TRP são *Bacillus cereus*, *Azospirillum* (SPAEPEN *et al.*, 2007), *Clostridium sporogenes* ATCC 15579, *Ruminococcus gnavus*, *Xenorhabdus nematophilus*, *Bacillus atrophaeus* e *Lactobacillus bulgaricus*, a única espécie bacteriana conhecida por excretar triptamina (WILLIAMS *et al.*, 2014). A bactéria *Ruminococcus gnavus*, por exemplo, produziu 1,7 mM de triptamina após 72 h de cultivo em meio BHI (Brain Heart Infusion) à 37°C (WILLIAMS *et al.*, 2014). O TRP é convertido em TAM pela atividade da triptofano descarboxilase. Além da triptamina ser um ligante do AhR, é também precursor de IAAld pela ação de amina oxidases (SÁNCHEZ-PARRA *et al.*, 2014). Não há evidências de que a WpK4 possua em seu genoma a informação codificadora das enzimas triptofano descarboxilase e flavina monooxigenase, presentes na via TAM. No entanto, a via parece estar presente na linhagem, uma vez que TRP foi possível a dosagem de TAM (em média 7,49 uM) no sobrenadante de cultivo da linhagem em caldo MRS suplementado com TRP. A concentração desse intermediário ao longo do tempo de cultivo permaneceu constante, o que sugere que a linhagem possua uma enzima capaz de descarboxilar o TRP em TAM. Sendo assim, observamos que as concentrações de TAM relatadas nos estudos citados anteriormente são relativamente menores quando comparados aos valores encontrados no nosso estudo.

Os efeitos benéficos de TAM foram relatados por Bhattari e colaboradores (2018), que observaram, após o tratamento com 3 mM de TAM, um aumento da indução e liberação de muco *in vivo* em tecidos colônicos de camundongos. Foi utilizada uma concentração comparável à concentração fisiológica de outros metabólitos bacterianos (AGCC). Além disso foi observado posteriormente que TAM derivada de bactérias atenua a perda de peso e a gravidade da colite murina experimental induzida por DSS. Foi também comprovado que a liberação de muco colônico é dependente da ativação do receptor serotonina 5-HT pela TAM (BHATTARAI *et al.*, 2020).

Segundo a literatura, o papel de TAM como um precursor do ligante AhR é dependente da concentração intracelular do metabólito. A TAM pode induzir a expressão do gene alvo AhR CYP1A1, ativando o heterodímero AhR/ARNT (translocador nuclear do

AhR). Especula-se que, em condições normais, apenas uma pequena fração de TRP é convertida em TAM, mas essa quantidade aumenta substancialmente após a administração de L-triptofano (VIKSTRÖM *et al.*, 2012), como foi observado em nossos ensaios.

Resumidamente, a partir da análise genômica, acredita-se que a *W. paramesenteroides* WpK4 possui apenas uma via totalmente elucidada do catabolismo do TRP, apresentada na figura 23. Entretanto, não foi constatado a presença de IAcrA, metabólito final dessa via (figura 23^a). A detecção de AIA e IAld no sobrenadante da bactéria estudada (figura 23B), demonstrou a possibilidade de ocorrência da via apresentada na figura 23B, apesar da ausência do gene *ipdC* no genoma, e a incerteza sobre a via TSO. Não foram localizados no genoma da WpK4 genes codificadores de enzimas da via TAM (figura 23C), apesar da detecção do metabólito no sobrenadante de cultivo da bactéria. Independentemente da não localização da informação genética para algumas enzimas importantes nas vias do catabolismo do TRP descritas no presente estudo no genoma da linhagem WpK4, não podemos descartar a possibilidade da presença delas, porém, ainda não foram descritas ou caracterizadas e anotadas nos bancos de dados.

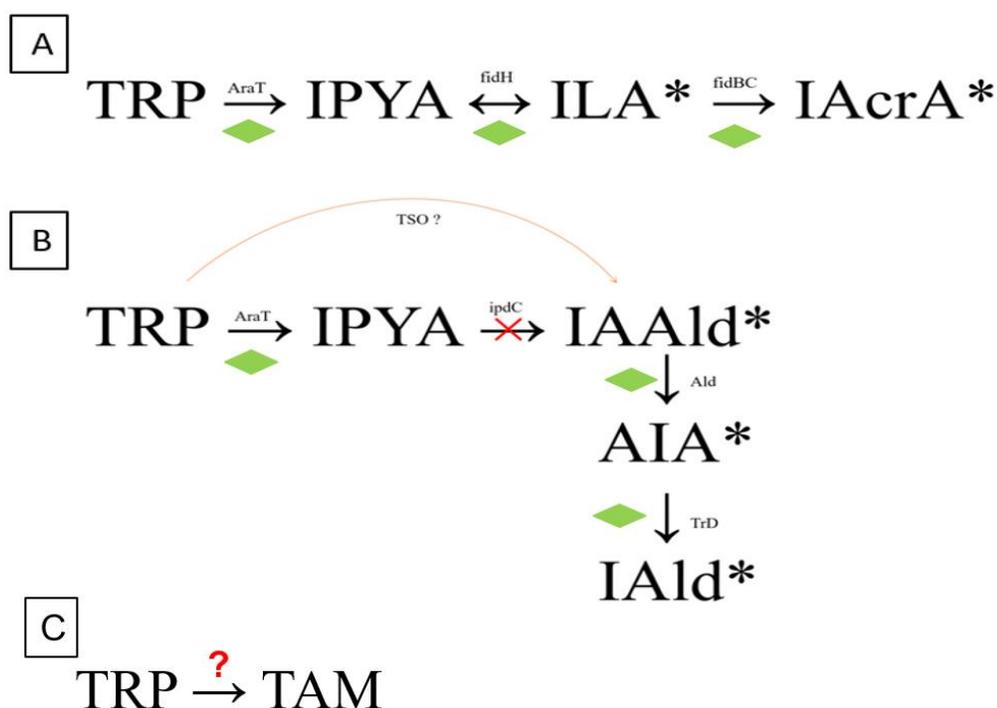


Figura 22 - Resumo das possíveis vias do catabolismo do TRP.

A análise da sobrevivência dos animais com diferentes idades (quatro e oito semanas), após a indução de mucosite intestinal utilizando a posologia de 75 mg/kg/3dias/i.p de 5-FU via intraperitoneal, indicou uma diversidade na evolução do quadro inflamatório. Animais mais jovens não apresentaram uma mortalidade tão expressiva quando comparados aos animais com oito semanas. A microbiota pode influenciar várias etapas envolvidas na patogênese da mucosite, pois animais IG ou com microbiota depletada por antibióticos sofreram atenuação do dano intestinal e da resposta inflamatória (MENEZES-GARCIA *et al.*, 2020). Segundo Turner (2018) quando o camundongo atinge 8 semanas de idade, a microbiota passa a ser mais estável. Sabe-se que a microbiota pode variar de acordo com a espécie do camundongo, dieta, ambiente experimental e origem (LAUKENS *et al.*, 2016). Não há relatos na literatura sobre a metagenômica intestinal de camundongos C57BL6/J em camundongos tão jovens (4-8 semanas) que possa relatar os grupos diferentes nessas idades (LANGILLE *et al.*, 2014; revisto por TURNER, 2018). Portanto, é possível que algum grupo microbiano esteja ausente com quatro semanas quando comparado aos animais com 8 semanas de idade. Esse grupo microbiano ausente possa ser o responsável pelo efeito atenuado do 5-FU. O sequenciamento genético da microbiota intestinal dos camundongos com quatro e oito semanas de idade poderia responder essa dúvida.

Além disso, a microbiota está envolvida na maturação simultânea das vias endócrinas, imunológicas e metabólicas durante o início da vida. Durante o início da vida neonatal, o desenvolvimento imunológico depende de gatilhos fornecidos pela microbiota neonatal, bem como pela microbiota materna. A maturação da imunidade inata, por sua vez, cria uma pressão seletiva para os microrganismos intestinais, impulsionando seu desenvolvimento temporal (JIAN *et al.*, 2021). Foi observada uma média de 28% de ganho de peso nos animais de quatro semanas até o dia do desafio, resultado esperado devido ao crescimento dos animais. Após a quimioterapia houve uma leve perda de peso em todos os grupos e sinais clínicos da mucosite leves, com ausência de morte. Observamos uma tendência protetiva no escore clínico dos animais com quatro semanas e tratamento preventivo de WpK4, como melhora na consistência fecal e ausência de sangue oculto nas fezes quando comparados aos animais tratados com salina ou com WpK4 de forma concomitante à quimioterapia. O tratamento concomitante à quimioterapia foi descartado em

experimentos subsequentes devido à baixa evidência de proteção observada, principalmente na avaliação do escore clínico e sobrevivência.

Por outro lado, animais com oito semanas apresentaram sinais clínicos de mucosite mais evidentes, com aproximadamente 40% de mortalidade no grupo controle (tratado com salina 0,9%), similar ao observado por BATISTA (2019) e MARCHIORI (2020). A linhagem *W. paramesenteroides* WpK4 conseguiu proteger os animais da morte causada pelos eventos da mucosite intestinal (100% de sobrevivência), assim como atenuar os sinais clínicos da mucosite (ausência de sangue oculto e consistência fecal melhorada) após cinco dias do início da quimioterapia. Os animais com oito semanas apresentaram uma variação de peso mais estável ao longo do experimento, com perda significativa de peso após a indução de mucosite até o 5º dia e recuperação do peso posteriormente, até o 8º dia. A partir do oitavo dia, foi possível observar uma diminuição do desenvolvimento ponderal de todos os animais, independente do grupo, e morte nos dias subsequentes apenas de animais não tratados com WpK4. Esses dados corroboram os achados por MARCHIORI (2020), onde *W. paramesenteroides* WpK4 viável ou morta pelo calor aumentou a sobrevivência dos animais frente a mucosite intestinal. HU e colaboradores (2020) apontaram que a administração do probiótico *L. ramosus* FLRH93 foi capaz de aumentar a taxa de sobrevivência dos camundongos após indução de mucosite por 5-FU (60%) quando comparados ao grupo controle (30%).

Em ambos os experimentos de sobrevida (4 ou 8 semanas), houve diminuição do peso dos animais após a quimioterapia. É bem claro e elucidado na literatura que a quimioterapia causa desconfortos ao paciente como dor, inflamação, disfagia, diarreia, perda de peso, sangramento retal e infecção. A mucosite é o principal efeito colateral limitante da quimioterapia, afetando a ingestão de alimentos e as funções oral e intestinal (LI *et al.*, 2017; THOMSEN *et al.*, 2018; PICÓ-MONLLOR *et al.*, 2019). Ainda sobre os sintomas da mucosite citados acima, os dados de escore clínico observados nos grupos pré-tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, sugere que a bactéria apresentou uma tendência em atenuar os sinais clínicos observados na mucosite. Os probióticos vem sendo apontados como agentes capazes de prevenir ou atenuar sintomas da mucosite intestinal, como náuseas, vômitos, dor abdominal, inflamações na mucosa e diarreia (BOWEN *et al.*, 2007). Em camundongos, a administração de *Lactiseibacillus rhamnosus* (CHANG *et al.*, 2018), *Saccharomyces*

boulardii (JUSTINO *et al.*, 2014), *Lactobacillus acidophilus* (JUSTINO *et al.*, 2015) e *Bifidobacterium bifidum* (KATO *et al.*, 2017) atenuaram os sinais clínicos observados na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Um efeito semelhante foi demonstrado em ratos pela administração de uma combinação de *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus casei* e *Streptococcus thermophilus* (TANG *et al.*, 2019).

Após os resultados de sobrevivência dos animais com mucosite pela ingestão de *W. paramesenteroides* WpK4, foram avaliados alguns parâmetros imunológicos, microbiológicos e estruturais que poderiam estar envolvidos nessa proteção pela bactéria estudada. Para tanto, animais de diferentes grupos experimentais foram eutanasiados em datas estabelecidas por trabalho anterior, no qual foi observado que as alterações desses parâmetros foram transitórias, com picos que variaram entre os dias 5 e 8 e retornaram aos níveis normais cerca de 10 dias após o início da quimioterapia (BATISTA, 2019). Leucopenia e neutrofilia estão significativamente correlacionadas com os parâmetros farmacocinéticos do metabolismo de 5-FU e a toxicidade observada no tratamento quimioterápico (ARAÚJO *et al.*, 2015). Durante a padronização do modelo foi observada uma queda dos leucócitos circulantes no sangue a partir do quinto dia até o decimo dia do protocolo experimental. Após o 15º dia, os valores de leucócitos foram reestabelecidos para os valores basais (BATISTA, 2019). No experimento com *W. paramesenteroides* WpK4 foi observada leucopenia no quinto dia para os grupos com mucosite, confirmando-se assim o efeito citotóxico causado pelo 5-FU, no entanto, a administração da bactéria não foi capaz de atenuar a leucopenia nesse tempo. Interessantemente, os animais com mucosite e tratados com WpK4 eutanasiados no oitavo dia apresentaram valores de leucócitos circulantes no sangue restaurados. Resultado similar foi descrito por De Jesus *et al.* (2019), quando a administração de leite fermentado por *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 preveniu a redução de leucócitos induzida por quimioterapia. Essa restauração dos níveis de leucócitos em oito dias pode ter contribuído para a maior sobrevivência dos animais tratados com WpK4, uma vez que se sabe que a leucopenia pode levar ao aumento da morbidade e mortalidade na mucosite intestinal devido à baixa proteção na barreira da mucosa (YEUNG *et al.*, 2021). Diferentemente, o tratamento com o probiótico *S. boulardii* não atenuou a leucopenia induzida por 5-FU, apesar do probiótico ser eficaz no tratamento da mucosite intestinal. Os mecanismos pela qual a *S. boulardii* protegeu os animais foi pela redução

significativa de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e CXCL-8). Além de aumentar o trânsito intestinal e o esvaziamento gástrico e diminuir a retenção no segmento distal do intestino (JUSTINO *et al.*, 2014).

O aumento do influxo de neutrófilo é um marcador da inflamação que ocorre na mucosite intestinal e consiste na contagem alta de neutrófilos intestinais. Houve um aumento significativo da enzima mieloperoxidase marcador indireto de infiltrado de neutrófilos nos grupos salina e WpK4 com mucosite quando comparados ao grupo controle no quinto dia. As quantidades de neutrófilos foram restauradas no oitavo dia. Nossos resultados corroboram os achados por Batista (2019) ao delinear os eventos da mucosite intestinal com relação aos infiltrados de neutrófilos. A linhagem estudada não foi capaz de reverter ou controlar a inflamação no grupo tratado com mucosite. Não houve diferenças significativas entre os grupos quando observado a eosinofilia, apesar do aumento discreto nos grupos com mucosite no 5d.

Observamos a redução discreta da expressão de *Tnf* no grupo com mucosite tratado com a bactéria, no quinto dia. Sabe-se que após a indução de mucosite por 5-FU há o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β e IL-6), que podem promover a inflamação responsável pela lesão tecidual (DE ARAUJO *et al.*, 2014; JUSTINO *et al.*, 2015). Consta, também, que alguns microrganismos probióticos podem atenuar a inflamação pela redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF, em modelo de mucosite intestinal (YEUNG *et al.*, 2015; CHANG *et al.*, 2018; KATO *et al.*, 2017; FANG *et al.*, 2014; JUSTINO *et al.*, 2015, 2020; DE JESUS *et al.*, 2019; QUARESMA *et al.*, 2019). Anteriormente, foi demonstrado que a linhagem WpK4 foi capaz de regular a resposta imune local em modelo murino de febre tifoide, reduzindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias (ALVIM *et al.*, 2016). Nossos resultados apontam para um possível efeito anti-inflamatório da administração de WpK4 aos animais, porém novos experimentos precisam ser feitos para comprovar essa hipótese.

Assim como as células produzidas pela medula óssea, que possuem ciclo celular curto, causando a mielossupressão após a quimioterapia, as células do epitélio intestinal, com o mesmo padrão proliferativo, também serão afetadas, gerando mudanças na arquitetura original, como encurtamento do comprimento intestinal e destruição das vilosidades (SONIS

et al., 2004). Observamos apenas diminuição do comprimento intestinal dos animais tratados com WpK4 com mucosite intestinal, em relação ao grupo sem mucosite, após cinco dias. Contudo, após oito dias, não houve diferença significativa entre os grupos. O encurtamento do intestino delgado em animais com mucosite comparados a animais saudáveis não foi tão marcante como o observado por Batista (2019). A não observância de encurtamento intestinal tem sido recorrente em outros experimentos que utilizam esse mesmo modelo de indução de mucosite (dados não publicados). Uma possível explicação pode ser o fato de que os animais que têm sido utilizados estão, de forma geral, com o comprimento intestinal menor (aproximadamente 34 cm) do que era observado nos animais utilizados por Batista (2019) (aproximadamente 37 cm), o que dificulta a observação do encurtamento. É importante ressaltar que o encurtamento só acontece em casos de inflamação intensa, que parece não ser o caso desse modelo. Por isso, é bem razoável que não detectemos encurtamento ou mesmo produção de citocinas. Diversos autores demonstraram resultados significativos do uso de probióticos em modelo experimental de mucosite intestinal, quando avaliado o escore histopatológico.

A avaliação de cortes histológicos do íleo dos animais demonstrou redução visível das vilosidades e hiperplasia de criptas, nos grupos com mucosite, no quinto dia, como esperado para o modelo experimental; e reestabelecimento da altura das vilosidades no oitavo dia, em especial no grupo tratado com WpK4. Além disso, o tratamento com WpK4 aumentou a produção de muco no quinto e oitavo dia após indução de mucosite com 5-FU. Alguns probióticos podem induzir a atenuação das alterações histopatológicas, avaliados pela relação vilosidade/cripta, superexpressão de genes de mucina ou aumento de células caliciformes. Por exemplo, *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 (YEUNG *et al.*, 2015; CHANG *et al.*, 2018), *Bifidobacterium bifidum* G9-1 (KATO *et al.*, 2017), *Bifidobacterium infantis* (MI *et al.*, 2017), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 (DE JESUS *et al.*, 2019). MARCHIORI, 2020 demonstrou que a linhagem *W. paramesenteroides* WpK4 foi capaz de induzir a recuperação das vilosidades intestinais nesse mesmo modelo de mucosite, pelo aumento da espessura do jejuno, quantidade de mucinas detectadas como zonas PAS+ e pela redução das áreas de necrose. O mesmo foi observado em modelos de infecção (*S. Typhimurium*, *Giardia lamblia*), nos quais animais tratados com WpK4 apresentaram uma

proteção significativa, refletida pelo score histopatológico total (ALVIM, 2016) e aumento de mucinas (FONSECA *et al.*, 2015). A destruição da mucosa e perda da integridade intestinal é comum na mucosite. O aumento da produção de muco nos grupos tratados com WpK4 é vantajoso, pois o muco serve como barreira protetora a exposição de microrganismos e contribui para a integridade da barreira intestinal (GARCIA, 2015; Oh *et al.*, 2017).

O grau de lesão histológica nos grupos com mucosite intestinal, tratados ou não com WpK4 eutanasiados no quinto dia, foi de lesões leves, como redução do tamanho das vilosidades intestinais, edema e infiltrado inflamatório discreto. O tratamento com a WpK4 não reverteu essas lesões nos animais.

Agentes quimioterápicos (irinotecano, Ipilimumab, 5-FU) interferem na homeostase da microbiota intestinal, sendo assim a disbiose é um marcador importante na mucosite intestinal. O tratamento com 5-FU em camundongos é capaz de alterar a abundância relativa de vários grupos, dentre eles, *Clostridium*, lactobacilos, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Escherichia* (LI *et al.*, 2017; BATISTA, 2019; MENEZES-GARCIA *et al.*, 2020)

A avaliação da microbiota intestinal foi realizada utilizando-se meios de culturas diferenciais e seletivos (MRS para bactérias lácticas e MK para enterobactérias). No quinto dia não foi possível observar alterações significativas da população de bactérias lácticas (fezes e conteúdo intestinal) entre os grupos com mucosite e controle, entretanto, no oitavo dia, os grupos que receberam salina (com e sem mucosite) apresentaram uma diminuição significativa da população de BAL. A alta população de BAL no quinto dia está de acordo com o esperado, uma vez que devido à baixa tensão de oxigênio no cólon, alguns grupos bacterianos são mais prevalentes. Sendo assim, é possível encontrar grandes concentrações de *Clostridia*, *Enterobacteria*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, *Fusobacteria*, lactobacilos, *Peptococci*, *Peptostreptococci*, *Prevotellaceae*, *Roseburia*, *Ruminococci* e *Verrucomicrobia* (LI *et al.*, 2017). A queda da população de BAL com 8 dias no grupo com mucosite e tratado com salina 0,9% também é um resultado esperado, uma vez que, conforme observado por outros autores, o 5-FU é capaz de alterar a microbiota intestinal, com aumento da população de enterobactérias e diminuição ou não da população de BAL.

MENEZES-GARCIA e colaboradores (2020) observaram um aumento expressivo na quantidade de enterobacteriaceae e *E. coli* nas fezes e no conteúdo do lúmen de camundongos após o tratamento com 5-FU (5 dias após), mas nenhuma mudança significativa no conteúdo de Bacteoidetes e Bacillota durante a doença. (LI *et al.*, 2017; BATISTA, 2019). A administração diária de *W. paramesenteroides* WpK4 foi capaz de manter as contagens constantes de BAL tanto em cinco como em oito dias, mesmo nos grupos com mucosite.

Quanto à enumeração microbiana no meio MK no quinto dia, foi observado que a população de enterobactérias estava aumentada em todos os grupos, exceto no grupo tratado com salina e sem mucosite (fezes e conteúdo intestinal). Nas amostras de fezes do quinto dia, apresentou uma contagem bacteriana baixa e próxima ao limite de detecção da técnica utilizada. Julga-se que esse valor baixo seja um erro experimental, pois anteriormente (BATISTA, 2019), foi relatado uma contagem de enterobactérias nas fezes antes do evento da mucosite de aproximadamente 4 Log UFC/g.

No oitavo dia, no entanto, o grupo com mucosite e tratado com *W. paramesenteroides* apresentou uma diminuição significativa da população de enterobactérias nas fezes. Sendo assim, acredita-se que *W. paramesenteroides* WpK4 contribuiu a diminuição de enterobactérias no oitavo dia do grupo com mucosite. Esse resultado sugere que a manutenção dos níveis altos de BAL contribuiu para a não expansão da população que comumente aumenta em casos de mucosite.

No entanto, a metodologia utilizada para enumeração de microrganismos presentes no conteúdo intestinal e fecal vem sendo questionada, uma vez que apesar de teoricamente, o meio MK ser um meio de cultura diferencial e seletivo para bactérias Gram negativas, há a possibilidade de se observar o crescimento de outros grupos nesses meios (WALKER *et al.*, 2016; DE SANT'ANNA, 2019). Para contornar essa limitação dos métodos baseados em cultivo, foi realizada a quantificação relativa de rRNA utilizando *primers* específicos para avaliar o aumento da população de enterobacteriales e *E. coli*. De modo geral, foi constatado um aumento das populações da ordem Enterobacteriales e *E. coli*, no grupo salina com mucosite em relação aos respectivo controle sem mucosite, como era esperado. A administração de WpK4, no entanto, parece reduzir o impacto causado pela quimioterapia sobre esses grupos da microbiota intestinal. Tanto no quinto, como no oitavo dia a população

de enterobacteriales e *E. coli* com mucosite e tratado com WpK4, foi igual estatisticamente ao controle salina. Nossos resultados se assemelharam ao que foi visto anteriormente por Menezes-Garcia (2020), como o aumento dessa população de enterobactérias, especificamente a espécie *E. coli* nos grupos com mucosite intestinal (BATISTA *et al.*, 2019; MENEZES-GARCIA *et al.*, 2020). A utilização de probióticos como *Lactobacillus casei* subespécie *rhannosus* (Lcr35) e *Bifidobacterium bifidum* G9-1 foram capazes de diminuir a população de Bacillota e aumentar Bacteroidota em modelo experimental de mucosite intestinal (YEUNG *et al.*, 2015; CHANG *et al.*, 2018; KATO *et al.*, 2017). Segundo Li e colaboradores (2017), ao avaliar as variações da microbiota intestinal com o uso de métodos moleculares, foi possível constatar que o tratamento com 5-FU levou à perda de riqueza e diversidade na comunidade bacteriana, principalmente no conteúdo do ceco. Os quatro principais filos encontrados nas fezes e no conteúdo do ceco foram Bacteroidota, Verrucomicrobia, Bacillota e Pseudomonadota, entre os quais Bacteroidota e Verrucomicrobia foram os relativamente mais abundantes. O tratamento com 5-FU diminuiu notavelmente a abundância relativa no nível de filos Bacillota, Pseudomonadota e Cyanobacteriota nas fezes. Além disso, a administração de 5-FU diminuiu significativamente a proporção de Bacillota/Bacteroidota no conteúdo do ceco e nas fezes. A razão Bacillota/Bacteroidota parece ser importante para a manutenção do estado fisiológico. A diminuição da abundância das famílias *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae* pertencentes ao filo Bacillota, está associada a estados inflamatórios. No nível de filo, a microbiota baixa em Bacillota é capaz de aumentar a sensibilidade intestinal à inflamação (LI *et al.*, 2017). Sendo assim, é plausível que WpK4 tenha papel importante na modulação da microbiota intestinal, como foi observado na quantificação relativa da população de Enterobacteriales e *E. coli*. No entanto, dada a complexidade da microbiota intestinal, é necessário verificar as alterações que a WpK4 possa induzir em outros componentes da microbiota.

Não foi observada translocação de BAL e enterobactérias para fígado e baço em nenhum dos grupos avaliados, dentro dos limites de detecção do método utilizado. Para se confirmar esses resultados, outras metodologias poderiam ser utilizadas. Há registros de métodos que se mostraram mais eficazes para verificar translocação bacteriana, como uso de bactérias marcadas com tecnécio (CARVALHO *et al.*, 2021) e o uso meio de culturas ricas (BATISTA, 2019). Independente das limitações do método, é comum a avaliação da

segurança de probióticos por meio da verificação de translocação de células viáveis do ambiente intestinal para sangue, fígado e baço. O risco de infecção sistêmica com a administração de probióticos que não são capazes de translocar é quase nula (YEUNG *et al.*, 2015). Nesse sentido, a não translocação de *W. paramesenteroides* WpK4 para fígado e baço de animais submetidos a um tratamento que leva à aumento da permeabilidade intestinal e à imunossupressão, demonstra, mais uma vez, a segurança do uso dessa linhagem.

A expressão de moléculas relacionadas ao metabolismo do TRP no hospedeiro foi avaliada. Não houve diferença significativa entre os grupos com relação a expressão de IDO1 e TPH2. A indoleamina 2,3-dioxigenase-1 é a enzima responsável pela conversão do TRP em quinurenina no hospedeiro (ZELANTE *et al.*, 2013; FERDINANDE *et al.*, 2008), enquanto a Triptofano hidroxilase 1 converte o TRP em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) (GROSS *et al.*, 2012; GERSHON *et al.*, 2013), precursor da serotonina. Esse resultado sugere que a presença da WpK4 no ambiente intestinal não induz as vias da quinurenina e da 5-HTP no modelo estudado.

A expressão do receptor AhR e da enzima CYP1A1, se correlacionam. Em virtude da junção de um ligante ao AhR, o AhR se transloca do citoplasma para o núcleo, onde se heterodimeriza com o translocador nuclear do AhR e então ativa a transcrição de genes-alvo, como o citocromo P450 CYP1A1. Houve um aumento da expressão do receptor nos grupos tratados com WpK4 sem e com mucosite no oitavo dia (Wpmuc $p = 0,0405$). Devido a capacidade da bactéria em produzir TRP e alguns metabólitos ligantes do receptor AhR, não nos surpreende o aumento da expressão mesmo que discreto e tardio nos animais tratados com WpK4. O TRP produzido pela bactéria, pode ainda ser utilizado pela microbiota para a conversão do aa em moléculas indutoras do receptor. Sabe-se que ligantes agônicos e antagonistas do AhR podem atenuar ou agravar doenças inflamatórias induzidas por fármacos. Autores demonstraram que ligantes agonistas podem prevenir a colite em modelo de DSS (FURUMATSU *et al.*, 2011), e que as antagonistas podem aumentar o índice de doença e letalidade em modelo de mucosite por 5-FU (BATISTA, 2019).

Enquanto a expressão do receptor AhR no quinto dia foi similar nos dois grupos tratados com WpK4, a expressão da enzima citocromo nesse mesmo tempo foi menor nos animais dos grupos tratados com WpK4 e com mucosite. No oitavo dia, a expressão de AhR foi maior nos grupos que receberam WpK4 em relação aos grupos que receberam salina e

similar entre aqueles. Nesse mesmo tempo, houve menor expressão de CYP1A1, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, no grupo WpK4 com mucosite, quando comparado ao grupo WpK4 sem mucosite. O tratamento com WpK4 em condições saudáveis é ponderadamente maior ao comparar com o grupo controle salina. A expressão do CYP1A1 no grupo com mucosite e tratado com salina foi maior que o grupo controle com salina ($p = 0,0429$). Cita-se, na literatura, que a enzima CYP1A1 degrada rapidamente os ligantes de AhR, regulando a duração da sinalização do receptor. A expressão desregulada dessa enzima pode esgotar os reservatórios de ligantes naturais do receptor, causando um impacto negativo na imunidade intestinal (KYOREVA *et al.*, 2021). Interessantemente, no nosso estudo, o grupo com mucosite e sem administração do probiótico, que teve uma maior expressão de CYP1A1, foi o que respondeu de forma pior à mucosite induzida por 5-FU, com maior taxa de mortalidade. Outros autores relataram o mesmo comportamento em camundongos com colite induzida por DSS, na qual o DSS aumentou os níveis de mRNA *Cyp1a1* em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem quando comparado a camundongos *Ahr* *-/-*, sugerindo que os ligantes AHR endógenos são induzidos por causa da inflamação intestinal. Excesso de TRP, desencadeando o seu catabolismo e produzindo ligantes de AhR. Os autores não definiram quais são esses ligantes endógenos, mas coincidiu com as alterações da microbiota após a indução com DSS (HUTIN *et al.*, 2022; FURUMATSU *et al.*, 2011). Takamura e colaboradores (2011), no entanto, descobriram que uma dose única de tratamento oral com o probiótico foi capaz de aumentar temporariamente o mRNA de *Cyp1a1* no cólon de camundongos. Apesar de não haver relação equivalente entre os nossos resultados de expressão de CYP1A1 e receptor AhR, não podemos descartar a possibilidade de que há indícios de que a presença de *W. paramesenteroides* WpK4 estimule a via de sinalização AHR pelo controle da expressão da CYP1A1. Para comprovar essa teoria, ainda se faz necessário a dosagem dos metabólitos ativadores de AhR no intestino e soro dos camundongos tratados com o probiótico, com e sem mucosite.

7. CONCLUSÃO

Foi evidenciado que *Weissella paramesenteroides* WpK4 possui sequências de aminoácidos presentes em enzimas importantes tanto para produção do TRP quanto para o seu catabolismo, além de produzi-los *in vitro* (TRP, AIA TAM e IAld). Há fortes indícios da relação entre o metabolismo do TRP e o efeito protetor causado pela administração oral de *W. paramesenteroides* WpK4 pelo aumento da expressão do receptor AhR nos grupos tratados. Os resultados sugerem que um dos mecanismos envolvidos na proteção foram: o aumento da produção de muco pela WpK4, capaz de proteger os animais do dano causado pela mucosite intestinal. Além disso, a linhagem conseguiu controlar a população de Enterobacteriales especificamente *E. coli*, que caracteriza a disbiose observada em modelos de mucosite intestinal.

REFERÊNCIAS

ABRIOUEL, Hikmate *et al.* The controversial nature of the *Weissella* genus: technological and functional aspects versus whole genome analysis-based pathogenic potential for their application in food and health. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1197, 2015.

ABU-SHANAB, Ahmed; QUIGLEY, Eamonn MM. The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 7, n. 12, p. 691-701, 2010.

ACURCIO, Leonardo Borges *et al.* Protective effects of milk fermented by *Lactobacillus plantarum* B7 from Brazilian artisanal cheese on a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in BALB/c mice. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 436-445, 2017.

AGUS, Allison; PLANCHAIS, Julien; SOKOL, Harry. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. **Cell host & microbe**, v. 23, n. 6, p. 716-724, 2018.

ALKHALAF, Lona M.; RYAN, Katherine S. Biosynthetic manipulation of tryptophan in bacteria: pathways and mechanisms. **Chemistry & biology**, v. 22, n. 3, p. 317-328, 2015.

ALLIN, Kristine H. *et al.* Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. **Diabetologia**, v. 61, p. 810-820, 2018.

AL-RASHIDI, Hanan E. Gut microbiota and immunity relevance in eubiosis and dysbiosis. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 1628-1643, 2022.

ALVIM, L. B. *et al.* *Weissella paramesenteroides* WpK4 reduces gene expression of intestinal cytokines, and hepatic and splenic injuries in a murine model of typhoid fever. **Beneficial microbes**, v. 7, n. 1, p. 61-73, 2016.

ALVIM, Luige Biciati. **Identificação molecular e seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico isoladas de diferentes mucosas de suínos**. 2011. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

ARAGOZZINI, F. *et al.* Indole-3-lactic acid as a tryptophan metabolite produced by *Bifidobacterium* spp. **Applied and environmental microbiology**, v. 38, n. 3, p. 544-546, 1979.

ARAÚJO, C. V. *et al.* Alanyl-glutamine attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in apolipoprotein E-deficient mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 6, p. 493-501, 2015.

ASHENAFI, Meseret *et al.* The fused anthranilate synthase from *Streptomyces venezuelae* functions as a monomer. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 400, n. 1, p. 9-15, 2015.

BADAWY, Abdulla A.-B. Tryptophan metabolism, disposition and utilization in pregnancy. **Bioscience reports**, v. 35, n. 5, 2015.

BARBOLINA, Maria V. *et al.* The rate of TRAP binding to RNA is crucial for transcription attenuation control of the *B. subtilis* TRP operon. **Journal of molecular biology**, v. 370, n. 5, p. 925-938, 2007.

BARROSO-BATISTA, Joao; DEMENGEOT, Jocelyne; GORDO, Isabel. Adaptive immunity increases the pace and predictability of evolutionary change in commensal gut bacteria. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 8945, 2015.

BATISTA, Rafaela Ribeiro Álvares. **Papel do Receptor de Hidrocarbonetos Aromáticos (AHR) e do Metabolismo de Triptofano no Controle da Disbiose e da Lesão Tecidual Associada à Mucosite Intestinal Induzida por 5-Fluorouracil**. 2019. Dissertação de mestrado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

BATISTA, Viviane Lima *et al.* Probiotics, prebiotics, synbiotics, and paraprobiotics as a therapeutic alternative for intestinal mucositis running head: alternative treatment for intestinal mucositis. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 2246, 2020.

BAUMGARDT, Kathrin *et al.* The stress-related, rhizobial small RNA RcsR1 destabilizes the autoinducer synthase encoding mRNA *sinI* in *Sinorhizobium meliloti*. **RNA biology**, v. 13, n. 5, p. 486-499, 2016.

BEHNSEN, Judith *et al.* The cytokine IL-22 promotes pathogen colonization by suppressing related commensal bacteria. **Immunity**, v. 40, n. 2, p. 262-273, 2014.

BELKAID, Yasmine; HAND, Timothy W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 121-141, 2014.

BELZER, Clara; DE VOS, Willem M. The intestinal microbiota: importance for health and, potential therapeutic target. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 1, n. 27, p. 1-3, 2013.

BHATTARAI, Yogesh *et al.* Gut microbiota-produced tryptamine activates an epithelial G-protein-coupled receptor to increase colonic secretion. **Cell host & microbe**, v. 23, n. 6, p. 775-785. e5, 2018.

BITTINGER, Kyle *et al.* Bacterial colonization reprograms the neonatal gut metabolome. **Nature microbiology**, v. 5, n. 6, p. 838-847, 2020.

- BOKULICH, Nicholas A. *et al.* Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. **Science translational medicine**, v. 8, n. 343, p. 343ra82-343ra82, 2016.
- BOWEN, Joanne M. *et al.* VSL# 3 probiotic treatment reduces chemotherapy-induced diarrhoea and weight loss. **Cancer biology & therapy**, v. 6, n. 9, p. 1445-1450, 2007.
- BRADLEY, Peter P. *et al.* Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of investigative dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.
- BROZ, Petr; DIXIT, Vishva M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 7, p. 407-420, 2016.
- BUNSANGIAM, Sakaoduen *et al.* Biosynthetic pathway of indole-3-acetic acid in basidiomycetous yeast *Rhodospiridiobolus fluvialis*. **Mycobiology**, v. 47, n. 3, p. 292-300, 2019.
- BUSANELLO, Marli. Probióticos, seus modos de ação e a produção animal. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 11, n. 4, p. 14-24, 2012.
- CARLSON, John H. *et al.* In vivo and in vitro studies of *Chlamydia trachomatis* TRPR: DNA interactions. **Molecular microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1678-1691, 2006.
- CARVALHO, Paula Lopes Armond *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, 2021.
- CASTILLO, Marisol *et al.* Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. **Veterinary microbiology**, v. 114, n. 1-2, p. 165-170, 2006.
- CHANG, Ching-Wei *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, p. 983, 2018.
- CHEN, Grace Y. *et al.* The innate immune receptor Nod1 protects the intestine from inflammation-induced tumorigenesis. **Cancer research**, v. 68, n. 24, p. 10060-10067, 2008.
- CHEN, Kang *et al.* Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 7, p. 427-441, 2020.
- CLEMENTE, Jose C. *et al.* The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1258-1270, 2012.

COLLINS, Stephen M.; BERCIK, Premysl. The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 2003-2014, 2009.

CORTHER, G.; DORÉ, J. A new era in gut research concerning interactions between microbiota and human health. **Gastroenterologie clinique et biologique**, v. 34, p. S1-S6, 2010.

CREMON, Cesare *et al.* Pre-and probiotic overview. **Current opinion in pharmacology**, v. 43, p. 87-92, 2018.

DAHLGREN, David *et al.* Chemotherapeutics-induced intestinal mucositis: Pathophysiology and potential treatment strategies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 681417, 2021.

DAVILA, Marta; BRESALIER, Robert S. Gastrointestinal complications of oncologic therapy. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 12, p. 682-696, 2008.

DE FREITAS FONSECA, Joice. **Efeito do Probiótico de *Weissella paramesenteroides* (WpK4) na Infecção Experimental com *Giardia lamblia* (Syn. *G. duodenalis*, *G. intestinalis*) em Gerbils (*Meriones unguiculatus*)**. 2019. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

DE JESUS, Luís Cláudio Lima *et al.* Probiogenomics of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133: In Silico, In Vitro, and In Vivo Approaches. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 829, 2021.

DE JESUS, Luís Cláudio Lima *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, 2019.

DE SANT'ANNA, Felipe Machado. **Microbioma do queijo minas artesanal da Serra do Salitre ao longo do período de maturação**. 2019. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

DERRIEN, Muriel *et al.* *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1469-1476, 2004.

DINAN, Timothy G.; STANTON, Catherine; CRYAN, John F. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. **Biological psychiatry**, v. 74, n. 10, p. 720-726, 2013.

DODD, Dylan *et al.* A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites. **Nature**, v. 551, n. 7682, p. 648-652, 2017.

DODGE, Anthony G. *et al.* Rapid method using two microbial enzymes for detection of L-abrine in food as a marker for the toxic protein abrin. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 5, p. 1610-1615, 2015.

DONALDSON, Gregory P.; LEE, S. Melanie; MAZMANIAN, Sarkis K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 20-32, 2016.

DUCA, Daiana *et al.* Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 85-125, 2014.

DUNIERE, L. *et al.* Impact of adding *Saccharomyces* strains on fermentation, aerobic stability, nutritive value, and select lactobacilli populations in corn silage. **Journal of animal science**, v. 93, n. 5, p. 2322-2335, 2015.

EHRlich, Amy M. *et al.* Indole-3-lactic acid associated with *Bifidobacterium*-dominated microbiota significantly decreases inflammation in intestinal epithelial cells. **BMC microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2020.

EVGUENIEVA-HACKENBERG, Elena. Riboregulation in bacteria: from general principles to novel mechanisms of the TRP attenuator and its sRNA and peptide products. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 13, n. 3, p. e1696, 2022.

FAN, Qilin *et al.* Paeoniflorin modulates gut microbial production of indole-3-lactate and epithelial autophagy to alleviate colitis in mice. **Phytomedicine**, v. 79, p. 153345, 2020.

FAN, Yong; PEDERSEN, Oluf. Gut microbiota in human metabolic health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 55-71, 2021.

FANG, Zhifeng *et al.* *Bifidobacterium longum* mediated tryptophan metabolism to improve atopic dermatitis via the gut-skin axis. **Gut microbes**, v. 14, n. 1, p. 2044723, 2022.

FARDINI, Yann *et al.* Transmission of diverse oral bacteria to murine placenta: evidence for the oral microbiome as a potential source of intrauterine infection. **Infection and immunity**, v. 78, n. 4, p. 1789-1796, 2010.

FASANO, Alessio *et al.* Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body. **Intestinal Dysbiosis in Inflammatory Diseases**, 2021.

FAZILAH, Nurul Farhana *et al.* Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 387-399, 2018.

FERLAY, J.; COLOMBET, M. Soerjomataram I. Ervik M. Dikshit R. Eser S. Mathers C. *et al.* **GLOBOCAN**, p. v1, 2012.

- FIDELES, Lázaro de Sousa *et al.* Role of Rutin in 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis: Prevention of Histological Damage and Reduction of Inflammation and Oxidative Stress. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2786, 2020.
- FONSECA, J. F. *et al.* Probiotic effect of *Bifidobacterium longum* 51A and *Weissella paramesenteroides* WpK4 on gerbils infected with *Giardia lamblia*. **Journal of applied microbiology**, v. 127, n. 4, p. 1184-1191, 2019.
- FRANCINO, M. Pilar. Early development of the gut microbiota and immune health. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 769-790, 2014.
- FUSCO, Vincenzina *et al.* The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 155, 2015.
- GALLIGAN, J. J. Beneficial actions of microbiota-derived tryptophan metabolites. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 30, n. 2, p. e13283, 2018.
- GAO, Jing *et al.* Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 13, 2018.
- GAO, Kan *et al.* Tryptophan metabolism: a link between the gut microbiota and brain. **Advances in Nutrition**, v. 11, n. 3, p. 709-723, 2020.
- GARVIE, Ellen I. The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. **Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 439-447, 1967.
- GAWESKA, Helena M. *et al.* Structure of the flavoprotein tryptophan 2-monooxygenase, a key enzyme in the formation of galls in plants. **Biochemistry**, v. 52, n. 15, p. 2620-2626, 2013.
- GOETTEL, Jeremy A. *et al.* AHR activation is protective against colitis driven by T cells in humanized mice. **Cell reports**, v. 17, n. 5, p. 1318-1329, 2016.
- GOLLNICK, Paul *et al.* Complexity in regulation of tryptophan biosynthesis in *Bacillus subtilis*. **Annu. Rev. Genet.**, v. 39, p. 47-68, 2005.
- GOPHNA, Uri; KONIKOFF, Tom; NIELSEN, Henrik Bjørn. *Oscillospira* and related bacteria—From metagenomic species to metabolic features. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 3, p. 835-841, 2017.
- GORDON, Siamon. Elie Metchnikoff, the man and the myth. **Journal of innate immunity**, v. 8, n. 3, p. 223-227, 2016.
- GRAND, Richard J.; WATKINS, John B.; TORTI, Frank M. Development of the human gastrointestinal tract: a review. **Gastroenterology**, v. 70, n. 5, p. 790-810, 1976.

GREEN, Nicholas J.; GRUNDY, Frank J.; HENKIN, Tina M. The T box mechanism: tRNA as a regulatory molecule. **FEBS letters**, v. 584, n. 2, p. 318-324, 2010.

GU, Pengfei *et al.* Knocking out analysis of tryptophan permeases in *Escherichia coli* for improving L-tryptophan production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 15, p. 6677-6683, 2013.

GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, Cristina; QUINTANA, Francisco J. Regulation of the immune response by the aryl hydrocarbon receptor. **Immunity**, v. 48, n. 1, p. 19-33, 2018.

HONDA, Kenya; LITTMAN, Dan R. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 75-84, 2016.

HUANG, Lawrence *et al.* SCID/NOD mice model for 5-FU induced intestinal mucositis: Safety and effects of probiotics as therapy. **Pediatrics & Neonatology**, v. 60, n. 3, p. 252-260, 2019.

HUBBARD, Troy D.; MURRAY, Iain A.; PERDEW, Gary H. Indole and tryptophan metabolism: endogenous and dietary routes to Ah receptor activation. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 43, n. 10, p. 1522-1535, 2015.

HUTIN, David *et al.* Reduced colonic mucosal injury in 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin poly ADP-Ribose polymerase (TIPARP/PARP7)-deficient mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, p. 920, 2022.

HUTTENHOWER, C. *et al.* & Giglio, MG (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207.

IM, Dohyun *et al.* Ligand complex structures of l-amino acid oxidase/monooxygenase from *Pseudomonas* sp. AIU 813 and its conformational change. **FEBS Open bio**, v. 8, n. 3, p. 314-324, 2018.

ISLAM, Saif Ul. Clinical uses of probiotics. **Medicine**, v. 95, n. 5, 2016.

IVANOV, Ivaylo I. *et al.* Induction of intestinal TH17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 485-498, 2009.

JAHN, Linda; HOFMANN, Uta; LUDWIG-MÜLLER, Jutta. Indole-3-Acetic Acid Is Synthesized by the Endophyte *Cyanodermella asteris* via a Tryptophan-Dependent and-Independent Way and Mediates the Interaction with a Non-Host Plant. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 5, p. 2651, 2021.

JENKINS, Trisha A. *et al.* Influence of tryptophan and serotonin on mood and cognition with a possible role of the gut-brain axis. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 56, 2016.

JENNIS, M. *et al.* Microbiota-derived tryptophan indoles increase after gastric bypass surgery and reduce intestinal permeability in vitro and in vivo. **Neurogastroenterology & motility**, v. 30, n. 2, p. e13178, 2018.

JIAN, Ching *et al.* Early-life gut microbiota and its connection to metabolic health in children: Perspective on ecological drivers and need for quantitative approach. **EBioMedicine**, v. 69, p. 103475, 2021.

JOHNSTON, A. W. B.; BIBB, M. J.; BERINGER, J. E. Tryptophan genes in *Rhizobium*—their organization and their transfer to other bacterial genera. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 165, n. 3, p. 323-330, 1978.

JUSTINO, Priscilla FC *et al.* Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 559-567, 2015.

JUSTINO, Priscilla FC *et al.* Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **British journal of nutrition**, v. 111, n. 9, p. 1611-1621, 2014.

KALLIOMÄKI, Marko. El papel de la microbiota en la alergia. **Annales Nestlé (Ed. española)**, v. 67, n. 1, p. 19-26, 2009.

KALUŻNA-CZAPLIŃSKA, Joanna *et al.* How important is tryptophan in human health? **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 1, p. 72-88, 2019.

KAMADA, Nobuhiko *et al.* Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 5, p. 321-335, 2013.

KARU, Naama *et al.* Tryptophan metabolism, its relation to inflammation and stress markers and association with psychological and cognitive functioning: Tasmanian Chronic Kidney Disease pilot study. **BMC nephrology**, v. 17, p. 1-13, 2016.

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

KAWAMOTO, Shimpei *et al.* Foxp3⁺ T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 152-165, 2014.

KENNEDY, Katherine M. *et al.* Fetal meconium does not have a detectable microbiota before birth. **Nature Microbiology**, v. 6, n. 7, p. 865-873, 2021.

KERRY, Rout George *et al.* Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of food and drug analysis**, v. 26, n. 3, p. 927-939, 2018.

KHANNA, Peeyush; JORNS, Marilyn Schuman. Characterization of the FAD-containing N-methyltryptophan oxidase from *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1441-1450, 2001.

KHANNA, Peeyush; JORNS, Marilyn Schuman. Characterization of the FAD-containing N-methyltryptophan oxidase from *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1441-1450, 2001.

KIM, Chong-Su *et al.* Probiotic supplementation improves cognitive function and mood with changes in gut microbiota in community-dwelling older adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. **The Journals of Gerontology: Series A**, v. 76, n. 1, p. 32-40, 2021.

KOMATSU, Tiemy Rosana; BURITI, Flávia Carolina Alonso; SAAD, Susana Marta Isay. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

KRISHNAN, Smitha *et al.* Gut microbiota-derived tryptophan metabolites modulate inflammatory response in hepatocytes and macrophages. **Cell reports**, v. 23, n. 4, p. 1099-1111, 2018.

LAHHAM, Majd *et al.* The family of sarcosine oxidases: Same reaction, different products. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 704, p. 108868, 2021.

LANGILLE, Morgan GI *et al.* Microbial shifts in the aging mouse gut. **Microbiome**, v. 2, p. 1-12, 2014.

LAUKENS, Debby *et al.* Heterogeneity of the gut microbiome in mice: guidelines for optimizing experimental design. **FEMS microbiology reviews**, v. 40, n. 1, p. 117-132, 2016.

LEBLHUBER, Friedrich *et al.* Elevated fecal calprotectin in patients with Alzheimer's dementia indicates leaky gut. **Journal of neural transmission**, v. 122, p. 1319-1322, 2015.

LEE, Alfred Ian; SARSERO, Joseph P.; YANOFSKY, Charles. A temperature-sensitive TRPS mutation interferes with TRP RNA-binding attenuation protein (TRAP) regulation of TRP gene expression in *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 22, p. 6518-6524, 1996.

LEE, Chun Seng; RYAN, Elizabeth J.; DOHERTY, Glen A. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: the role of inflammation. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 14, p. 3751, 2014.

- LEVY, Maayan *et al.* Microbiota-modulated metabolites shape the intestinal microenvironment by regulating NLRP6 inflammasome signaling. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1428-1443, 2015.
- LI, Cai-Yan *et al.* Influence of differing carbohydrate sources on l-tryptophan metabolism by porcine fecal microbiota studied in vitro. **Livestock Science**, v. 120, n. 1-2, p. 43-50, 2009.
- LI, Hong-Li *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, p. 455, 2017.
- LI, Mengsha *et al.* Indole-3-acetic acid biosynthesis pathways in the plant-beneficial bacterium *Arthrobacter pascens* ZZ21. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 443, 2018.
- LI, Siqu *et al.* Bioinformatic prediction reveals posttranscriptional regulation of the chromosomal replication initiator gene *dnaA* by the attenuator sRNA *rnTRPL* in *Escherichia coli*. **RNA biology**, v. 18, n. 9, p. 1324-1338, 2021.
- LIM, Ye Heng *et al.* Rapid evaluation and optimization of medium components governing tryptophan production by *Pediococcus acidilactici* tp-6 isolated from Malaysian food via statistical approaches. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 779, 2020.
- LIN, Guang-Huey; CHANG, Chung-Yu; LIN, Huei-Ru. Systematic profiling of indole-3-acetic acid biosynthesis in bacteria using LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 988, p. 53-58, 2015.
- LIN, Lan; ZHANG, Jianqiong. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. **BMC immunology**, v. 18, n. 1, p. 1-25, 2017
- LIU, Ting *et al.* NF- κ B signaling in inflammation. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2017.
- LONGLEY, Daniel B.; HARKIN, D. Paul; JOHNSTON, Patrick G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature reviews cancer**, v. 3, n. 5, p. 330-338, 2003.
- MACPHERSON, Andrew J.; GEUKING, Markus B.; MCCOY, Kathy D. Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body. **Trends in immunology**, v. 33, n. 4, p. 160-167, 2012.
- MAMMALIAN GENE COLLECTION (MGC) PROGRAM TEAM*. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 26, p. 16899-16903, 2002.

MARCHIORI, Joana Mozer. **Efeito protetor de *Weissella paramesenteroides* WpK4 na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos.** 2020. 1–476 f. 2020. Dissertação de mestrado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

MARQUES, Tatiana M. *et al.* Influence of GABA and GABA-producing *Lactobacillus brevis* DPC 6108 on the development of diabetes in a streptozotocin rat model. **Beneficial microbes**, v. 7, n. 3, p. 409-420, 2016.

MARTEAU, P. The clinical importance of intestinal microbiota. **Gastroentérologie clinique et biologique**, v. 34, p. S93-S97, 2010.

MARTINS, F. S *et al.* Efeito do método de conservação na viabilidade, reativação, colonização intestinal e efeito imunomodulador de dois produtos probióticos contendo *Saccharomyces boulardii* ou *Saccharomyces cerevisiae*. **Higiene Alimentar**, v. 21, p. 460-461, 2007.

MATELSKA, Dorota *et al.* Classification, substrate specificity and structural features of D-2-hydroxyacid dehydrogenases: 2HADH knowledgebase. **BMC evolutionary biology**, v. 18, n. 1, p. 1-23, 2018.

MCCLERKLIN, Sheri A. *et al.* Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase-dependent auxin synthesis contributes to virulence of *Pseudomonas syringae* strain DC3000. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 1, p. e1006811, 2018.

MELIOR, Hendrik *et al.* Transcription attenuation-derived small RNA rnTRPL regulates tryptophan biosynthesis gene expression in trans. **Nucleic acids research**, v. 47, n. 12, p. 6396-6410, 2019.

MENEZES-GARCIA, Zélia *et al.* Colonization by Enterobacteriaceae is crucial for acute inflammatory responses in murine small intestine via regulation of corticosterone production. **Gut microbes**, v. 11, n. 6, p. 1531-1546, 2020.

MERINO, Enrique; JENSEN, Roy A.; YANOFSKY, Charles. Evolution of bacterial TRP operons and their regulation. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 2, p. 78-86, 2008.

METCHNIKOFF, Elie. The prolongation of life: optimistic studies, trans. **P. Chalmers Mitchell. New York: GP Putnam's Sons**, 1907.

MI, Hui *et al.* *Bifidobacterium infantis* ameliorates chemotherapy-induced intestinal mucositis via regulating T cell immunity in colorectal cancer rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 2330-2341, 2017.

MILLER, Terry L. *et al.* Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human feces. **Applied and environmental microbiology**, v. 43, n. 1, p. 227-232, 1982.

- MIOZZARI, G. F.; YANOFSKY, C. Translation of the leader region of the *Escherichia coli* tryptophan operon. **Journal of bacteriology**, v. 133, n. 3, p. 1457-1466, 1978.
- MIYAGI, Masaru *et al.* Indole-3-acetic acid synthesized through the indole-3-pyruvate pathway promotes *Candida tropicalis* biofilm formation. **Plos one**, v. 15, n. 12, p. e0244246, 2020.
- MONTELEONE, Ivan *et al.* Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, v. 141, n. 1, p. 237-248. e1, 2011.
- MUJAHID, Md; SASIKALA, Ch; RAMANA, Ch V. Aniline-induced tryptophan production and identification of indole derivatives from three purple bacteria. **Current microbiology**, v. 61, n. 4, p. 285-290, 2010.
- MUJAHID, Md; SASIKALA, Ch; RAMANA, Ch V. Production of indole-3-acetic acid and related indole derivatives from L-tryptophan by *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 1001-1008, 2011.
- MURGUÍA-PENICHE, Teresa *et al.* Intestinal mucosal defense system, Part 2. Probiotics and prebiotics. **The Journal of pediatrics**, v. 162, n. 3, p. S64-S71, 2013.
- NOLE, Katherine L. Baquerizo; YIM, Elizabeth; KERI, Jonette E. Probiotics and prebiotics in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 71, n. 4, p. 814-821, 2014.
- NZIOKI, H. S.; JAMOZA, J. E. Assessment of yield loss due to sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) infection in Kenya. **KESREF Tech. Bull**, v. 1, p. 1-9, 2006.
- OBERHÄNSLI, Thomas; DÉFAGO, Geneviève; HAAS, Dieter. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. **Microbiology**, v. 137, n. 10, p. 2273-2279, 1991.
- OECKINGHAUS, Andrea; GHOSH, Sankar. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 4, p. a000034, 2009.
- OH, N. S. *et al.* Mulberry leaf extract fermented with *Lactobacillus acidophilus* A4 ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. **Letters in Applied Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 459-468, 2017.
- ONG, Zhi Yi *et al.* Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis. **Radiation oncology**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2010.

PARTHASARATHY, Anuththaman *et al.* A three-ring circus: metabolism of the three proteogenic aromatic amino acids and their role in the health of plants and animals. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 5, p. 29, 2018.

PEDROSO, Silvia Helena Sousa Pietra. **Papel da microbiota intestinal no desenvolvimento e gravidade de mucosite induzida por irinotecano em modelo murino**. 2014. Dissertação de mestrado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

PETERS, J. C. Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. **Kynurenine and serotonin pathways: Progress in Tryptophan research**, p. 345-358, 1991.

PRADO, G. K. S. *et al.* *Weissella paramesenteroides* WpK4 ameliorate the experimental amoebic colitis by increasing the expression of MUC-2 and the intestinal epithelial regeneration. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 6, p. 1706-1719, 2020.

QIU, Peng *et al.* The gut microbiota in inflammatory bowel disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p. 102, 2022.

RAJOKA, Muhammad Shahid Riaz *et al.* Interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on gastrointestinal tract health. **Food Science and Human Wellness**, v. 6, n. 3, p. 121-130, 2017.

RAO, Reeta Prusty *et al.* Aberrant synthesis of indole-3-acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* triggers morphogenic transition, a virulence trait of pathogenic fungi. **Genetics**, v. 185, n. 1, p. 211-220, 2010.

RESENDIZ-NAVA, Carolina N. *et al.* A Comprehensive Evaluation of Enterobacteriaceae Primer Sets for Analysis of Host-Associated Microbiota. **Pathogens**, v. 11, n. 1, p. 17, 2022.

RIBEIRO, Ronaldo A. *et al.* Irinotecan-and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 78, n. 5, p. 881-893, 2016.

RICE, Jody E.; IHLE, Sherri L. Effects of diet on fecal occult blood testing in healthy dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 2, p. 134, 1994.

ROAGER, Henrik M.; LICHT, Tine R. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2018.

ROM, Joseph S.; HART, Meaghan T.; MCIVER, Kevin S. PRD-containing virulence regulators (PCVRs) in pathogenic bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021.

SAKURAI, Takuma; ODAMAKI, Toshitaka; XIAO, Jin-zhong. Production of indole-3-lactic acid by *bifidobacterium* strains isolated from human infants. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, p. 340, 2019.

SÁNCHEZ-PARRA, Beatriz *et al.* Characterization of four bifunctional plant IAM/PAM-amidohydrolases capable of contributing to auxin biosynthesis. **Plants**, v. 3, n. 3, p. 324-347, 2014.

SANDES, Sávio Henrique de Cicco. **O estresse e a colite dos pontos de vista microbiológico e farmacológico: uma abordagem gut-brain axis**. 2019. Tese de doutorado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

SARAF, Manish Kumar *et al.* Fórmula diet driven microbiota shifts tryptophan metabolism from serotonin to tryptamine in neonatal porcine colon. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2017.

SARKAR, Amrita; MANDAL, Santanu. *Bifidobacteria*—Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. **Microbiological research**, v. 192, p. 159-171, 2016.

SETHY, Chinmayee; KUNDU, Chanakya Nath. 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111285, 2021.

SHANG, Qingsen *et al.* Gut microbiota fermentation of marine polysaccharides and its effects on intestinal ecology: An overview. **Carbohydrate polymers**, v. 179, p. 173-185, 2018.

SHAO, Jiahui *et al.* Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2015.

SHAW, Michael H. *et al.* Microbiota-induced IL-1 β , but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 2, p. 251-258, 2012.

SHIMAZAKI, Junji *et al.* L-Tryptophan prevents *Escherichia coli* biofilm formation and triggers biofilm degradation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 419, n. 4, p. 715-718, 2012.

SIMAO, E. *et al.* Qualitative modelling of regulated metabolic pathways: application to the tryptophan biosynthesis in *E. coli*. **Bioinformatics**, v. 21, n. suppl_2, p. ii190-ii196, 2005.

SIMÃO, Eugênio. **Redes de regulação gênica: um modelo integrado da regulação do metabolismo do triptofano em *Escherichia coli* sob o formalismo de redes de petri**. 2006. Tese de doutorado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

SOBRADO, Pablo; FITZPATRICK, Paul F. Analysis of the roles of amino acid residues in the flavoprotein tryptophan 2-monooxygenase modified by 2-oxo-3-pentynoate: characterization of His338, Cys339, and Cys511 mutant enzymes. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 402, n. 1, p. 24-30, 2002.

SOHAIL, Asma *et al.* The viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM following double encapsulation in alginate and maltodextrin. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 2763-2769, 2013.

SONIS, Stephen *et al.* Unanticipated frequency and consequences of regimen-related diarrhea in patients being treated with radiation or chemoradiation regimens for cancers of the head and neck or lung. **Supportive Care in Cancer**, v. 23, p. 433-439, 2015.

SONIS, Stephen T. *et al.* Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 100, n. S9, p. 1995-2025, 2004.

SONNENBERG, Gregory F. *et al.* Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1321-1325, 2012.

SONNENBERG, Gregory F.; ARTIS, David. Innate lymphoid cell interactions with microbiota: implications for intestinal health and disease. **Immunity**, v. 37, n. 4, p. 601-610, 2012.

SOUGIANNIS, Alexander 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-G719, 2021.

SPAEPEN, Stijn; VANDERLEYDEN, Jos; REMANS, Roseline. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.

SPENCER, J. O. *et al.* The development of gut associated lymphoid tissue in the terminal ileum of fetal human intestine. **Clinical and experimental immunology**, v. 64, n. 3, p. 536, 1986.

SPENCER, N. J. Motility patterns in mouse colon: Gastrointestinal dysfunction induced by anticancer chemotherapy. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 28, n. 12, p. 1759-1764, 2016.

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

- STAVRUM, Anne-Kristin *et al.* Model of tryptophan metabolism, readily scalable using tissue-specific gene expression data. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 48, p. 34555-34566, 2013.
- STÜLKE, Jörg *et al.* PRD—a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. **Molecular microbiology**, v. 28, n. 5, p. 865-874, 1998.
- SUDO, N.; CHIDA, Y.; KUBO, C. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. **J Psychosom Res**, v. 58, n. 6, p. S60-S60, 2005.
- SUEZ, Jotham *et al.* The pros, cons, and many unknowns of probiotics. **Nature medicine**, v. 25, n. 5, p. 716-729, 2019.
- SUNDBERG, Richard. **The chemistry of indoles**. Elsevier, 2012.
- SZKOP, Michał; BIELAWSKI, Wiesław. tyrB-2 and phhC genes of *Pseudomonas putida* encode aromatic amino acid aminotransferase isozymes: evidence at the protein level. **Amino acids**, v. 45, n. 2, p. 351-358, 2013.
- TANG, Yan *et al.* Administration of probiotic mixture DM# 1 ameliorated 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis and dysbiosis in rats. **Nutrition**, v. 33, p. 96-104, 2017.
- TERRIER, Marie Céline Zanella *et al.* Recurrent *Clostridium difficile* infections: the importance of the intestinal microbiota. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 23, p. 7416, 2014.
- TEZUKA, Hiroyuki *et al.* Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 247-257, 2011.
- THORPE, Daniel W.; STRINGER, Andrea M.; GIBSON, Rachel J. Chemotherapy-induced mucositis: the role of the gastrointestinal microbiome and toll-like receptors. **Experimental Biology and Medicine**, v. 238, n. 1, p. 1-6, 2013.
- TILG, Herbert; ADOLPH, Timon E. Beyond digestion: the pancreas shapes intestinal microbiota and immunity. **Cell metabolism**, v. 25, n. 3, p. 495-496, 2017.
- TIMS, Sebastian *et al.* Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. **The ISME journal**, v. 7, n. 4, p. 707-717, 2013.
- TREMAROLI, Valentina; BÄCKHED, Fredrik. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 242-249, 2012.

- TUNG, David *et al.* *In vivo* effects of immunomodulators in a murine model of Fluorouracil-induced mucositis. **Current therapeutic research**, v. 72, n. 6, p. 262-272, 2011.
- TURNER, Patricia V. The role of the gut microbiota on animal model reproducibility. **Animal models and experimental medicine**, v. 1, n. 2, p. 109-115, 2018.
- VIKSTRÖM BERGANDER, Linda *et al.* Tryptamine serves as a pro-ligand of the AhR transcriptional pathway whose activation is dependent of monoamine oxidases. **Molecular Endocrinology**, v. 26, n. 9, p. 1542-1551, 2012.
- VYHLÍDALOVÁ, Barbora *et al.* Gut microbial catabolites of tryptophan are ligands and agonists of the aryl hydrocarbon receptor: a detailed characterization. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 7, p. 2614, 2020.
- WAGNER, Mary Ann; KHANNA, Peeyush; JORNS, Marilyn Schuman. Structure of the flavo co-enzyme of two homologous amine oxidases: Monomeric sarcosine oxidase and N-methyltryptophan oxidase. **Biochemistry**, v. 38, n. 17, p. 5588-5595, 1999.
- WALKER, David I. *et al.* A highly specific Escherichia coli qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. **Water research**, v. 126, p. 101-110, 2017.
- WANG, Sen *et al.* MyD88 adaptor-dependent microbial sensing by regulatory T cells promotes mucosal tolerance and enforces commensalism. **Immunity**, v. 43, n. 2, p. 289-303, 2015.
- WASSENAAR, T. M.; PANIGRAHI, Pinaki. Is a fetus developing in a sterile environment? **Letters in applied microbiology**, v. 59, n. 6, p. 572-579, 2014.
- WASTYK, Hannah C. *et al.* Gut-microbiota-targeted diets modulate human immune status. **Cell**, v. 184, n. 16, p. 4137-4153. e14, 2021.
- WELS, Michiel *et al.* An *in-silico* analysis of T-box regulated genes and T-box evolution in prokaryotes, with emphasis on prediction of substrate specificity of transporters. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2008.
- WESTRÖM, Björn *et al.* The immature gut barrier and its importance in establishing immunity in newborn mammals. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 1153, 2020.
- WIDNER, Bernhard; LEBLHUBER, F.; FUCHS, D. Increased neopterin production and tryptophan degradation in advanced Parkinson's disease. **Journal of neural transmission**, v. 109, p. 181-189, 2002.

WILLIAMS, Brianna B. *et al.* Discovery and characterization of gut microbiota decarboxylases that can produce the neurotransmitter tryptamine. **Cell host & microbe**, v. 16, n. 4, p. 495-503, 2014.

WINKLER, Wade C. Metabolic monitoring by bacterial mRNAs. **Archives of microbiology**, v. 183, n. 3, p. 151-159, 2005.

WITKIN, Steven S. The vaginal microbiome, vaginal anti-microbial defense mechanisms and the clinical challenge of reducing infection-related preterm birth. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 122, n. 2, p. 213-218, 2015.

WLODARSKA, Marta *et al.* Indoleacrylic acid produced by commensal *peptostreptococcus* species suppresses inflammation. **Cell host & microbe**, v. 22, n. 1, p. 25-37. e6, 2017.

YADAV, Ruby; SHUKLA, Pratyosh. An overview of advanced technologies for selection of probiotics and their expediency: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 15, p. 3233-3242, 2017.

YANG, Yue; SAUVE, Anthony A. NAD⁺ metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation for therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 12, p. 1787-1800, 2016.

YANOFSKY, Ch *et al.* The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, v. 9, n. 24, p. 6647-6668, 1981.

YAP, Ann-Chee *et al.* A new oxathiolane from *Enterobacter cloacae*. **Natural product research**, v. 29, n. 8, p. 722-726, 2015.

YESTE, Ada *et al.* IL-21 induces IL-22 production in CD4⁺ T cells. **Nature communications**, v. 5, n. 1, p. 3753, 2014.

YEUNG, Chun-Yan *et al.* Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model. **PLoS one**, v. 10, n. 9, p. e0138746, 2015.

YEUNG, Chun-Yan *et al.* Immune Modulation Effects of *Lactobacillus casei* Variety *ramnosus* on Enterocytes and Intestinal Stem Cells in a 5-FU-Induced Mucositis Mouse Model. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2021, 2021.

Yogesh *et al.* Bacterially derived tryptamine increases mucus release by activating a host receptor in a mouse model of inflammatory bowel disease. **IScience**, v. 23, n. 12, p. 101798, 2020.

YUAN, K.-T. *et al.* *Bifidobacterium infantis* has a beneficial effect on 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. **Beneficial microbes**, v. 6, n. 1, p. 113-118, 2015.

ZAPH, Colby *et al.* A expressão intrínseca de IKK- β nas células epiteliais regula a homeostase imune intestinal. **Natureza**, v. 446, n. 7135, pág. 552-556, 2007.

ZELANTE, Teresa *et al.* Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. **Immunity**, v. 39, n. 2, p. 372-385, 2013.

ZELANTE, Teresa *et al.* Tryptophan feeding of the IDO1-AhR axis in host-microbial symbiosis. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 640, 2014.

ZENDEBOODI, Fatemeh *et al.* Probiotic: conceptualization from a new approach. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 103-123, 2020.

ZHANG, Bi-Xian *et al.* Characterization and synthesis of indole-3-acetic acid in plant growth promoting *Enterobacter* sp. **RSC advances**, v. 11, n. 50, p. 31601-31607, 2021.

ZHANG, Liyan *et al.* Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in caco-2 cells. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 7, p. 1752-1756, 2005.

ZHANG, Ruofan *et al.* Effects of Dietary Indole-3-carboxaldehyde Supplementation on Growth Performance, Intestinal Epithelial Function, and Intestinal Microbial Composition in Weaned Piglets. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 2022.

ZHONG, Huanzi *et al.* Distinct gut metagenomics and metaproteomics signatures in prediabetics and treatment-naïve type 2 diabetics. **EBioMedicine**, v. 47, p. 373-383, 2019.

ZUBAY, G. *et al.* Detection and isolation of the repressor protein for the tryptophan operon of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, n. 5, p. 1100-1103, 1972.

ANEXOS

Anexo I - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) para os experimentos in vivo do presente estudo.



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 148/2019
Título do projeto: Avaliação do efeito protetor de Weissella paramesenteroides WpK4, Lactobacillus satsumensis 18P, Lactococcus lactis 4U, Leuconostoc mesenteroides 11U, Saccharomyces cerevisiae 6M e Saccharomyces cerevisiae 12S em modelo murino de mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil.
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Elisabeth Neumann
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Microbiologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 05/08/2019. Validade: 05/08/2019 à 04/08/2024

Belo Horizonte, 05/08/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

Atividades complementares

Palestras ministradas:

I) “Microbiologia de alimentos, microbiota intestinal e o impacto na saúde do hospedeiro”, na LIGA ACADÊMICA MULTIDISCIPLINAR DE BIOMEDICINA DO UNIBH em 12 de novembro de 2019 às 14 horas.

II) “Probióticos: o impacto de bactérias benéficas na saúde do hospedeiro”, no III WEBNAR DE BIOTECNOLOGIA E SAÚDE DO UNIFSJ, em 21 de maio de 2021.

Orientações:

I) Co-orientação – Prisca Nana (11/2019). Isolamento e caracterização de *Yarrowia lipolytica* de grãos de kefir do Brasil. Curso de graduação em Ciências Biológicas (UFMG).

II) Co-Orientação - Tainá Victória Lobo e Silva (07/2020). Caracterização probiótica e tecnológica da linhagem *Oenococcus oeni* 4R2 isolada de grãos de kefir de água. Curso de graduação em Ciências Biológicas (UFMG).

III) Orientação de TCC – Brenda Rocha de Paula Proti (12/2020). Bebidas fermentadas similares ao kefir existentes no mundo e suas propriedades microbiológicas e físico-químicas. Curso de graduação em Biomedicina (UniBH).

Artigos publicados

BENGOA, Ana A. *et al.* Physicochemical, immunomodulatory and safety aspects of milks fermented with *Lactobacillus paracasei* isolated from kefir. **Food Research International**, v. 123, p. 48-55, 2019.

PENIDO, Fernanda Corrêa Leal *et al.* Antagonistic lactic acid bacteria in association with *Saccharomyces cerevisiae* as starter cultures for standardization of sour cassava starch production. **Journal of food science and technology**, v. 56, n. 9, p. 3969-3979, 2019.

GUIMARÃES, Gabriele M. *et al.* Cocoa pulp as alternative food matrix for probiotic delivery. **Recent patents on food, nutrition & agriculture**, v. 11, n. 1, p. 82-90, 2020.

COLARES, Heloísa Carneiro *et al.* Optimization of bioprocess of *Schleiferilactobacillus harbinensis* Ca12 and its viability in frozen Brazilian berries (Açaí, *Euterpe oleracea* Mart.). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 2271-2285, 2021.

O artigo científico referente a tese de doutorado está em processo de escrita. Não foi possível adicioná-lo a tese, pois dois experimentos ainda estão em andamento até o

momento do envio da tese para a banca. A revista científica escolhida foi “Probiotics and antimicrobial proteins” cujo fator de impacto é 5.265.

Cursos e participação de eventos:

I) Organização de congresso • UFMG/ICB

- Membro da comissão organizadora VI simpósio de microbiologia da UFMG - Conecta SIM: Microbiologia interligada, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, realizado online de 03 a 6 de setembro de 2019.
- Membro da comissão organizadora “VII Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM 2020”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, realizado online de 03 a 6 de novembro de 2020.

II) Curso de capacitação online

- We certify that Gabriele Moreira Guimarães, participated in the course of “Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório” (Capacitation in the use and handling of laboratory animals) in distance learning mode that was coordinated by the Institute of Biomedical Sciences and the School of Veterinary Medicine and Animal Science from University of Sao Paulo (Sao Paulo, Brazil) with the support of REBIOTERIO - CNPq. São Paulo, 14 de agosto de 2020
- Certificamos que **Gabriele Moreira Guimarães**, participou do **Minicurso "Projeto e Segurança de Barragens"** ministrado pelo Eng. Thaynon Brendon Pinto Noronha, no dia 31 de agosto de 2020, durante o "I Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia – Um Mundo em Constante Transformação", realizado online e contabilizando carga horária total de 04 horas.

III) Participação de congressos

- We hereby certify that **Gabriele Moreira Guimarães** attended to the 2nd Associated International Laboratory Meeting (LIA 2019) - Bact-Inflam Conference, from August 21st to 23rd, 2019, at the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

- Certificamos que **Gabriele Moreira Guimarães** participou do “VII Simpósio de Microbiologia da UFMG - Conecta SIM”, promovido pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 03, 04, 05 e 06 de novembro de 2020 com duração total de 12h.
- Certificamos que **Gabriele Moreira Guimarães**, portador do CPF nº 125.744.536-70, participou do "I Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia - Um Mundo em Constante Transformação" realizado na Plataforma Even3, entre 31 de Agosto e 04 de setembro de 2020, contabilizando carga horária total de 30 horas.

IV) **Apresentação de trabalhos em congressos**

- COSTA, K.; **GUIMARÃES, G. M.**; COSTA, M. S.; NANA, P.; CORREIA, V. M., BARROS, K. O.; NICOLI, J.R., NEUMANN, E.; teve o seu trabalho “**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE KEFIR PRODUZIDO A PARTIR DE CULTURAS INICIADORAS LIOFILIZADAS DURANTE ESTOCAGEM E ARMAZENAMENTO REFRIGERADO**” apresentado no formato de **pôster** no “VI Simpósio de Microbiologia da UFMG – **CONNECTA SIM: Microbiologia Interligada**”, promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 03 e 04 de setembro de 2019
- MIRANDA, V.C.; ASSIS, H. C.; QUINTANILHA, M.F.; SOUZA, R.O.; SOUZA, E.L.S.; COSTA, K.; **MOREIRA, G.G.**; COSTA, B.G.; TRINDADE, L.M.; NICOLI, J.R.; CARA, D.C.; FERREIRA, C.M.; MARTINS, F.S.; teve o seu trabalho “**EFEITO PROBIÓTICO DE *Akkermansia muciniphila* E SUA ASSOCIAÇÃO COM *Bifidobacterium longum* 5 1A EM MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTAR**” apresentado no formato de **pôster** no “VI Simpósio de Microbiologia da UFMG – **CONNECTA SIM: Microbiologia Interligada**”, promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia do

Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 03 e 04 de setembro de 2019.

- MIRANDA, V.C.; ASSIS, H.C.; QUINTANILHA, M.F.; SOUZA, R.O.; COSTA, K.; MOREIRA, G.G.; COSTA, B.G.; TRINDADE, L.M.; NICOLI, J.R.; CARA, D.C.; MARTINS, F.S.; teve o seu trabalho “*Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 PROMOVE EFEITO PROBIÓTICO LOCAL, DOSE-DEPENDENTE EM MODELO *in vivo* DE ALERGIA ALIMENTAR”, apresentado no formato de pôster no “VI Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM: Microbiologia Interligada”, promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 03 e 04 de setembro de 2019.
- **EFEITO DO TRATAMENTO COM PROBIÓTICO *LACTOBACILLUS GASSERI* NA MANUTENÇÃO DA INTEGRIDADE EPITELIAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO.** De autoria de Johnatan Caetano Braz, Flaviano dos Santos Martins, Luísa Martins Trindade, Camila Megale Almeida-Leite, Karen Costa e **Gabriele Moreira Guimarães**, foi apresentado no IV Congresso Nacional de Alimentos e Nutrição e I Congresso de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição, realizado entre os dias 27 e 31 de maio de 2019.
- **EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM O PROBIÓTICO *LACTOBACILLUS GASSERI* NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM MODELO EXPERIMENTAL** de autoria de Johnatan Caetano Braz, Flaviano dos Santos Martins, Luísa Martins Trindade, Camila Megale Almeida-Leite, Karen Costa e **Gabriele Moreira Guimarães**, foi apresentado no IV Congresso Nacional de Alimentos e Nutrição e I Congresso de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição, realizado entre os dias 27 e 31 de maio de 2019.

