

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



## DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO TERAPÊUTICO DO LEITE FERMENTADO POR *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 EM MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDO PELO ANTINEOPLÁSICO 5-FLUOROURACIL**

**ORIENTADO: Luís Cláudio Lima de Jesus**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**

**COORIENTADORA: Dra. Pamela del Carmen Mancha-Agresti**

BELO HORIZONTE

Julho-2018

**LUÍS CLÁUDIO LIMA DE JESUS**

**EFEITO TERAPÊUTICO DO LEITE FERMENTADO POR *Lactobacillus delbrueckii*  
subsp. *lactis* CIDCA 133 EM MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDO  
PELO ANTINEOPLÁSICO 5-FLUOROURACIL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Genética pelo Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Coorientadora: Dra. Pamela del Carmen Mancha-Agresti

BELO HORIZONTE

2018

043 Jesus, Luís Cláudio Lima de.

Efeito terapêutico do leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* cidca 133 em modelo de mucosite intestinal induzido pelo antineoplásico 5-fluorouracil [manuscrito] / Luís Cláudio Lima de Jesus. – 2018.

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

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo. Co-orientadora: Dra. Pamela del Carmen Mancha-Agresti.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Genética. 2. Leite fermentado - Teses. 3. *Lactobacillus delbrueckii* - Teses. 4. Mucosite intestinal. 5. Probióticos - Teses. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Agresti, Pamela del Carmen Mancha. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



Pós-Graduação em Genética  
Departamento de Biologia Geral, ICB  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570




**"EFEITO TERAPÊUTICO DO LEITE FERMENTADO POR  
*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 EM MODELO DE  
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDO PELO ANTINEOPLÁSICO  
5-FLUOROURACIL"**

**Luís Cláudio Lima de Jesus**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador  
UFMG

  
Pamela Del Carmen Mancha Agresti - Coorientadora  
UFMG

  
Tatiani Uceli Maioli  
UFMG

  
Angélica Thomaz Vieira  
UFMG

  
Camila Prosperi de Castro  
CEFET

Belo Horizonte, 20 de julho de 2018.

*Dedico mais esta conquista a Deus, minha fortaleza, por ter me abençoado e iluminado.*

*Com AMOR, a toda minha família!*

## AGRADECIMENTOS

Até aqui nos ajudou o SENHOR!!

Agradeço a **DEUS**, por ser o progenitor da vida, pelas oportunidades preciosas concedidas por Ele para o aprendizado e evolução constantes, por seu Amor Infinito que me envolve todos os dias, fortalecendo meu coração diante de todas as vicissitudes da vida; por ter me concedido o dom da vida e da sabedoria, me guiando e dando forças em mais esta etapa da minha vida.

À toda minha família, em especial aos **meus pais Maria da Paz e Elisvaldo** que, com muito amor, me forneceram a base moral para que eu pudesse seguir meus próprios passos, com honestidade e respeito. Por serem meu porto seguro e meu maior exemplo de superação de vida.

Aos meus irmãos **Angélica e Edson**, que aos seus modos contribuíram para que eu alcançasse este objetivo.

Ao meu irmão, amigo de fé, camarada, colega, pai, **André Luiz**, pelos conselhos, incentivo, amizade, confiança e apoio durante estes 2 anos.

Aos meus anjos da guarda **Bárbara, Walfrido**, sua filha **Sara** (e seus **familiares**) pela hospitalidade, amizade, incentivo, imenso apoio nas mais diversas situações e por abrirem a porta do seu aconchego familiar para que eu pudesse chegar, desenvolver e concluir mais esta etapa na minha vida. Que Deus ilumine a vida de vocês com grandiosidade e prosperidade para toda eternidade. Meu imenso e eterno Obrigado.

Ao meu orientador, **Prof. Vasco**, por ter me aceitado em seu Laboratório, mesmo não me conhecendo profissionalmente e pessoalmente. Obrigado pela credibilidade, incentivo, pelo direcionamento, esclarecimentos, pela liberdade concedida e pela confiança em mim depositada desde o primeiro encontro.

À minha co-orientadora **Pamela**, por ter acreditado, e não ter desistido de mim, quando eu mesmo já não estava mais acreditando em mim e na minha capacidade. Obrigado pelos esclarecimentos, pelo apoio, pela amizade e pela paciência e entusiasmo que me fizeram perseverar até o fim. Muitíssimo obrigado.

À **Mariana** e **Camila**, pelo apoio, incentivo, amizade, pelos “puxões de orelha” e por me mostrarem que eu posso fazer muito mais daquilo que me proponho.

Aos meus amigos **Viviane**, **Nina** e **André**, pela amizade, apoio, palavras de motivação e ajuda nos experimentos. Obrigado pelos momentos de descontração, pelos risos e desabafos. Obrigado por me ouvirem sempre que eu estava angustiado e oferecerem o “ombro amigo” sem pedir nada, o que deu um rumo às minhas aflições e encheu de alegria os meus dias. Que todos tenham uma brilhante carreira! A caminhada é longa, mas a chegada será grandiosa.

À **Fernanda** e **Nathália**, pela simpatia e disponibilidade em me atender sempre que necessário.

À minha mãe científica **Prof. Silma Regina**, e às minhas amigas **Vanessa**, **Carol**, **Patricia**, **Marta** e **Lays**, pelas palavras de apoio, pelas críticas sempre construtivas que só me fizeram crescer pessoalmente e profissionalmente, pela amizade e sinceridade que ultrapassam a vida acadêmica, e pela determinação em me ajudar sempre que precisei.

Aos colaboradores, **Prof. Enio**, **Prof. Flaviano**, **Prof. André**, **Renata Salgado** e ao **Spencer**, que contribuíram significativamente para que este trabalho pudesse ser realizado.

À **CAPES**, pela bolsa concedida, e que me possibilitou permanecer em BH e continuar o Mestrado, pois sem isso acho que seria impossível ter chegado a este momento.

E a todos que direta ou indiretamente participaram dessa nova fase da minha vida da busca pela realização de um sonho, muito obrigado, essa vitória não é apenas minha, mas, sem dúvidas, nossa.

*“Minha terra tem Palmeiras,  
Onde canta o Sabiá,  
As aves, que aqui gorjeiam,  
Não gorjeiam como lá”*

*Gonçalves Dias*



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 Câncer.....	18
1.2 Estrutura e Mecanismo de ação do Antineoplásico 5-Fluorouracil (5-FU).....	19
1.3 Trato Gastrointestinal: barreira intestinal e seus componentes .....	21
1.4 Trato Gastrointestinal e Mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	25
1.5 Efeito do 5-FU sobre a microbiota e o sistema imune intestinal.....	27
1.6 Probióticos.....	31
1.7 <i>Lactobacillus sp.</i> e seu efeito em desordens inflamatórias intestinais .....	33
1.8 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133 .....	35
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	37
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	38
3.1 Objetivo Geral .....	38
3.2 Objetivos Específicos .....	38
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
4.1 Bactérias e condições de crescimento .....	39
4.3 Grupos experimentais e tratamento .....	39
4.4 Análise clínica dos animais .....	41
4.5 Análise dos consumos alimentar e hídrico .....	41
4.6 Análise do comprimento intestinal.....	41
4.7 Contagem de leucócitos totais .....	41
4.8 Análise histopatológica e morfométrica.....	41
4.9 PAS/Alcian Blue e contagem de células caliciformes.....	42
4.10 Determinação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO).....	43
4.11 Determinação da atividade da enzima Peroxidase Eosinofílica (EPO).....	44
4.12 Dosagem de sIgA no fluido intestinal .....	44
4.13 Determinação da permeabilidade intestinal.....	45
4.14 Análises Estatísticas .....	46
<b>5 RESULTADOS</b> .....	47
5.1 Leite fermentado por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133 não influencia no consumo alimentar e hídrico de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	47
5.2 Leite fermentado por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133 previne o encurtamento do intestino delgado de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU ...	49
5.3 Leite fermentado por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133 atenua a perda de peso dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	49

5.4 Leite fermentado por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133 reduz o infiltrado inflamatório em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	52
5.5 Leite fermentado por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133 atenua a leucopenia ocasionada pelo tratamento com 5-FU.....	53
5.6 Leite fermentado por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133 reduz os níveis de IgA secretória (sIgA) do fluido intestinal de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	54
5.7 Leite fermentado por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133 atenua o aumento da permeabilidade intestinal induzida por 5-FU.....	55
5.8 Leite fermentado por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133 melhora os parâmetros histopatológicos, morfométricos e previne a perda de células caliciformes no íleo de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU .....	56
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>9 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>70</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do quimioterápico 5-Fluorouracil.....	19
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil.....	20
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da mucosa intestinal.....	22
<b>Figura 4.</b> Ilustração esquemática da anatomia da barreira intestinal e seus componentes.....	23
<b>Figura 5.</b> Ilustração esquemática do eixo cripta-vilosidade intestinal.....	25
<b>Figura 6.</b> Desenho esquemático das quatro diferentes fases de desenvolvimento da mucosite intestinal e suas principais características..	27
<b>Figura 7.</b> Distribuição dos principais gêneros de bactérias ao longo do TGI.....	28
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática da interação entre a microbiota comensal e o sistema imune..	30
<b>Figura 9.</b> Mecanismos de ação de bactérias probióticas no TGI humano. ....	33
<b>Figura 10.</b> Delineamento Experimental.....	40
<b>Figura 11.</b> Efeito do leite fermentado por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> CIDCA 133 na variação do consumo alimentar de animais antes e após indução da mucosite..	47
<b>Figura 12.</b> Efeito do leite fermentado por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> CIDCA 133 na variação do consumo hídrico de animais antes e após indução da mucosite. ....	48
<b>Figura 13.</b> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> CIDCA 133 previne o encurtamento do intestino delgado induzido por 5-FU.....	49

<b>Figura 14.</b> Efeito de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> CIDCA 133 na perda de peso dos animais induzida por 5-FU.....	50
<b>Figura 15.</b> Infiltrado inflamatório no íleo de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com <i>Lactobacillus delbrueckii</i> CIDCA 133.. ..	52
<b>Figura 16.</b> Contagem de leucócitos totais dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com <i>Lactobacillus delbrueckii</i> CIDCA 133.. ..	53
<b>Figura 17.</b> Níveis de sIgA do fluido intestinal de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com <i>Lactobacillus delbrueckii</i> CIDCA 133.. ..	54
<b>Figura 18.</b> Permeabilidade intestinal de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com CIDCA 133.. ..	55
<b>Figura 19.</b> Análise histológica e morfométrica do íleo dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com <i>Lactobacillus delbrueckii</i> CIDCA 133. ....	56
<b>Figura 20.</b> Escores histológicos de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com <i>Lactobacillus delbrueckii</i> CIDCA 133.. ..	57
<b>Figura 21.</b> Número de células calciformes no íleo de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com <i>Lactobacillus delbrueckii</i> CIDCA 133.. ..	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Grupos experimentais, tratamentos e vias de administração.....	40
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros avaliados para a determinação dos escores histopatológicos, nas secções intestinais, relacionados ao desenvolvimento da mucosite induzida por 5-FU.....	42
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros avaliados para determinação do quadro clínico dos animais.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu$ l	Micro litro
$\mu$ M	Micro Molar
5-FU	5-Fluourouracil
ANOVA	Análise de Variância
BAL	Bactéria do Ácido Lático
CEBIO	Centro de Bioterismo
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CIDCA	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CIDCA 133
COX	Ciclo-oxigenase
CXCL	Ligante da Quimiocina Gro-Alpha
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentaacético
DSS	do inglês, <i>Dextran Sulfate Sodium</i>
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EPO	Peroxidase de Eosinófilos
FdUMP	Fluorodeoxiuridina monofosfato
FdUTP	Fluorodeoxiuridina trifosfato
FUTP	5-fluorouridina trifosfato
FDA	do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	do inglês, <i>Generally Recognized As Safe</i>
g	Grama
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
i.p	Intraperitoneal
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
ILCs	Células Linfóides Inatas
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
Kg	Kilograma
M	Molar
MAMP	Padrões Moleculares Associados a Micróbios

MBq	Megabecquerel
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MPO	Mieloperoxidase
MRS	Meio de cultura de Man, Rogosa e Sharpe
MUC	Mucina
NF- $\kappa$ $\beta$	Factor Nuclear kappa beta
NK	do inglês, <i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	O-fenilenodiamina
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PAS	Ácido Periódico Combinado de Schiff
PBS	Tampão fosfato-salino
PMSF	Fluoreto de fenilmetano sulfonil
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucléico
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
RPM	Rotação por minuto
SCFA	do inglês, <i>Short Chain Fatty Acids</i>
SFB	Bactérias Filamentosas Segmentadas
sIgA	Imunoglobulina A secretória
TGF- $\beta$	Fator de Transformação do Crescimento Beta
TGI	Trato Gastrointestinal
Th	do inglês, <i>T help</i>
TLR	do inglês, <i>Toll like Receptor</i>
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Treg	Linfócito T regulatório
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNLP	Universidade Nacional de La Plata
WHO	do inglês, <i>World Health Organization</i>
ZO-1	do inglês, <i>Zonula occludens 1</i>

## RESUMO

A mucosite intestinal é um efeito citotóxico de drogas antineoplásicas como o 5-Fluorouracil (5-FU), que se caracteriza por ulceração, inflamação, diarreia e intensa dor abdominal, sendo um problema grave na clínica médica. O uso de probióticos como *Lactobacillus sp.* pode ser uma estratégia terapêutica eficaz para aliviar o dano intestinal causado pela quimioterapia com 5-FU, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias no trato gastrointestinal. As propriedades probióticas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 têm sido reportadas apenas em estudos *in vitro*. Assim, neste trabalho avaliou-se o efeito terapêutico desta cepa bacteriana no modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU. Para isso, camundongos BALB/c foram divididos em quatro grupos experimentais e tratados por *continuous feeding* com leite não fermentado ou com leite fermentado contendo  $7,5 \times 10^7$  UFC/mL de *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133. Para indução da mucosite os animais receberam uma única injeção intraperitoneal de 5-FU (300 mg/kg). Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com CIDCA 133 preveniu a perda de peso dos animais, a secreção de sIgA, a leucopenia e o infiltrado inflamatório. Além disso, esta cepa bacteriana foi capaz de atenuar a redução do comprimento intestinal, bem como o número de células caliciformes. Também foi observada proteção contra o aumento da permeabilidade intestinal, com melhoria nos escores histológicos e na arquitetura tecidual. Com relação aos consumos hídrico e alimentar, não foram observadas diferenças entre os grupos de animais inflamados e tratados. Em conclusão, demonstrou-se que o tratamento com leite fermentado por CIDCA 133 foi capaz de prevenir os danos adversos à mucosa intestinal induzidos pela administração de 5-FU, revelando ser uma estratégia terapêutica promissora no tratamento da mucosite intestinal.

**Palavras-chave:** Quimioterapia. Inflamação intestinal. *Lactobacillus delbrueckii*. Processo anti-inflamatório.



## ABSTRACT

Intestinal mucositis is a cytotoxic effect of antineoplastic drugs like 5-Fluorouracil (5-FU) characterized by ulceration, inflammation, diarrhea and intense abdominal pain being a serious issue in clinical medicine. The use of probiotics like *Lactobacillus sp.* could be helpful strategy to alleviate intestinal damage caused by 5-FU chemotherapy, due of its anti-inflammatory and immunomodulatory properties in the gastrointestinal tract. The probiotic properties of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 have been only reported in *in vitro* studies. Thus, in this work we evaluated the therapeutic effect of this bacterial strain on 5-FU-induced intestinal mucositis model. For this, BALB/c mice were divided into four experimental groups and were fed daily by drinking non fermented milk or fermented milk containing *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 ( $7.5 \times 10^7$ CFU/mL). In order to induce mucositis, the animals received a single intraperitoneal injection of 5-FU (300 mg/kg). The results showed that treatment with CIDCA 133 was able to prevent weight loss of animals, leukopeny, secretion of sIgA and inflammatory infiltrate. In addition, this bacterial strain was able to attenuate loss of intestinal length as well as the number of goblet cells. Protection against increased intestinal permeability was also observed with improvement in histological scores and tissue architecture. Regarding water and food intake, no differences were observed between the inflamed and treated groups. In conclusion, we demonstrated that CIDCA 133-fermented milk treatment was able to prevent the adverse effects to the intestinal mucosa induced by 5-FU administration, revealing to be a promising therapeutic strategy in the treatment of intestinal mucositis.

**Keywords:** Chemoterapy. Intestinal inflammation. *Lactobacillus delbrueckii*. Anti-inflammatory process.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

O câncer é definido como um conjunto de doenças cuja característica principal é a proliferação anormal e descontrolada de células, que com o passar das rápidas divisões celulares podem se tornar agressivas, tendo a capacidade de se espalhar e invadir tecidos e órgãos de qualquer parte do corpo (metástase) (INCA, 2018).

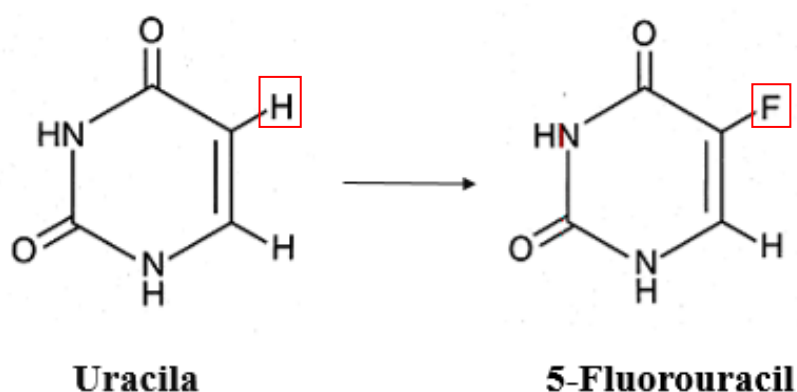
A etiologia genética desta doença deve-se ao surgimento de mutações em determinados genes relacionados à regulação do ciclo celular, os chamados protooncogenes, que se transformam em oncogenes, sendo estes responsáveis pela malignização (cancerização) das células (INCA, 2018). Associado à carga genética, fatores de risco como hábitos alimentares, estilo de vida, envelhecimento, histórico familiar, uso abusivo do álcool, tabagismo, uso descontrolado de medicamentos, exposição à radiação, agentes infecciosos como vírus e bactérias, dentre outros, são os fatores que contribuem para esta transformação celular e, conseqüentemente, aumentam as chances de uma pessoa desenvolver a referida doença (BLACKADAR, 2016; WHO, 2018).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda causa de morte em todo o mundo, sendo o câncer de pulmão (1,69 milhões de mortes), fígado (788.000 mortes), colorretal (774.000 mortes), estômago (754.000 mortes) e mama (571.000 mortes) os tipos mais incidentes e com grande taxa de mortalidade (WHO, 2018), principalmente entre os países em desenvolvimento. Apesar de sua alta incidência e mortalidade, o câncer é potencialmente curável quando detectado e tratado precocemente (INCA, 2018). O tratamento desta doença pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea, sendo às vezes necessária a combinação de mais de uma modalidade, a depender do tipo de câncer, grau de agressividade do tumor, como também do comprometimento físico e imunológico do paciente (MARLEY e NAN, 2016; INCA, 2018; WHO, 2018).

Quando as lesões tumorais não são totalmente curáveis pela radioterapia e/ou cirurgia ou tornam-se metastáticas, a primeira opção de tratamento é a quimioterapia (CHENG et al., 2013). A quimioterapia antineoplásica consiste no uso de drogas que destroem as células cancerosas, de forma a inibir seu crescimento e evitar sua disseminação (SHIELDS, 2017). O arsenal terapêutico comumente administrado no tratamento de neoplasias consiste no uso, isoladamente e/ou combinado, de drogas como 5-Fluorouracil (5-FU), Oxaliplatina, Irinotecano, Capecitabine, Cisplatina, Metotrexato, entre outras (MARIN et al., 2012; CASSIDY e SYED, 2017).

## 1.2 Estrutura e Mecanismo de ação do Antineoplásico 5-Fluorouracil (5-FU)

Entre as alternativas de tratamento com antineoplásicos destaca-se o emprego do 5-Fluorouracil (5-FU) (**Figura 1**), um antimetabólito, análogo da uracila, preparado a partir da substituição, no carbono 5, de um átomo de hidrogênio por um átomo de flúor (LONGLEY et al., 2003).

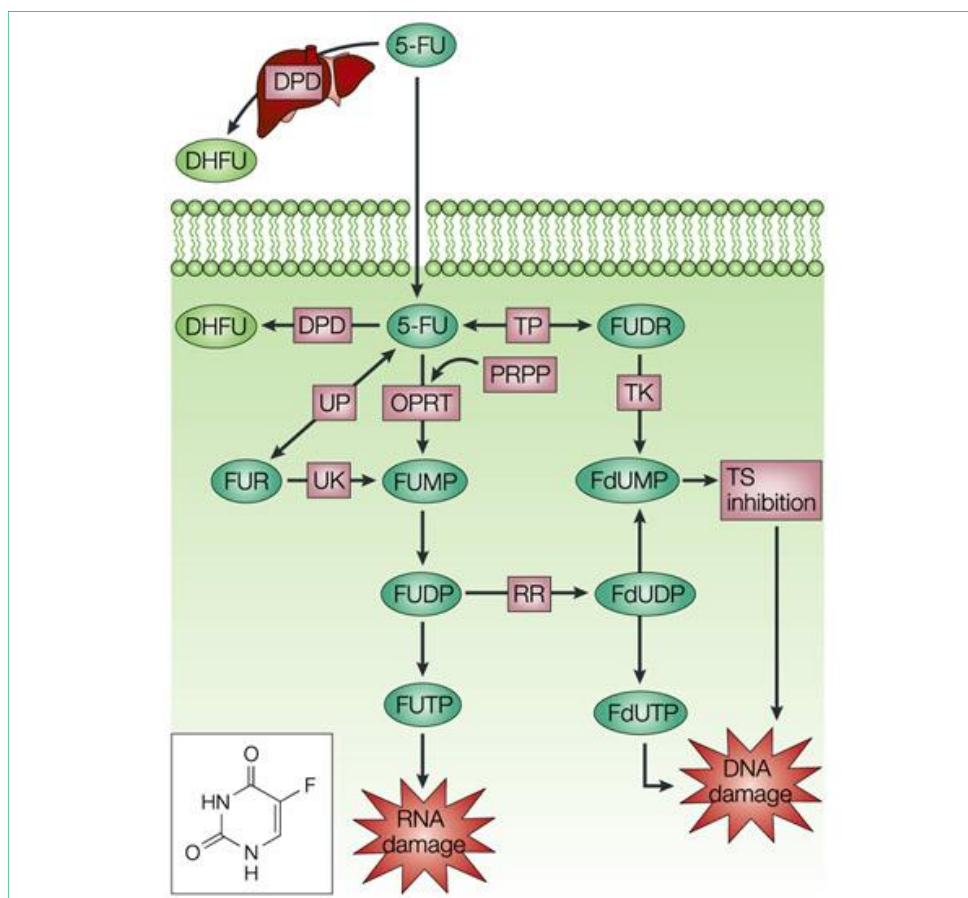


**Figura 1.** Estrutura química do quimioterápico 5-Fluorouracil. **Adaptada** de Longley et al. (2003).

Desenvolvido em 1957 e introduzido na terapia oncológica com o objetivo de inibir, por meio de seus metabólitos, a divisão celular e a proliferação de células cancerosas (HEIDELBERGER et al., 1957), o 5-FU é considerado atualmente um dos fármacos mais ativos, sendo essencial para o tratamento de uma variedade de tumores, principalmente os tumores gástricos, colorretais, de cabeça, pescoço e mama (LONGLEY et al., 2003; MARTINS et al., 2013; THOMAS et al., 2016).

O 5-FU, uma vez administrado, entra na célula e utiliza os mesmos mecanismos de transporte de seu análogo, a molécula de uracila (MIURA et al., 2010). Intracelularmente, o referido fármaco é metabolizado e convertido em três principais metabólitos ativos: fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) e 5-fluorouridina trifosfato (FUTP) (**Figura 2**). FdUMP se liga à enzima timidilato sintase, inibindo-a (McCARTHY et al., 1998), o que leva ao desbalanço do *pool* de nucleotídeos, diminuindo a concentração de desoxitimidina trifosfato (dTTP) (necessária para a síntese e reparo do DNA), aumentando a concentração de fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) e, como consequência, sua incorporação na cadeia de DNA, inibindo a síntese desta molécula. Por sua vez, FUTP é incorporado ao RNA, desencadeando danos à composição do mesmo,

gerando perda funcional e morte celular (LONGLEY et al., 2003; ZHANG et al., 2008; MIURA et al., 2010).



**Figura 2.** Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil. O 5-FU entra na célula e é metabolizado e convertido em três principais metabólitos ativos: fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) e 5-fluorouridina trifosfato (FUTP). FdUMP se liga à enzima timidilato sintase e ocasiona desbalanço de nucleotídeos inibindo, ao final do processo, a síntese de DNA. Por outro lado, FUTP é incorporado ao RNA, o que ocasiona perda funcional e morte celular. **Fonte:** Longley et al. (2003).

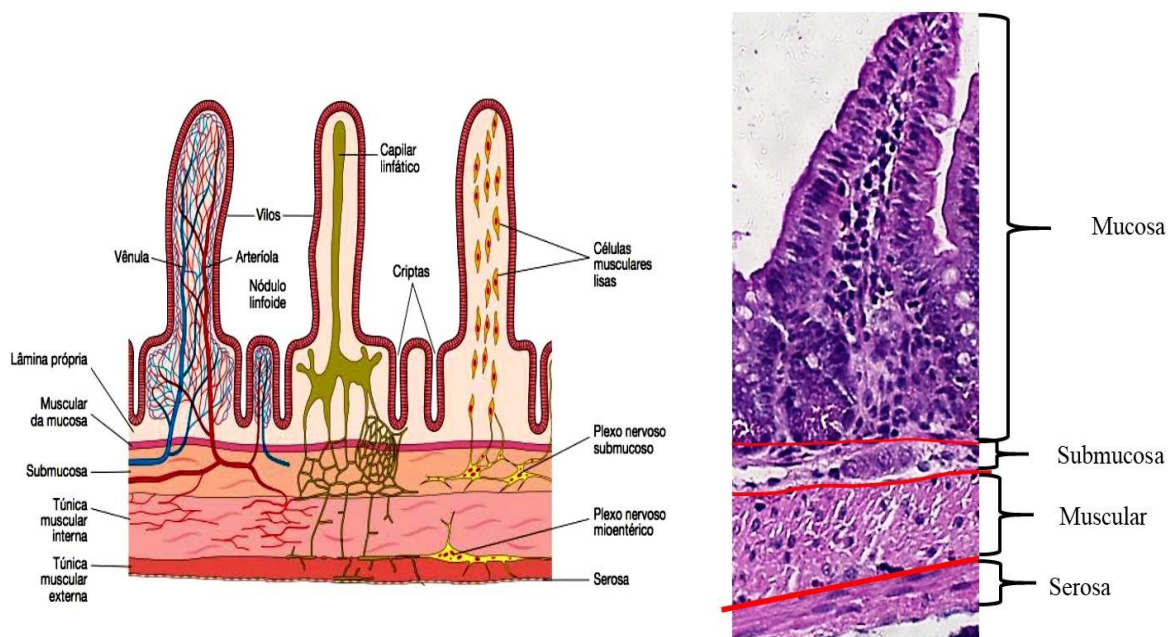
Além de atuar sobre as células cancerosas (ação antineoplásica), este fármaco atua sobre células normais (ALMEIDA et al., 2005), principalmente aquelas com elevada frequência de renovação, como as células da medula óssea e as células epiteliais do trato gastrointestinal (WANG et al., 2006; SOARES et al., 2013; SONG et al., 2016). Em decorrência disso, muitos pacientes submetidos ao tratamento com 5-FU apresentam diversos efeitos colaterais, como náusea, cardiotoxicidade (MOHAMED, 2009; SOVERI et al., 2014), leucopenia, alopecia, mielosupressão, diarreia, bem como mucosite oral e intestinal (THOMAS et al., 2016; CINAUSERO et al., 2017), sendo a mucosite uma das complicações mais prevalentes e um dos principais fatores limitantes para a continuidade do tratamento oncológico (SONIS, 2004). Considerando essas informações, faz-se necessária uma melhor compreensão dos aspectos relacionados ao trato gastrointestinal.

### 1.3 Trato Gastrointestinal: barreira intestinal e seus componentes

O trato gastrointestinal (TGI) compreende a cavidade oral, a faringe, o esôfago, o estômago, os intestinos delgado e grosso, reto, canal anal e o ânus (REED e WICKHAM, 2009). O TGI é revestido por uma parede composta por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular externa e serosa (**Figura 3**) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; REED e WICKHAM, 2009).

A camada mucosa é constituída por um epitélio de revestimento das cavidades úmidas do corpo humano, associado a um tecido conjuntivo denominado *lâmina própria*, sendo extremamente resistente ao baixo pH do estômago, capaz de absorver diferentes substâncias no intestino delgado e grandes quantidades de água no intestino grosso (CHENG et al., 2010), além de constituir uma barreira física à invasão de micro-organismos encontrados no intestino, ao mesmo tempo em que mantém uma contínua interação com estes (SALVO-ROMERO et al., 2015; KONIG et al., 2016).

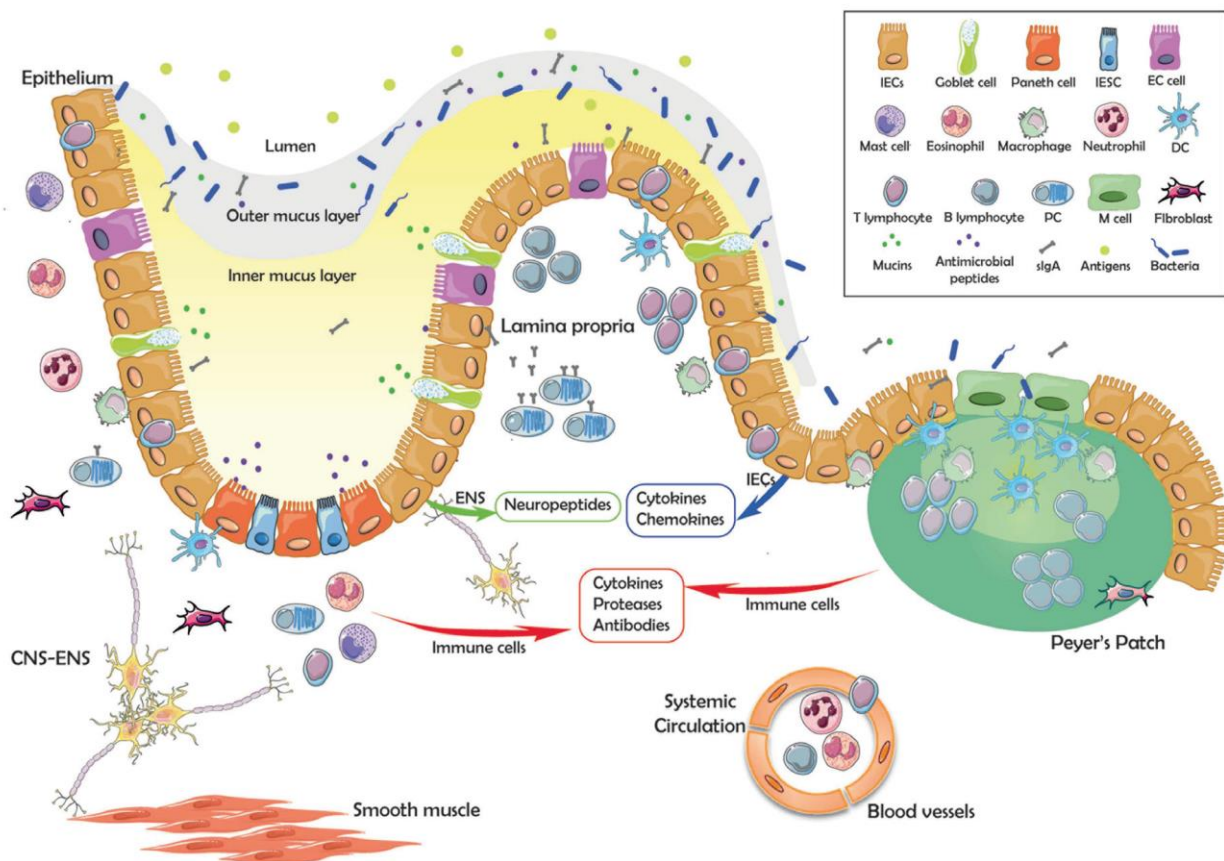
A submucosa é uma camada de tecido conjuntivo subjacente ao epitélio constituída por vasos sanguíneos e linfáticos, glândulas submucosas e plexo de Meissner (ou plexo nervoso submucoso), com gânglios do sistema nervoso autônomo, cujos neurônios controlam o músculo liso da camada muscular, a secreção de glândulas e o fluxo sanguíneo (REED e WICKHAM, 2009). Por sua vez, a camada muscular externa é formada por uma camada de músculo liso e possui camadas longitudinais internas circulares e externas de fibras musculares separadas pelo plexo de Auerbach, cujas inervações neurais controlam a contração desses músculos e, portanto, a ruptura mecânica e o peristaltismo dos alimentos dentro do lúmen (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Já a serosa é a camada mais externa da parede do intestino que fica mais distante do lúmen. É formada por vasos sanguíneos e linfáticos, tecido adiposo e tecido conjuntivo frouxo, cuja superfície é revestida por um epitélio pavimentoso denominado de mesotélio (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; REED e WICKHAM, 2009).



**Figura 3.** Representação esquemática da mucosa intestinal. O TGI é composto por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular externa e serosa, a qual evidenciam sua localização em relação ao lúmen intestinal. **Adaptado** de Junqueira e Carneiro, 2004.

A mucosa do TGI, além de possuir papel digestivo e de absorção de nutrientes, atua como uma barreira física e imunológica, tendo a capacidade de defender o organismo contra agentes potencialmente prejudiciais e evitando que micro-organismos, antígenos e fatores pró-inflamatórios atinjam o ambiente interno do intestino (SALVO-ROMERO et al., 2015; KONIG et al., 2016).

A barreira intestinal é categorizada de acordo com os diversos níveis de proteção, bem como pela localização e natureza dos seus componentes celulares e extracelulares (RESCIGNO, 2013; SALVO-ROMERO et al., 2015). Estes incluem principalmente a camada de muco com a microbiota comensal do intestino, os peptídeos antimicrobianos e moléculas de imunoglobulina A secretória (sIgA), a monocamada de células epiteliais especializadas e a *lâmina própria*, um tecido conjuntivo especial, no qual as células imunes inatas e adaptativas residem, tais como células T, células B, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas e as recentemente descobertas células linfóides inatas (ILCs) (VANCAMELBEKE e VERMEIRE, 2017) (**Figura 4**).



**Figura 4.** Ilustração esquemática da anatomia da barreira intestinal e seus componentes. A mucosa intestinal compreende uma camada de células epiteliais e uma região subepitelial que contém a *lâmina própria*, o sistema nervoso entérico, o tecido conjuntivo e as camadas musculares. O epitélio inclui enterócitos, células caliciformes, células de Paneth, células enteroendócrinas e células-tronco intestinais. Acima da barreira epitelial está a camada de muco, a microbiota e IgA secretória. Abaixo da camada epitelial está a *lâmina própria* constituída por macrófagos, células dendríticas, plasmócitos, neutrófilos e um tecido linfóide estruturado constituído por placas de Peyer, que contém células M, células dendríticas e linfócitos. **Fonte:** Salvo-Romero et al. (2015).

A primeira linha de defesa no trato gastrointestinal contra a invasão de micro-organismos patogênicos e moléculas externas é a camada de muco que recobre a superfície intestinal, evitando que agentes nocivos ao organismo entrem diretamente nas células epiteliais. As mucinas são os principais componentes da camada de muco, sendo a mucina 2 (MUC2) a proteína mais abundante na superfície intestinal (CAMILLERI et al., 2012; VANCAMELBEKE e VERMEIRE, 2017). Além disso, dentro desta camada do lúmen intestinal, micro-organismos e antígenos microbianos são degradados pelo pH, secreções gástricas, pancreáticas e biliares, bem como são inibidos por peptídeos antimicrobianos (AMPs), imunoglobulina A secretória (sIgA) e por bactérias comensais que impedem a colonização de patógenos por inibição competitiva e pela síntese de metabólitos, contribuindo para a homeostase intestinal (SALVO-ROMERO et al., 2015; KÖNIG et al., 2016).

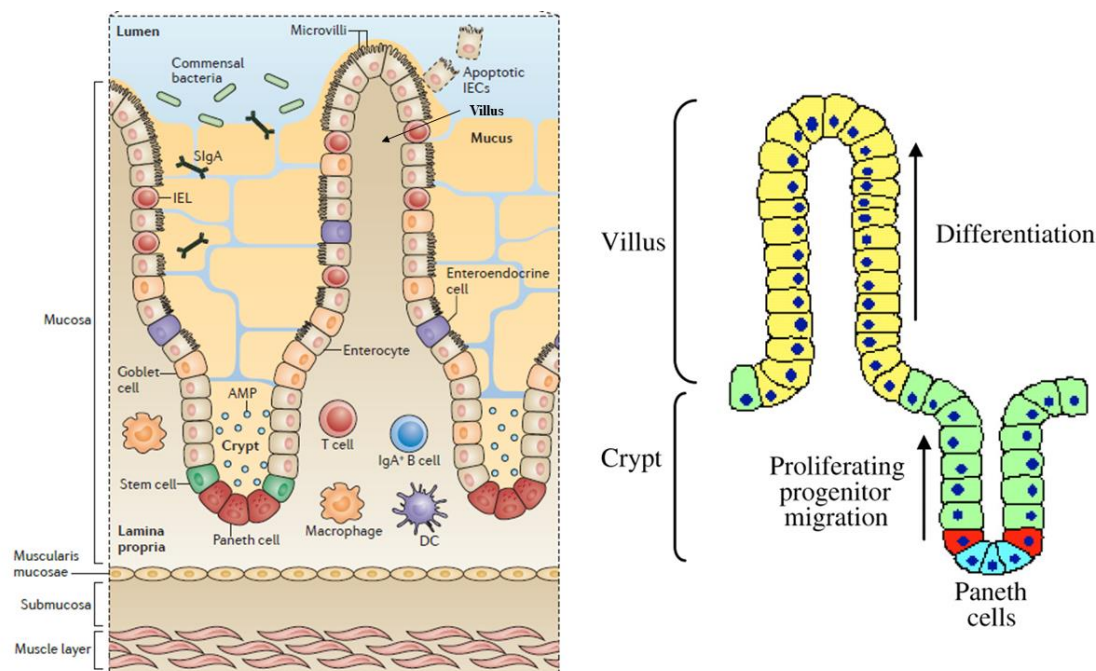


Abaixo da camada de muco, tem-se a camada epitelial, constituída por uma única camada de células epiteliais (enterócitos) e organizadas entre as vilosidades e criptas. Esta camada única de células é selada por proteínas denominadas *tight junctions*, tais como occludina, claudina e zonulina-1, que funcionam como uma vedação entre as células epiteliais adjacentes, impedindo a passagem paracelular de agentes exógenos (TURNER, 2009; PASTORELLI et al., 2013).

Embora a maioria das células da monocamada epitelial seja formada por enterócitos (cerca de 80%) (SALVO-ROMERO et al., 2015), deve-se destacar que os diversos papéis desempenhados pelo epitélio intestinal derivam da presença de outras células, como as células caliciformes (células secretoras de mucinas e peptídeos necessários à função de crescimento epitelial e reparo da mucosa), células de Paneth (células secretoras de peptídeos antimicrobianos, tais como defensinas e catelecidinas) e células enteroendócrinas (células produtoras de hormônios peptídicos que regulam o intestino, tais como gastrina, peptídeo inibidor gástrico e motilina). Algumas dessas células podem residir tanto nas vilosidades intestinais, que consistem em projeções ou dobras alongadas do intestino delgado formadas pelo epitélio intestinal, como nas criptas de Lieberkuhn (invaginações entre as vilosidades), locais onde são produzidas e renovadas a cada 3-5 dias, e de onde migram para as vilosidades superiores para adquirirem diferenciação final (**Figura 5**) (MARSHMAN et al., 2002; SALVO-ROMERO et al., 2015; SAILAJA et al., 2016).

Outras células que também merecem destaque são as células dendríticas, os linfócitos intraepiteliais e as células M (*microfold cells*), responsáveis, respectivamente, pelo reconhecimento e apresentação de antígenos às células especializadas do sistema imune, e pelo transporte de micro-organismos e partículas através da camada de células epiteliais, do lúmen intestinal até a *lâmina própria*, onde as interações com células imunes podem ocorrer (PETERSON e ARTIS, 2014; KÖNIG et al., 2016; VANCAMELBEKE e VERMEIRE, 2017).





**Figura 5.** Ilustração esquemática do eixo cripta-vilosidade intestinal. Principais processos imunológicos que ocorrem neste local, bem como a constituição celular das vilosidades e criptas intestinais. **Adaptado** de Mowat e Agace (2014).

#### 1.4 Trato Gastrointestinal e Mucosite intestinal induzida por 5-FU

Apesar de desempenhar um papel importante na homeostase do organismo, o TGI é particularmente susceptível à terapia oncológica devido à sua elevada taxa de renovação celular realizada pelas células estaminais localizadas nas zonas proliferativas entre as criptas e glândulas no intestino delgado (YU et al., 2013), sendo a mucosite intestinal um dos principais efeitos colaterais ocasionados pela radioterapia e por agentes quimioterápicos, como o 5-FU (TROTTI et al., 2003; ALMOKASHFY et al., 2016).

Estima-se que de 20 a 40% dos pacientes submetidos à dose padrão de 5-FU (12 mg/kg de peso corporal, durante três a quatro dias por via intravenosa) apresentam algum grau de mucosite, e que cerca de 80 a 100% dos pacientes submetidos a altas doses desenvolva a doença (CROMBIE e LONGO, 2016; CINAUSERO et al., 2017). Esse fato acaba comprometendo tanto a duração quanto a eficácia do tratamento oncológico, tornando-se, um grave problema na clínica médica.

A mucosite intestinal acomete principalmente o intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), sendo caracterizada por inflamação, perda celular da barreira epitelial intestinal, danos

aos vasos da submucosa, danos às criptas e também encurtamento das vilosidades, o que dificulta a absorção de nutrientes (DUNCAN e GRANT, 2003; KEEF et al., 2007; STRINGER et al., 2013; LEE et al., 2014). Além disso, é capaz de promover redução do número de células caliciformes (YEUNG et al., 2015) e hipersecreção de muco (STRINGER et al., 2013), infiltração de células inflamatórias na lâmina própria (SOARES et al., 2013), bem como a abertura das *tight junctions* (SONG et al., 2013), aumentando a permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, a predisposição a infecções por micro-organismos patogênicos e a ocorrência de diarreia (LI et al., 2017).

Segundo WU et al. (2011), a origem da mucosite induzida pela quimioterapia com 5-FU pode estar relacionada à morte celular dos enterócitos ocasionados pela droga, estando a sua patobiologia envolvida por uma sequência de eventos biológicos, descrita por Sonis (2004) em cinco fases: iniciação, resposta a danos primários, amplificação de sinais, ulceração e cicatrização (**Figura 6**).

A fase de **iniciação** ocorre logo após a administração do 5-FU, que após ser metabolizado, incorpora-se às moléculas de DNA/RNA promovendo alterações estruturais nas mesmas por meio de seus metabólitos e pela geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), as quais acabam ocasionando dano tecidual e/ou morte celular (SONIS, 2004; CINAUSERO et al., 2017).

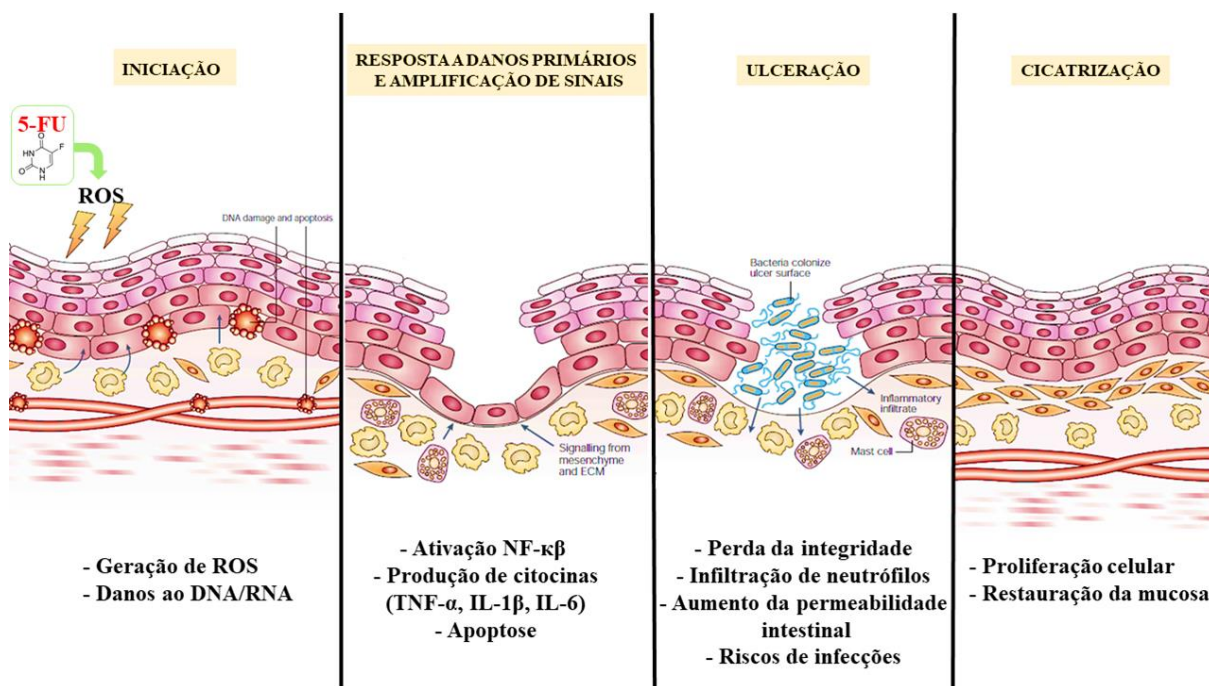
Em decorrência dos danos ocasionados ao DNA/RNA descritos anteriormente, na fase de **respostas a danos primários** ocorre a ativação de diversas vias de transdução de sinal como a via NF- $\kappa$ B (CHANG et al., 2012), que está diretamente relacionada à expressão de cerca de 200 genes, incluindo diversos mediadores inflamatórios, tais como IL-8, TNF- $\alpha$ , COX-2, IL-6, IL-1 $\beta$  e iNOS, que possuem papéis importantes na toxicidade da mucosa, resultando em dano tecidual (LOGAN et al., 2007; LI et al., 2017).

Na terceira fase, a presença das citocinas proinflamatórias, além de causar danos ao tecido, age indiretamente na **amplificação do sinal** via mecanismo de *feedback* positivo, ativando vias que aumentam a produção de citocinas como também o estresse oxidativo. Conseqüentemente, o aumento na produção desses fatores inicia uma cascata de reações inflamatórias que leva à ativação de metaloproteinasas de matriz, cuja produção culmina em danos teciduais adicionais, exacerbando a lesão (SONIS, 2004).

Na fase seguinte, a fase de **ulceração**, ocorre a perda da integridade da mucosa, na qual se desenvolvem ulcerações profundas, sintomáticas e mais propensas à infecção pela colonização de bactérias enteropatogênicas (CINAUSERO et al., 2017). Além disso, observa-se nesta fase o encurtamento das vilosidades, aumento da profundidade das criptas (SOARES

et al., 2013), e do infiltrado de células como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, que migram para o local da lesão via quimiotaxia, onde reconhecem, fagocitam e destroem as bactérias patogênicas e antígenos exógenos (SONIS, 2004; VILLA e SONIS, 2015).

Na última fase, há **cicatrização** espontânea das úlceras, com significativa proliferação celular cerca de 3 a 4 dias após o término do tratamento com a quimioterapia antineoplásica (DUCAN e GRANT, 2003), o que leva a restauração da mucosa.



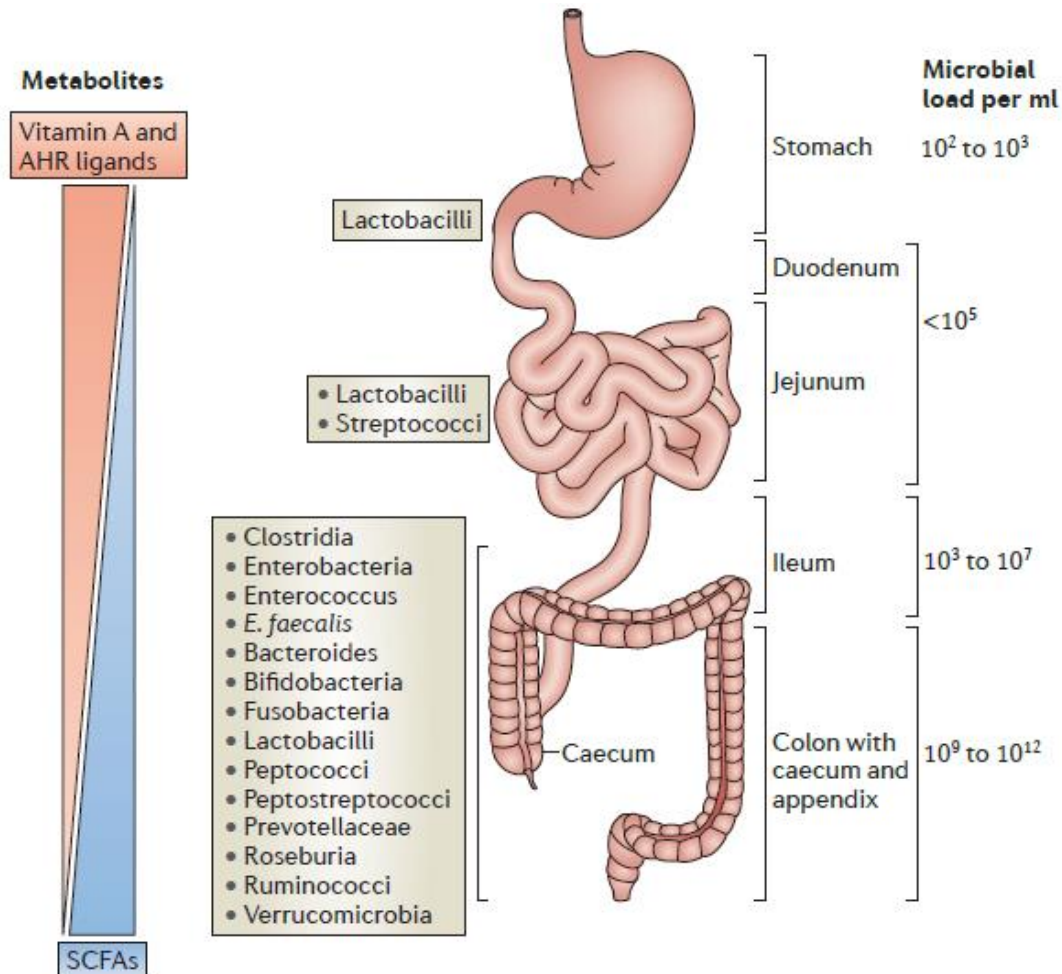
**Figura 6.** Desenho esquemático das quatro diferentes fases de desenvolvimento da mucosite intestinal e suas principais características. **Adaptado** de Sonis (2004).

### 1.5 Efeito do 5-FU sobre a microbiota e o sistema imune intestinal

O TGI humano é colonizado por uma vasta comunidade bacteriana, sendo a mucosa intestinal particularmente adaptada à colonização por essas bactérias comensais (SALVO-ROMERO et al., 2015).

O intestino é o principal habitat de micro-organismos comensais do organismo apresentando cerca de  $10^{14}$  micro-organismos de mais de 3500 espécies diferentes. Entretanto, a composição e a densidade das populações bacterianas em indivíduos adultos variam consideravelmente ao longo do TGI (**Figura 7**) (MOWATA e AGACE, 2014; JANDHYALA et al., 2015). Baixas concentrações e diversidade bacteriana (até  $10^3$  UFC/mL) são encontradas no TGI superior (estômago, duodeno, jejuno e íleo proximal), uma vez que a presença de ácido, sais biliares e secreções pancreáticas dificultam a colonização bacteriana

(GUARNER, 2006), de forma que não haja competição nutricional entre a microbiota e o hospedeiro (WALTER e LEY, 2011). Esta secção do TGI é colonizada principalmente por bactérias tolerantes a ácidos, tais como *Lactobacillus sp.* e *Streptococcus sp.* (MOWAT e AGACE, 2014). Por sua vez, um número bem maior de bactérias reside nos compartimentos inferiores do TGI (íleo distal e cólon), aonde esses números atingem concentrações de  $10^9$ - $10^{12}$  células/mL, constituindo assim o hábitat com a maior densidade microbiana conhecida até então (MOWAT e AGACE, 2014; JANDHYALA et al., 2015).



**Figura 7.** Distribuição dos principais gêneros de bactérias ao longo do TGI. **Fonte:** Mowat e Agace (2014).

Para se adaptar a essa vasta comunidade bacteriana, o intestino deve estar em constante interação com a mesma, de forma a manter a homeostase tanto do intestino isoladamente quanto do hospedeiro, uma vez que este fornece um habitat rico em nutrientes enquanto os micro-organismos podem desempenhar inúmeras funções benéficas, tais como exclusão de patógenos, produção de metabólitos essenciais como biotina, ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) e vitaminas (MOWAT e AGACE, 2014; SHREINER et al., 2015;

THURSBY e JUGE, 2017), além de contribuir para o desenvolvimento e modulação do sistema imunológico entérico e sistêmico (LANE et al., 2017) (**Figura 8**). No entanto, quando esta relação mutualista é comprometida e ocorre uma interação alterada entre células imunes intestinais e micro-organismos, a microbiota intestinal pode causar ou contribuir para o estabelecimento de doenças infecciosas, bem como contribuir para o desencadeamento de doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (OLIVEIRA et al., 2017).

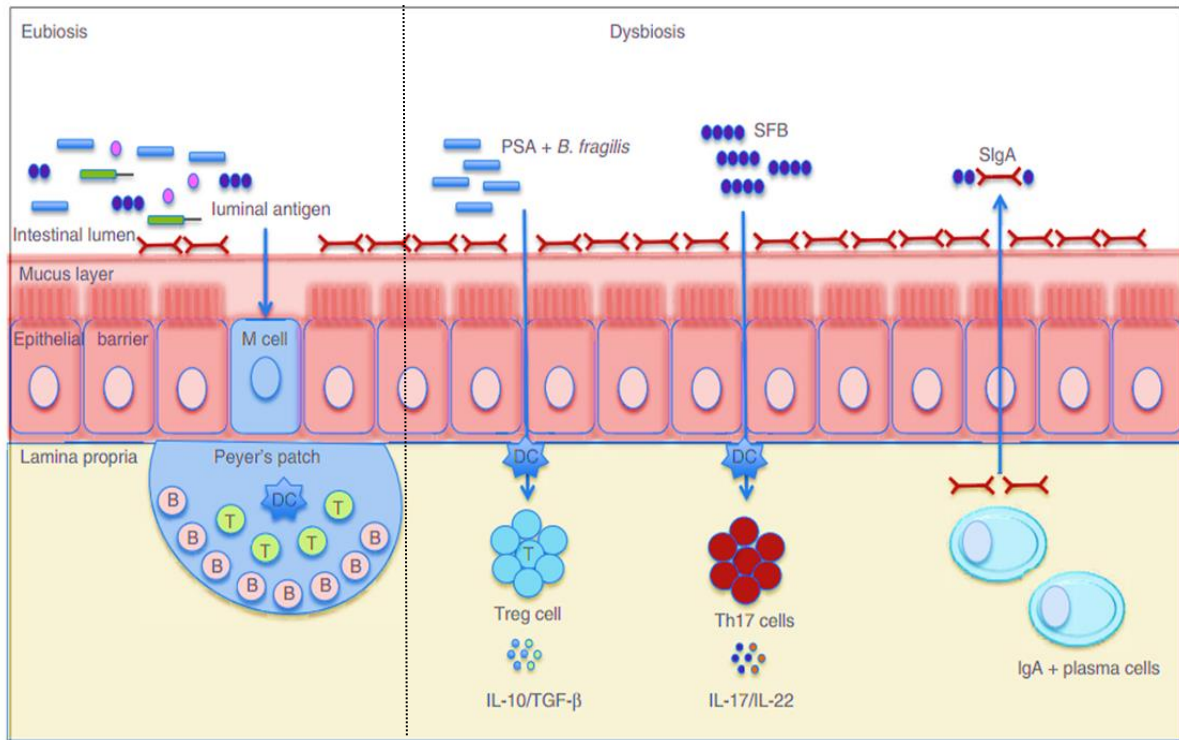
Nesse contexto, durante a homeostase entre células do epitélio intestinal e a microbiota comensal, as células do sistema imune entérico, como as células dendríticas e macrófagos, apresentam resposta fraca aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Dessa forma, os micro-organismos comensais induzem as células dendríticas a induzir a diferenciação de células secretoras de IgA e, por sua vez, a referida imunoglobulina regula a composição da microbiota intestinal (**Figura 8**) (TEZUKA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2017).

No entanto, quando ocorre a perda da homeostase intestinal por meio da degradação da barreira epitelial, há uma redução da diversidade microbiana comensal. Os enterócitos, via reconhecimento de padrões moleculares associados a micróbios (MAMPs) por receptores TLR (*Toll-like receptors*) e células M comunicam a disbiose microbiana ao sistema imunológico da mucosa (FORBES et al., 2016).

Por sua vez, a liberação de MAMPs por bactérias como as do gênero *Clostridium*, induzem as células epiteliais intestinais, macrófagos e células dendríticas ativadas a secretar citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, e IL-23 (HOOPER et al., 2012; BELKAID e HAND, 2014; OLIVEIRA et al., 2017). Essas citocinas, por sua vez, acabam estimulando o desenvolvimento de células Th1 e células Th17 produtoras de citocinas como IL-17A, IL-17F e IL-22 (**Figura 8**), resultando em inflamação crônica (HOOPER et al., 2012; ROOKS e GARRETT, 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

Por outro lado, a disbiose faz com que algumas bactérias comensais específicas, tais como *Bacteroides fragilis*, induzam a diferenciação de células T reguladoras (Treg) e a secreção de citocinas anti-inflamatórias (como por exemplo, IL-10 e TGF- $\beta$ ) (**Figura 8**), de forma a regular imunologicamente a mucosa intestinal e ajudar a proteger a barreira epitelial (OLIVEIRA et al., 2017).





**Figura 8.** Representação esquemática da interação entre a microbiota comensal e o sistema imune. Sob eubiose, micro-organismos comensais instruem as células dendríticas a induzir a diferenciação de células secretoras de IgA e, por sua vez, a IgA regula a composição da microbiota intestinal. Durante a disbiose, há diminuição da diversidade na microbiota comensal e interações desreguladas entre as células imunes e esses microorganismos, que acabam desempenhando papéis importantes no desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais. **Adaptado** de Oliveira et al. (2017).

Nesse contexto, Vliet et al. (2010) sugerem que severidade da mucosite ocasionada por agentes quimioterápicos tem influência crucial da microbiota intestinal. Essa hipótese é apoiada por alguns estudos que relatam que o tratamento com 5-FU altera a abundância relativa de diversos gêneros da microbiota gastrointestinal, como *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, e *Escherichia* (STRINGER et al., 2007; STRINGER et al., 2009), reduz a abundância relativa de filos bacterianos como *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Cyanobacteria*, e aumenta *Verrucomicrobia* e *Helicobacter* (LI et al., 2017), o que, conseqüentemente, pode afetar o sistema imune da mucosa devido ao desbalanço entre a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios, resultando em inflamação intestinal (AUTENRIETH e BAUMGART, 2017; HOLLERAN et al., 2017).

Assim, sabendo que a alteração da microbiota intestinal possui papel relevante para a progressão de distúrbios inflamatórios intestinais, como a mucosite (VON BULTZINGSLOWEN et al., 2003), a modulação da microbiota do indivíduo através da administração oral de bactérias probióticas é possivelmente uma alternativa terapêutica promissora.

## 1.6 Probióticos

Os probióticos são definidos como “*micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro*” (FAO/WHO, 2002; HILL et al., 2014). Grande parte dos probióticos estudados hoje em dia pertence ao grupo das Bactérias do Ácido Lático (BAL). As bactérias lácticas, que incluem principalmente espécies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Streptococcus*, constituem um grupo de micro-organismos gram-positivos, anaeróbicos ou aerotolerantes, não formadores de esporos e não móveis, e altamente tolerantes ao baixo pH. Entretanto, a principal característica desse grupo é a sua capacidade em produzir ácido lático como produto final da fermentação de carboidratos (WANG et al., 2016; MOKOENA, 2017).

Adicionalmente, estas bactérias são usadas em uma variedade de processos, incluindo produção e preservação de alimentos fermentados, como iogurtes, queijos, leites acidófilos, entre outros (SOCCOL et al., 2010). Estes produtos, por sua vez, servem como importantes veículos de entrega de bactérias probióticas (PANESAR, 2011), apresentando uma alta relevância para o setor industrial, alimentício e farmacêutico.

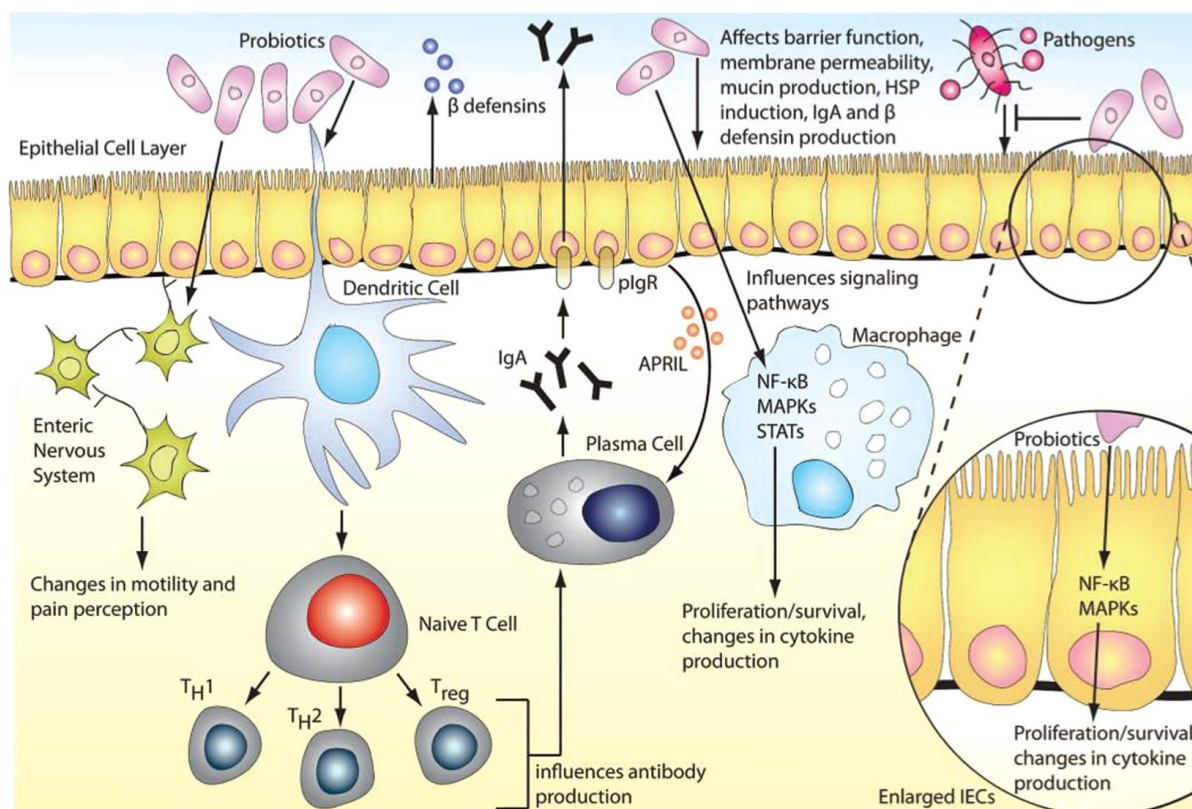
No que diz respeito à sua capacidade fermentativa, grande parte das BAL, principalmente *Lactobacillus*, tem sido amplamente aplicada na fermentação de alimentos (HELLER, 2001; TAMANG et al., 2016). Durante a fermentação, estes micro-organismos são capazes de crescer e converter a lactose em ácido lático, aumentando a acidez do meio, o que consequentemente inibe o crescimento de bactérias patogênicas e a deterioração, através da produção de peroxidases e bacteriocinas. Além disso, estes micro-organismos podem gerar sabor e textura aos produtos e promover a conservação de nutrientes e alimentos derivados do leite (WIDYASTUTI et al., 2014).

Deve-se destacar também que, durante o processo de fermentação do leite e após a sua ingestão, essas bactérias podem contribuir para melhorar a digestão dos nutrientes (lactose, proteínas, pequenos peptídeos, entre outros), fornecer micronutrientes essenciais (vitaminas) e outros compostos bioativos (metabólitos), com potenciais benefícios para a saúde do organismo hospedeiro (EBRINGER et al., 2008). Nesse contexto, alguns estudos têm mostrado que as proteínas do leite são consideradas a fonte mais importante de componentes bioativos, como lactoferrina, caseínas, Whey protein,  $\beta$ -lactoferrinas,  $\beta$ -lactoglobulinas, oligossacarídeos, entre outros. Um número crescente dessas moléculas foi identificado em hidrolisados de proteínas do leite e produtos lácteos fermentados (CLARE et al., 2003; KORHONEN e PIHLANTO, 2006), com uma variedade de efeitos, tais como prevenção contra inflamações entéricas (CORSELLO et al., 2017; ACURCIO et al., 2017), efeito

antimicrobiano (SINGH et al., 2015), anti-hipertensivo (USINGER et al., 2010), hipocolesterolêmico (AGERHOLM-LARSEN et al., 2000), imunomodulatório (GRANIER et al., 2013), antioxidante (MARYA et al., 2017) e anticancerígeno (MORENO de LEBLANC et al., 2005).

No que diz respeito à sua segurança para o consumo humano, a maioria das linhagens de BAL são consideradas seguras (GRAS-*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*), apresentando importante papel na manutenção da saúde e na prevenção de infecções humanas. Outras propriedades destacadas para esses micro-organismos são a capacidade de restaurar a microbiota intestinal (SHI et al., 2017), de eliminar agentes patogênicos (HALDER et al., 2017), e de induzir a produção de  $\beta$ -defensinas e IgA pelo hospedeiro (HEMARAJATA e VERSALOVIC, 2013). Adicionalmente, as BAL podem reforçar a barreira intestinal contra antígenos estranhos, manter a integridade das *tight junctions* das células epiteliais (BLACKWOOD et al., 2017), e induzir a produção de mucinas (ALIAKBARPOUR et al., 2012), o que poderia diminuir a severidade da diarreia relatada em pacientes sob terapia antineoplásica (MEGO et al., 2015). Estes micro-organismos podem também inibir a ativação da via NF- $\kappa$ B (KACI et al., 2011; GAO et al., 2015), apresentando propriedades imunomodulatórias (**Figura 9**), estimulando tanto a imunidade inata como a imunidade adaptativa do hospedeiro (HEMARAJATA e VERSALOVIC, 2013; UNDERWOOD et al., 2016). Por fim, estas bactérias podem produzir e secretar metabólitos com propriedades anti-inflamatórias capazes de prevenir e tratar certas infecções gastrointestinais (HUEBNER e SURAWICZ, 2006), doenças inflamatórias intestinais (PLAZA-DÍAZ et al., 2017) e autoimunes (OLIVEIRA et al., 2017).





**Figura 9.** Mecanismos de ação de bactérias probióticas no TGI humano. Os principais mecanismos de ação dos probióticos incluem aumento da barreira epitelial por meio da manutenção das *tight junctions* e produção de mucinas, aumento da adesão à mucosa intestinal e inibição concomitante da adesão de patógenos, exclusão competitiva de microrganismos patogênicos, produção de substâncias antimicrobianas e modulação do sistema imunológico. **Fonte:** Hemarajata e Versalovic (2013)

### 1.7 *Lactobacillus sp.* e seu efeito em desordens inflamatórias intestinais

As linhagens bacterianas com potencial probiótico mais estudadas pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, com várias cepas demonstrando excelentes propriedades tanto em estudos *in vitro* (PRESTI et al., 2015; ROCHA-RAMÍREZ et al., 2017) como *in vivo* (GOSMANN et al., 2017; AOKI et al., 2017), sendo que os benefícios atribuídos ao hospedeiro pela administração destes, bem como de outros probióticos, tem sido extensivamente demonstrado em dados que utilizam modelos animais e evidências clínicas, como a sua efetividade no tratamento de desordens inflamatórias intestinais como Doença de Crohn, Colite Ulcerativa, Mucosite Intestinal (GAREAU et al., 2010; MACK et al., 2011; ABRAHAM e QUIGLE, 2017), dentre outros.

Taxonomicamente, o gênero *Lactobacillus* pertence ao grupo de bactérias gram-positivas, Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem Lactobacillales e Família Lacobacillaceae (LILBURN e GARRITY, 2004). Pertencente ao grupo das Bactérias Lácticas, o gênero *Lactobacillus* compreende um grupo heterogêneo de mais de 200 espécies caracterizadas

(DUAR et al., 2017), que apresentam um baixo conteúdo GC no genoma (SALVETTI e O'TOOLE, 2017), sendo encontradas em diversos habitats, variando desde produtos alimentícios fermentados até as superfícies da cavidade oral do TGI e mucosa vaginal (SLOVER et al., 2008; DUAR et al., 2017).

Várias linhagens bacterianas do gênero *Lactobacillus* foram isoladas e têm tido seu potencial probiótico intensamente caracterizado, sendo publicados vários efeitos benéficos, principalmente ao que diz respeito ao seu efeito imunomodulatório e anti-inflamatório no TGI. Por exemplo, *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) diminuiu significativamente a suscetibilidade de ratos neonatos a infecção sistêmica por *E. coli* K1, conduzindo a altos níveis de expressão de MUC-2, IgA e a uma menor permeabilidade intestinal (HE et al., 2017). Por sua vez, a administração oral de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ327 apresentou propriedades anti-inflamatórias tais como, indução de resposta imune inata e adaptativa, modulação do equilíbrio entre células Th1, Th2, Th17 e Treg, redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-12), bem como capacidade de atenuar as alterações da arquitetura histológica do cólon em modelo de colite ulcerativa induzida por DSS (*Dextran Sulfate Sodium*) (ROCHA et al., 2014).

Outras linhagens de *Lactobacillus* também são alvo de investigação imunomodulatória, como a *Lactobacillus casei* BL23 e *Lactobacillus casei* ATCC393 que, respectivamente, apresentaram efeitos anticarcinogênicos e na prevenção de distúrbios inflamatórios intestinais (ROCHAT et al., 2007; LEE et al., 2015), reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-16, IL-17 e IL-22. Por sua vez, experimentos *in vitro* demonstraram que metabólitos derivados de *Lactobacillus rhamnosus* GG ou *Lactobacillus reuteri* DSM17938 possuem potencial em modular a ativação excessiva de células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup>, bem como de células *Natural killer* (NK) durante a infecção de células mononucleares de sangue periférico por *Staphylococcus aureus* (JOHANSSON et al., 2016).

No mais, algumas espécies de *Lactobacillus*, como por exemplo, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus rhamnosus* tem sido alvo de estudos sobre a modulação de danos intestinais induzidos pelo antineoplásico 5-FU, tanto *in vitro* (FANG et al., 2014) como *in vivo* (SMITH et al., 2008; YEUNG et al., 2015; JUSTINO et al., 2015; OH et al., 2017), demonstrando resultados promissores. Por exemplo, *Lactobacillus acidophilus* demonstrou ser capaz de diminuir a lesão intestinal ocasionada por 5-FU (450 mg/kg) através da inibição da sinalização da via NF- $\kappa$ B, uma vez que se observaram baixos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e da quimiocina CXCL-1 (JUSTINO et al., 2015).

Por sua vez, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus* (Lcr35) demonstrou ação anti-inflamatória sobre os danos teciduais ocasionados na mucosa intestinal pela administração, durante 5 dias, de 5-FU (30 mg/kg). Este probiótico reduziu a produção de citocinas proinflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), atenuou a perda de células caliciformes e reduziu a frequência de diarreia (YEUNG et al., 2015).

Adicionalmente, Oh et al. (2017) demonstraram que *Lactobacillus acidophilus* A4 melhora a severidade da mucosite intestinal induzida por 5-FU (150 mg/kg) através da estimulação da superexpressão de genes de mucina (MUC2 e MUC5AC), redução da atividade de mieloperoxidase (MPO) e inibição dos níveis de expressão de citocinas proinflamatórias, como a IL-1 $\beta$ . Por sua vez, um estudo *in vitro* conduzido por Prisciandaro et al. (2012) demonstrou que o pré-tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* GG foi capaz de prevenir ou inibir a apoptose das células epiteliais de ratos IEC-6 e reduzir a perda da função de barreira intestinal induzida por 5-FU (5  $\mu$ M).

Apesar desses probióticos exercerem efeitos benéficos como a redução apoptótica de enterócitos (PRISCIANDARO et al., 2012), modulação da inflamação (JUSTINO et al., 2015) e manutenção da função de barreira (YEUNG et al., 2013), sugerindo que a terapia à base desses micro-organismos pode ser uma estratégia terapêutica eficaz contra os efeitos adversos ocasionados pelo quimioterápico 5-FU, deve-se ressaltar que os efeitos imunomodulatórios e anti-inflamatórios dos *Lactobacillus sp.* reportados até então, bem como os seus efeitos benéficos demonstrados em pesquisas científicas são espécie e linhagem dependentes, havendo, portanto, a necessidade de se identificar e caracterizar novas espécies e cepas com potencial probiótico, e investigar seus efeitos em diferentes alvos ou doenças.

### **1.8 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133**

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 é uma cepa potencialmente probiótica, isolada de leite cru e que, em estudos *in vitro*, apresentou resistência à altas concentrações de ácido e sais biliares (KOCIUBINSKI et al., 1999), além de exercer ação antagonica ao crescimento de diferentes micro-organismos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, ambos envolvidos no processo de deterioração de alimentos (KOCIUBINSKI et al., 1996). Foi descrito também que esta linhagem apresenta ação antagonica frente os efeitos biológicos da *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (HUGO et al., 2008), resistência aos peptídeos antimicrobianos derivados de enterócitos (HUGO et al., 2010), bem como a capacidade de modular a atividade metabólica da

microbiota intestinal, por meio da inibição de atividades enzimáticas prejudiciais, como por exemplo, a nitrato redutase de *Escherichia coli* (HUGO et al., 2006).

Mais recentemente, demonstrou-se que a co-incubação de CIDCA 133 com células eucarióticas infectadas com *Bacillus cereus* e *Citrobacter rodentium*, respectivamente, reduziu o nível da citocina IL-8, aumentou o nível de TNF- $\alpha$  (ROLNY et al., 2016), bem como aumentou a fagocitose e a atividade antimicrobiana (HUGO et al., 2017) das células infectadas, demonstrando assim que esta cepa tem propriedades imunomodulatórias potenciais para controlar infecções em células eucarióticas.

Apesar de todas estas propriedades destacadas para esta linhagem bacteriana *in vitro*, não existem relatos na literatura que mostrem o potencial terapêutico dessa cepa em testes *in vivo*. Diante disso, surgiu o interesse em estudar o potencial protetor do leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 na mucosite intestinal ocasionada por 5-FU. Assim, objetivou-se investigar se a referida cepa é capaz de atenuar os danos ocasionados à mucosa intestinal gerados pela administração do antineoplásico 5-Fluorouracil em um modelo murino de mucosite experimental.

## 2 JUSTIFICATIVA

O 5-FU é um agente quimioterápico muito utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer. Entretanto, como resultado de sua não seletividade, apresenta vários efeitos tóxicos sobre células do TGI (SONIS, 2004; MARTINS et al., 2013; THOMAS et al., 2016), sendo a mucosite intestinal um dos principais efeitos adversos.

A mucosite intestinal é um efeito colateral resultante da terapia antineoplásica, caracterizada por uma lesão inflamatória ulcerativa que acomete principalmente o intestino delgado, o que acaba afetando a qualidade de vida do paciente, bem como comprometendo tanto a duração quanto a eficácia do tratamento (SONIS, 2004; CINAUSERO et al., 2017). Assim, sendo a mucosite um sério problema na clínica médica, e devido não haver tratamento disponível, torna-se relevante a busca por alternativas terapêuticas que visem reduzir ou amenizar este efeito colateral.

Os probióticos vem sendo vastamente explorados como ferramentas terapêuticas devido as suas propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias no trato gastrointestinal. Nesse contexto, alguns estudos têm investigado o uso de *Lactobacillus sp.* na redução dos danos inflamatórios intestinais ocasionados pela quimioterapia com 5-FU (HEMARAJATA e VERSALOVIC, 2013; YEUNG et al., 2015; JUSTINO et al., 2015; OH et al., 2017).

Adicionalmente, as propriedades probióticas/terapêuticas descritas para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 têm sido relatadas unicamente através de estudos *in vitro* (HUGO et al., 2008, ROLNY et al., 2016; HUGO et al., 2017), não havendo relatos na literatura que mostrem suas propriedades terapêuticas *in vivo*. Nesse contexto, sabendo que espécies de *Lactobacillus sp.* têm sido descritas como uma terapia eficaz para o tratamento de várias condições patológicas, e que os efeitos imunomodulatórios e anti-inflamatórios reportados até então são espécie e linhagem dependentes, este trabalho se propôs a avaliar o efeito terapêutico de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 em um modelo de mucosite intestinal induzido por 5-Fluorouracil, sendo um trabalho pioneiro na caracterização das propriedades terapêuticas dessa cepa bacteriana *in vivo*.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Avaliar o efeito terapêutico do leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 em modelo murino de mucosite intestinal induzida pelo antineoplásico 5-Fluorouracil.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Estudar o efeito gerado por CIDCA 133 na ingestão alimentar, hídrica, variação da massa corporal e comprimento intestinal dos animais.

- Avaliar o estado inflamatório da mucosa intestinal através da mensuração de fatores envolvidos na resposta inflamatória como atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) no íleo dos animais.

- Avaliar a barreira intestinal por meio do estudo da alteração na permeabilidade intestinal, contagem total de leucócitos sanguíneos, e estudo dos níveis de IgA secretória no fluido intestinal.

- Investigar parâmetros relacionados com a integridade da mucosa intestinal, por meio de análise dos escores histopatológicos e morfométricos, bem como o número de células caliciformes no íleo dos animais.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Bactérias e condições de crescimento

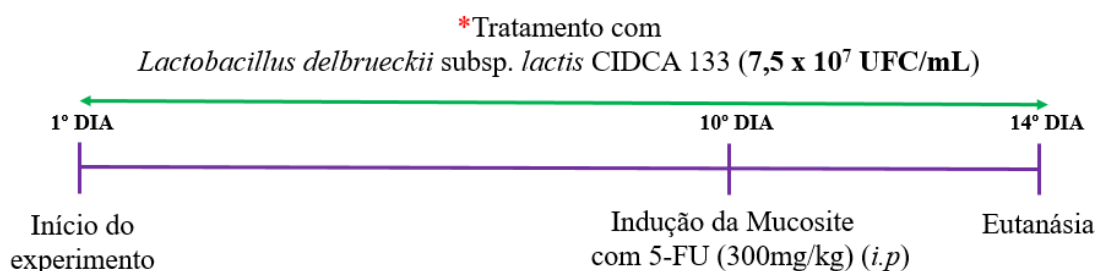
*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 (CIDCA 133) é originada da coleção de culturas do Centro de Investigação e Desenvolvimento em Criotecnologia de Alimentos (CIDCA) da Universidade Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, Argentina. CIDCA 133 foi cultivada em meio MRS-*deMann-Rogosa-Sharp* (Kasvi) a 37°C por 16 horas sem agitação e em condição de microaerobiose. Após esse tempo, 50 µL desta cultura foram reinoculados em 10 mL de meio leite (12% de leite em pó desnatado (Itambé), 2% de glicose (Vetec) e 1,2% de extrato de levedura (Kasvi)), previamente esterilizado por 15 min a 110°C, e crescida overnight a 37°C, sem agitação e em condição de microaerobiose. Após este período, foi realizada a diluição 1:100 do leite fermentado com CIDCA 133 em 40 mL de meio leite, para posterior administração nos animais por *continuous feeding*.

### 4.2 Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos BALB/c machos (25-30 g), com idade mínima de 6 semanas, obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos em mini-isoladores com condições controladas: temperatura em torno de  $21 \pm 2$  °C e ciclo alternado de 12h claro/12h escuro, com alimento *ad libitum* e água disponível até o início dos experimentos. Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram realizados de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) – UFMG (Protocolo: 114/2015).

### 4.3 Grupos experimentais e tratamento

O modelo de mucosite intestinal foi induzido de acordo com Carvalho et al. (2017), no qual os camundongos receberam uma única dose de 300 mg/kg de 5-FU (Fauldfluor<sup>®</sup>, lote 17F0272, Libbs, São Paulo, Brasil) no 10º dia de experimentação por via intraperitoneal (*i.p*), sendo eutanasiados no 14º dia (**Figura 10**). Como controle, foi utilizada solução salina 0,9% (NaCl 0,9%) estéril, pela mesma via.



**Figura 10.** Delineamento Experimental. Os grupos experimentais receberam meio leite não fermentado ou meio leite fermentado por CIDCA 133 durante 13 dias. No 10º dia de experimentação os animais receberam 300mg/kg de 5-FU (ou solução salina 0,9%) por via intraperitoneal e foram eutanasiados no 14º dia.

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (n=8 animais por grupo), sendo eles: **I**- CTL (controle negativo), **II** – CIDCA 133 (tratado com CIDCA 133, mas sem indução da mucosite), **III**- MUC (indução da mucosite com 5-FU, mas sem receber tratamento com CIDCA 133), **IV**- MUC+CIDCA 133 (indução da mucosite com 5-FU e tratado com CIDCA 133). Os referidos grupos foram tratados por *continuous feeding* apenas com meio leite não fermentado (**I**, **III**) ou com meio leite fermentado por CIDCA 133 ( $7,5 \times 10^7$  UFC/mL) (**II**, **IV**), não havendo outra fonte hídrica disponível. Todos os grupos e seus respectivos tratamentos estão descritos na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Grupos experimentais, tratamentos e vias de administração

Grupos Experimentais	Tratamento/Indução	Administração
CTL	Leite não fermentado+Salina 0,9%	Contínuos feeding+Intraperitoneal
CIDCA 133	Leite fermentado+Salina 0,9%	Contínuos feeding+Intraperitoneal
MUC	Leite não fermentado+5-FU (300mg/kg)	Contínuos feeding+Intraperitoneal
MUC+CIDCA 133	Leite fermentado+5-FU (300mg/kg)	Contínuos feeding+Intraperitoneal

Após o período de experimentação, os animais foram anestesiados (10 mg/kg de Xilazina e 100 mg/kg de Cetamina) (*i.p*) e o sangue foi extraído por meio de punção cardíaca. Posteriormente, o intestino de cada animal foi coletado mediante a um corte longitudinal, abertos a partir da borda anti-mesentérica e dividido em porções anatômicas conforme proposto por Ferraris e Vinnakota (1995), sendo a secção do duodeno correspondente a 20%, o jejunó a 60% e o íleo a 20% do comprimento total do órgão. Após este procedimento, as carcaças foram acondicionadas em freezer até o momento da coleta para incineração.



#### **4.4 Análise clínica dos animais**

O estado clínico dos animais foi mensurado pelos seguintes parâmetros: perda de peso, consistência das fezes e a presença de sangue oculto nas mesmas. Para isso, cada animal foi observado até que fosse possível coletar as fezes. A consistência das fezes foi mensurada pelo sistema de escore proposto por Bowen et al. (2007). Já o sangue oculto foi avaliado utilizando-se o kit Feca-Cult (INLAB, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Por sua vez, para avaliar ganho ou perda de peso, os animais foram pesados diariamente, sendo os valores encontrados expressos em porcentagem (%) da variação de peso em relação ao peso inicial.

#### **4.5 Análise dos consumos alimentar e hídrico**

Os consumos alimentar e hídrico dos animais foram avaliados por meio da diferença entre o peso e volume ofertado e o referente à sobra de ração e meio leite, respectivamente. O peso da ração foi aferido em balança semi-analítica durante todo o período experimental, sendo os valores expressos como média de consumo em gramas (para consumo de ração) e mililitros (para consumo de meio leite) por dia.

#### **4.6 Análise do comprimento intestinal**

Para avaliar o efeito do 5-FU e do leite fermentado por CIDCA 133 sobre o comprimento intestinal, o intestino delgado dos animais, que compreende a porção distal à incisão sobre o piloro até a válvula íleo-cecal, foi removido e medido com régua milimetrada, sendo o resultado expresso em centímetros.

#### **4.7 Contagem de leucócitos totais**

Após a coleta, o sangue dos animais foi acondicionado em microtubos contendo 100 µL de EDTA 10% para evitar coagulação. Posteriormente, a contagem total de leucócitos foi determinada utilizando-se contador hematológico automático (Bio-2900 Vet, Bioeasy, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os valores foram expressos como número de células x 10<sup>3</sup>/µL de sangue.

#### **4.8 Análise histopatológica e morfométrica**

A secção ileal dos animais foi coletada e, após a lavagem em PBS (0.1M), foi enrolada em forma de rocambole no sentido da porção proximal para a porção distal. Posteriormente, as amostras foram transferidas para a solução de formol 10% tamponado, onde foram

mantidas até seu processamento. O material foi submetido às técnicas histológicas de rotina e analisadas através de classificação histopatológica. O escore histológico de cada lâmina foi determinado utilizando o método previamente descrito por Soares et al. (2008) (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Parâmetros avaliados para a determinação dos escores histopatológicos, nas secções intestinais, relacionados ao desenvolvimento da mucosite induzida por 5-FU.

<b>Escore</b>	<b>Achados microscópicos</b>
<b>0</b>	Achados histológicos normais.
<b>1</b>	<b>Mucosa:</b> vilos encurtados, perda da arquitetura das criptas, infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. <b>Muscular:</b> normal
<b>2</b>	<b>Mucosa:</b> vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. <b>Muscular:</b> Normal
<b>3</b>	<b>Mucosa:</b> vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema. <b>Muscular:</b> edema, vacuolização e infiltrado neutrofilico.

Por fim, 10 campos histológicos da secção ileal de cada animal foram capturados aleatoriamente com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus BX41; objetiva 40x) acoplado ao sistema de aquisição de imagens (Software Spot Basic versão 3.4.5) e as imagens foram analisadas através do software *ImageJ* (versão 1.51j8), de forma a se medir a altura de 20 vilosidades e a profundidade de 20 criptas.

#### **4.9 PAS/Alcian Blue e contagem de células caliciformes**

As lâminas contendo secções do íleo foram processadas de acordo com Cawley et al. (1956). Para isso, elas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram mergulhados em solução de equilíbrio (ácido acético 3%) por 3 minutos e imersos em solução de Alcian Blue 1% (pH 2,5) por 5 segundos. Posteriormente, os cortes foram lavados com solução de equilíbrio e água destilada. Após esta etapa, as lâminas foram mergulhadas em solução aquosa de Ácido Periódico 0,5% por 5 minutos e incubadas no reagente de Schiff (Sigma, St Louis, USA) por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, coradas com Hematoxilina de Harris e lavadas em água corrente por 15 minutos. Após processadas e coradas, 10 campos histológicos, por lâmina, foram

capturados aleatoriamente com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus BX41; objetiva 40x) acoplado ao sistema de aquisição de imagens (Software Spot Basic versão 3.4.5). As células calciformes intactas foram então contadas com o auxílio do software *ImageJ* (versão 1.51j8), sendo os resultados expressos em número médio de células por campo.

#### **4.10 Determinação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)**

A extensão do infiltrado celular por neutrófilos no intestino delgado foi mensurada por meio da atividade da enzima mieloperoxidase, conforme descrito por Souza et al. (2000). Assim, cerca de 4 cm da porção correspondente ao íleo dos animais foram coletados, pesados e homogeneizados em Buffer 1 gelado (NaCl 0,1 M; Na<sub>2</sub>EDTA 0,015 M, pH 4,7) (proporção: 1,9 mL/100 mg de tecido) e centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e em seguida foram adicionadas as soluções de NaCl 0,2% gelado e NaCl 1,6% suplementado com glicose 5% (proporção: 1,5 mL/100 mg de tecido). As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi removido e ao conteúdo remanescente foi adicionado o Buffer 2 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5%, pH 5,4) (proporção: 1,9 mL/100 mg de tecido) em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas à temperatura ambiente, alternadamente, por três vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante foi coletado para o ensaio enzimático.

Para isso, 25 µL de cada amostra foram adicionadas à uma placa de 96 poços (Nunc-Immuno, MaxiSorp). Foram adicionados, à cada poço, 25 µL do substrato TMB 1,6 mM (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Sigma-Aldrich®), previamente diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). As amostras foram incubadas a 37°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de peróxido de hidrogênio 0,002% a cada poço e foi realizada nova incubação a 37°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M para interromper a reação, e a absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 450 nm, utilizando um leitor de microplacas (Bio-Rad modelo 450, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), sendo os resultados plotados em unidade de enzima por miligrama de tecido (U/mg).

#### **4.11 Determinação da atividade da enzima Peroxidase Eosinofílica (EPO)**

A extensão do infiltrado celular por eosinófilos no intestino delgado foi mensurada por meio da atividade da enzima peroxidase eosinofílica, conforme descrito por Strath e Sanderson (1985). Para isso, cerca de 4 cm da porção correspondente ao íleo do intestino dos animais foram coletados, pesados e homogeneizados em PBS 0.5M (proporção: 1,9 mL/100mg de tecido) e, em seguida, centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foi adicionada a solução de NaCl 0,2% e a solução de NaCl 1,6% acrescida de glicose 5% (proporção: 500 µL/100 mg de tecido). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado remanescente foi novamente suspenso com Hexadecyltrimethylamonium Bromide (HTAB) 0,5% diluído em PBS (pH 7,4; proporção: 1,9 mL/100 mg de tecido). Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e congeladas em nitrogênio líquido, e descongeladas à temperatura ambiente, alternadamente, por três vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante foi coletado para o ensaio enzimático.

Para tal, 75 µL de cada amostra amostras foram adicionados à placa de 96 poços (Nunc-Immuno, MaxiSorp). Em seguida, foram adicionados 75 µL do cromógeno O-fenilenediamina diidroclorato 1,5 mM (OPD) (Sigma-Aldrich®) diluídos em tampão Tris-HCl 0,075 mM (pH 8,0) acrescidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6,6 mM. Posteriormente, a placa foi incubada a 20°C por 30 minutos ao abrigo da luz. Após esse período, foram adicionados 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M para interromper a reação e a absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 492 nm, utilizando um leitor de microplacas (Bio-Rad modelo 450, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), sendo os resultados plotados em unidade de enzima por miligrama de tecido (U/mg).

#### **4.12 Dosagem de sIgA no fluido intestinal**

Os níveis de sIgA total foram determinados por ensaio imunoenzimático (ELISA), conforme descrito por Martins et al. (2009). Para isso, o conteúdo do intestino delgado foi retirado, pesado e 2 mL de PBS (pH 7,2) suplementado com inibidores de protease (1 µM de aprotinina; 25 µM de leupeptina; 1 µM de pepstatina e 1 mM de PMSF) foram acrescentados para cada 500 mg do conteúdo. Depois de centrifugado a 5.000 rpm por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e congelado a -80°C, para posterior dosagem da imunoglobulina.

Para a titulação dos níveis de sIgA, placas de microtitulação (placas Nunc-Immuno, MaxiSorp) foram revestidas com anticorpos anti-IgA de camundongos produzidos em cabra

(M-8769, Sigma, St. Louis, USA) diluídos em tampão de revestimento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M; NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 9,6) durante 18 horas a 4°C. Em seguida, a placa foi lavada 5 vezes com solução de lavagem (PBS 0.1M contendo 0,05% de Tween 20) e cada poço foi bloqueado com 200 µL de solução de bloqueio (albumina 1% em PBS Tween 20) durante 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi lavada por 5 vezes com solução de lavagem, e os fluidos intestinais previamente diluídos (1:500) em PBS 0.1M contendo 0,05% de Tween 20 foram adicionados à placa e incubados à temperatura ambiente por 1 hora. Após isso, a placa foi lavada 5 vezes com solução de lavagem, acrescentou-se 100 µL do anticorpo anti-IgA conjugado com peroxidase (A 4789 - Sigma, St. Louis, MO, EUA) previamente diluído (1:1000) em PBS 0.1M contendo 0,05% de Tween 20 e a placa foi incubada à temperatura ambiente por mais 1 hora. Logo em seguida, a placa foi lavada por 5 vezes com solução de lavagem, revestida com 100 µL/poço de OPD (1mg/mL) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 0,04% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a reação foi interrompida pela adição de 20 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e a absorbância foi medida a 492 nm utilizando um leitor de microplacas (Bio-Rad modelo 450, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), sendo os resultados da concentração de sIgA expressos em µg/mL de conteúdo intestinal.

#### 4.13 Determinação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi avaliada pela determinação da radioatividade no sangue após a administração oral de Ácido Dietilenotriamina Penta Acético (DTPA) marcado com <sup>99m</sup>tecnécio (<sup>99m</sup>Tc-DTPA) (GENEROSO et al., 2011). Para isso, os animais receberam por gavagem, no dia da eutanásia, 100 µL de solução contendo 18,5 MBq de <sup>99m</sup>Tc-DTPA. Após 4 horas, os animais foram anestesiados (10 mg/kg de Xilazina e 100 mg/kg de Cetamina) (*i.p*) e 300 µL de sangue foram coletados por punção cardíaca. A radioatividade foi avaliada em contador de radiação gama (Wizard, PerkinElmer) conforme instruções do fabricante, sendo os dados expressos em porcentagem (%) da dose de <sup>99m</sup>Tc-DTPA/g, de acordo com a equação abaixo, onde cpm= contagem por minuto:

$$\% \text{ dose de } ^{99m}\text{Tc-DTPA no sangue} = \frac{(\text{Cpm/g de sangue})}{\text{Cpm da dose (Padrão) administrada}} \times 100$$

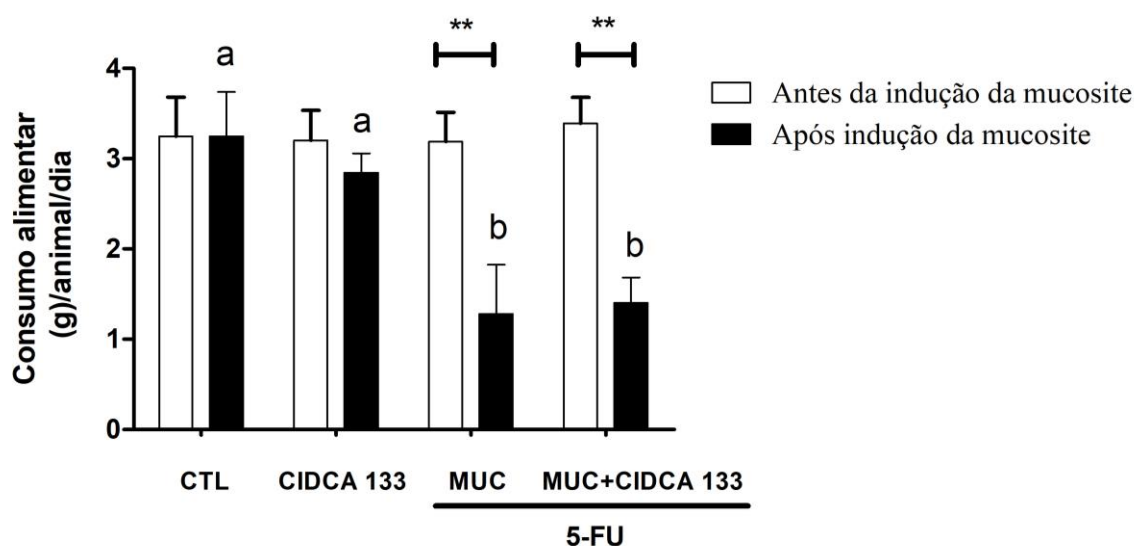
#### **4.14 Análises Estatísticas**

A normalidade na distribuição dos dados foi avaliada através do teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição normal (paramétricos) foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni. Os dados que apresentaram distribuição não-normal (não-paramétricos) foram submetidos à análise de variância não-paramétrica aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de múltiplas comparações de Dunns. Para a comparação entre a variação do peso corporal entre os grupos experimentais foi utilizado o teste Two-ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Por sua vez, o consumo hídrico e alimentar entre os grupos experimentais antes e após indução da mucosite foi mensurado aplicando-se o teste de Mann-Whitney (dados não paramétricos). Todos os dados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0, sendo considerados valores estatisticamente significativos aqueles com  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

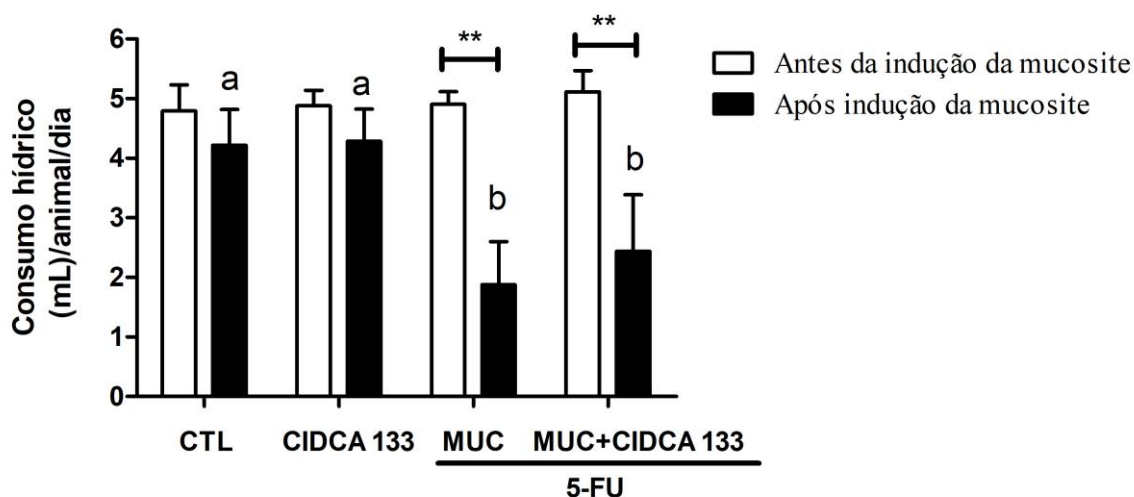
### 5.1 Leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 não influencia no consumo alimentar e hídrico de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Antes da indução da mucosite foi possível observar que os animais dos grupos experimentais consumiram em média a mesma quantidade de ração por dia (cerca de 3g por dia), não havendo, portanto, diferença estatística entre os grupos (**Figura 11**). Entretanto, notou-se que após indução da mucosite com 5-FU, os animais do grupo MUC (~1g) reduziram o consumo de ração quando comparado ao controle negativo (CTL) (~3g) ( $p < 0,01$ ), de forma que os animais tratados com CIDCA 133 (MUC+CIDCA 133) (~1,5 g) não foram capazes de reverter esse efeito (**Figura 11**).



**Figura 11.** Efeito do leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 na variação do consumo alimentar de animais antes e após indução da mucosite. Consumo alimentar de animais que receberam 5-FU (300 mg/kg) (MUC e MUC+CIDCA 133) ou salina 0,9% (CTL e CIDCA 133) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial *ad libitum* e que foram tratados por *continuous feeding* com leite não-fermentado ou com leite fermentado (n=8 animais por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) por Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunn's. \* indica diferença estatística calculada usando o teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

Adicionalmente, antes da indução da mucosite foi possível observar que os animais dos grupos experimentais consomem em média o mesmo volume de leite (fermentado ou não fermentado) por dia (cerca de 5mL por dia), não havendo, portanto, diferença estatística entre os grupos experimentais (**Figura 12**). Entretanto, notou-se que após indução da mucosite com 5-FU, os animais do grupo MUC (~2mL) reduziram o consumo de leite quando comparado ao controle negativo (CTL) (~4mL) ( $p < 0,01$ ), de forma que os animais tratados com CIDCA 133 (MUC+CIDCA 133) (~2,5mL) não foram capazes de reverter esse efeito (**Figura12**).

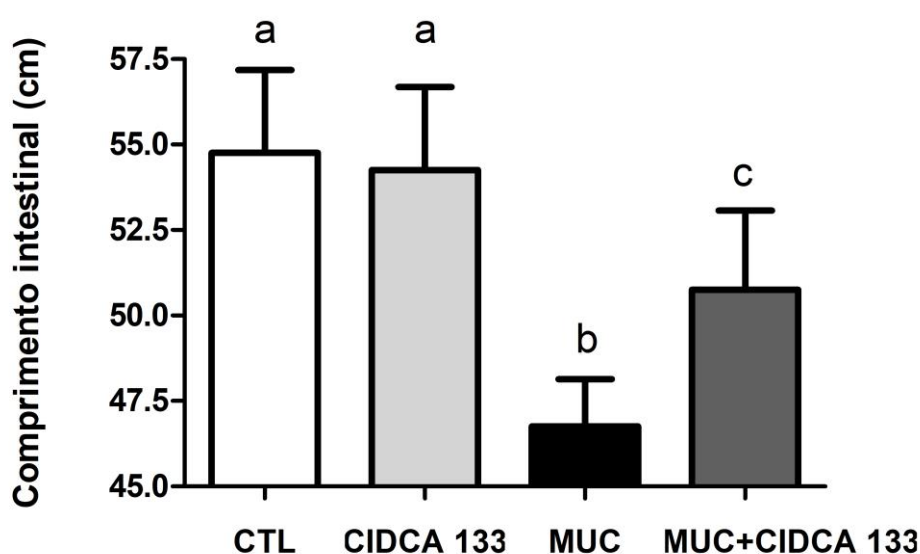


**Figura 12. Efeito do leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 na variação do consumo hídrico de animais antes e após indução da mucosite.** Consumo hídrico de animais que receberam 5-FU (300 mg/kg) (MUC e MUC+CIDCA 133) ou salina 0,9% (CTL e CIDCA 133) por via intraperitoneal, e que foram tratados por *continuous feeding* com leite não-fermentado ou com leite fermentado ( $n=8$  animais por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) por Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunn's. \* indica diferença estatística calculada usando o teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).



## 5.2 Leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 previne o encurtamento do intestino delgado de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Uma das manifestações da mucosite é a redução do comprimento do intestino delgado. Assim foi possível observar que os animais que receberam 5-FU (MUC) (~46cm) apresentaram reduções significativas no comprimento intestinal quando comparados aos do grupo controle negativo (CTL) (~55cm) ( $p < 0,001$ ). De forma contrária, o tratamento com CIDCA 133 (MUC+CIDCA 133) (~51cm) foi capaz de prevenir o encurtamento do comprimento intestinal ocasionado pelo quimioterápico 5-FU ( $p < 0,01$ ) (**Figura 13**).

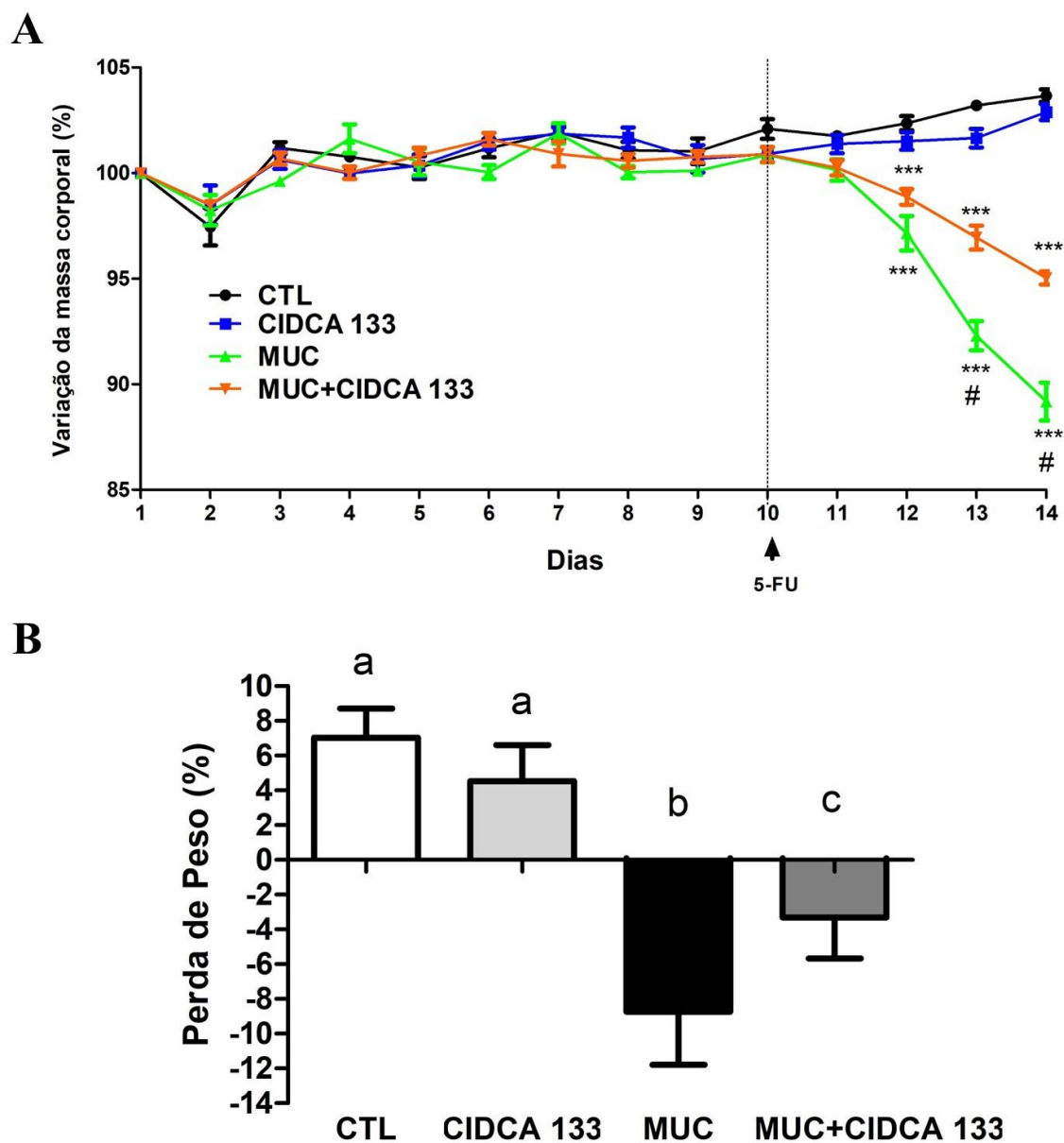


**Figura 13.** *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 previne o encurtamento do intestino delgado induzido por 5-FU. Animais que receberam 5-FU (300 mg/kg) (MUC e MUC+CIDCA 133) ou salina 0,9% (CTL e CIDCA 133) por via intraperitoneal, e que foram tratados por *continuous feeding* com leite não-fermentado ou com leite fermentado ( $n=8$  animais por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) por ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

## 5.3 Leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 atenua a perda de peso dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU

Para avaliar o estado clínico dos animais, o peso dos mesmos foi mensurado diariamente. Não houve diferença na variação de peso corporal entre os animais dos grupos experimentais até a indução da mucosite. Entretanto, observou-se que os animais inflamados com 5-FU (MUC e MUC+CIDCA 133) começaram a mostrar reduções significativas no peso corporal quando comparados aos dos grupos controle negativo (CTL) e CIDCA 133 ( $p < 0,001$ ), a partir do segundo dia após indução da mucosite (**Figura 14A**). Entretanto, observou-se que a variação da massa corporal foi maior nos animais do grupo tratado apenas

com o quimioterápico (MUC) do que naqueles que receberam tratamento com CIDCA 133 (MUC+CIDCA 133) ( $p < 0,001$ ), sendo que o aumento desta variação ocorreu somente a partir do terceiro dia após indução da mucosite (**Figura 14A**).



**Figura 14.** Efeito de *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 na perda de peso dos animais induzida por 5-FU. Variação da massa corporal (A) e perda de peso dos grupos experimentais (B). Animais que receberam 5-FU (300 mg/kg) (MUC e MUC+CIDCA 133) ou salina 0,9% (CTL e CIDCA 133) por via intraperitoneal, e que foram tratados por *continuous feeding* com leite não-fermentado ou com leite fermentado ( $n=8$  animais por grupo). \* e # indicam diferença estatística ( $p < 0,005$ ) entre os grupos CTL e CIDCA 133 e MUC e MUC+CIDCA 133, MUC e MUC+CIDCA 133 respectivamente, por Two ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,005$ ) entre os grupos por ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Por sua vez, ao se avaliar a perda de peso dos animais a partir da indução da mucosite (10º dia de experimentação), observou-se que o tratamento com CIDCA 133 (MUC+CIDCA 133) atenuou a perda de massa corporal dos animais em comparação ao grupo tratado apenas com o quimioterápico (MUC) ( $p < 0,001$ ). Ambos os grupos apresentaram cerca de 9% (MUC) e 3% (MUC+CIDCA 133) de perda da massa corporal quando comparados ao controle negativo (CTL) ( $p < 0,001$ ). Notou-se ainda que o tratamento com CIDCA 133 sem indução da mucosite (CIDCA 133) não influenciou estatisticamente na variação de peso corpóreo dos animais durante o período de experimentação (**Figura 14A e 14B**).

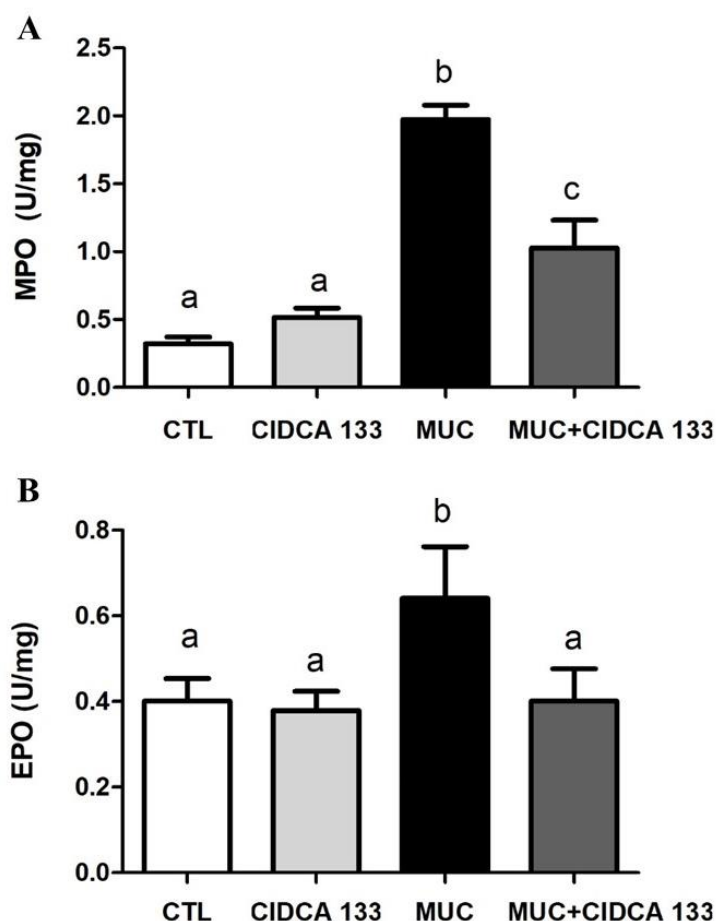
Além da perda de peso, a consistência das fezes e sangue oculto nas fezes foram mensurados de forma a se avaliar o estado clínico dos animais. Os dados obtidos demonstraram que os animais tratados apenas com 5-FU (MUC) apresentaram modificação na consistência de suas fezes, uma vez que estas estavam úmidas e de consistência pastosa. Além disso, esses animais apresentaram presença de sangue oculto nas fezes. Inversamente, o tratamento com CIDCA 133 melhorou estes parâmetros uma vez que os animais apresentaram fezes com aspecto normal e sem presença de sangue oculto (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Parâmetros avaliados para determinação do quadro clínico dos animais

<b>GRUPOS EXPERIMENTAIS</b>	<b>CONSISTÊNCIA DAS FEZES</b>	<b>SANGUE OCULTO</b>	<b>PERDA DE PESO</b>
<b>CTL</b>	Normal	Ausente	Não
<b>CIDCA 133</b>	Normal	Ausente	Não
<b>MUC</b>	Úmida e pastosa	Presente	Sim
<b>MUC+CIDCA 133</b>	Normal	Ausente	Sim

#### 5.4 Leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 reduz o infiltrado inflamatório em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU

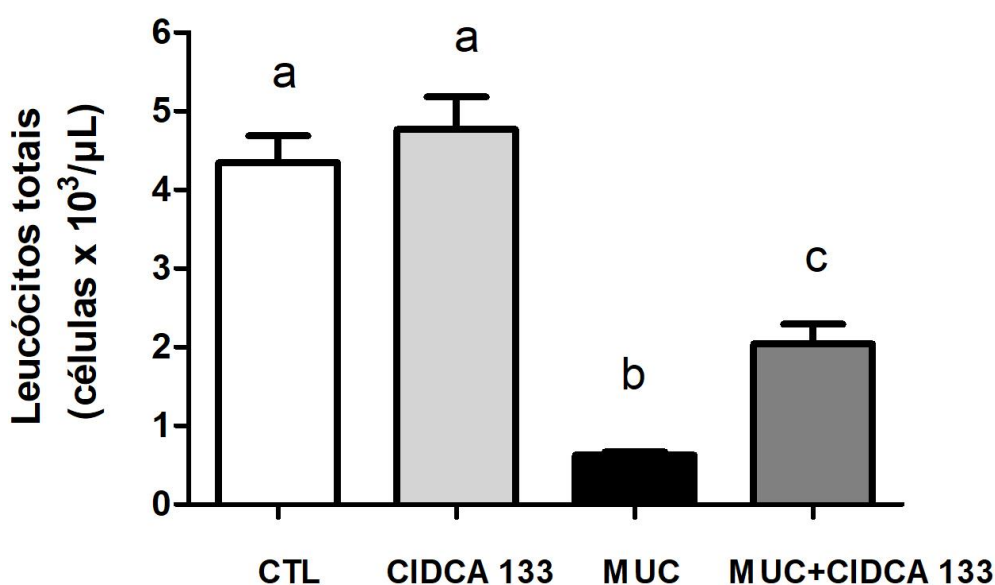
Para verificar se o tratamento com CIDCA 133 poderia reduzir a infiltração de neutrófilos e eosinófilos na mucosa intestinal, a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) foram mensuradas em lisado celular do íleo dos diferentes grupos experimentais. O tratamento com 5-FU (MUC) aumentou significativamente a atividade da MPO e EPO no íleo dos camundongos quando comparado ao controle negativo (CTL) ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente) (**Figura 15A e 15B**). No entanto, o tratamento com CIDCA 133 (MUC+CIDCA 133) foi capaz de reduzir significativamente a atividade dessas enzimas ( $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ , respectivamente) configurando, portanto, redução de infiltrado inflamatório na mucosa intestinal.



**Figura 15. Infiltrado inflamatório no íleo de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133.** Atividade de MPO (A) e EPO (B) do íleo de animais inflamados com 5-FU (300 mg/kg) (MUC e MUC+CIDCA 133) ou injetados com salina 0,9% (CTL e CIDCA 133) por via intraperitoneal, e que foram tratados por *continuous feeding* com leite não-fermentado ou com leite fermentado ( $n=8$  animais por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) por ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni (A) e Kruskal Wallis seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunns (B).

### 5.5 Leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 atenua a leucopenia ocasionada pelo tratamento com 5-FU

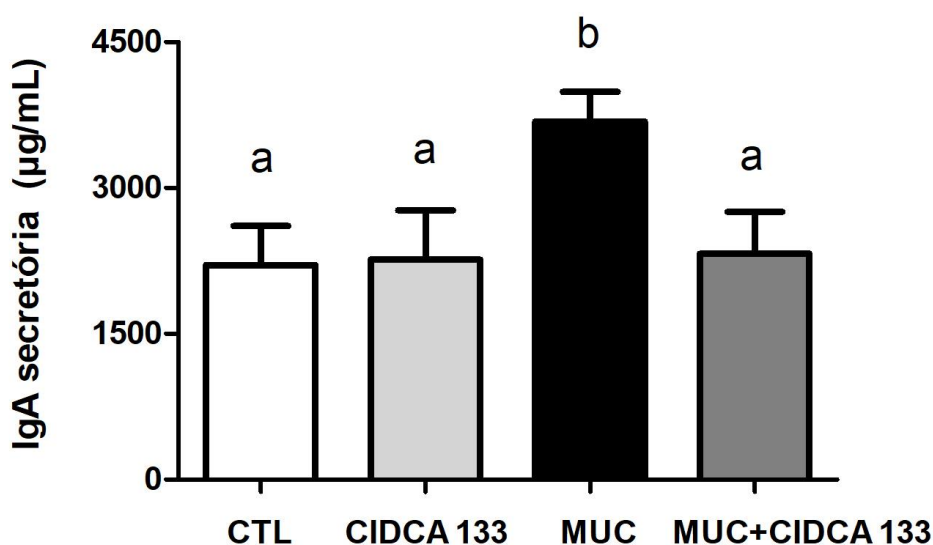
O tratamento com o 5-FU (MUC) induziu uma significativa leucopenia nos animais ( $0,6273 \pm 0,13$  células  $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) quando comparado ao controle negativo (CTL) ( $4,350 \pm 1,06$  células  $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) ( $p < 0,001$ ), conforme esperado. Entretanto, este efeito do 5-FU foi minimizado pelo tratamento com CIDCA 133 (MUC+CIDCA 133) ( $2,043 \pm 0,93$  células  $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), o qual preveniu significativamente ( $p < 0,05$ ) a diminuição da contagem total de leucócitos no sangue induzida pelo quimioterápico (**Figura 16**). Por sua vez, ao se comparar o grupo controle negativo (CTL) com o grupo tratado com CIDCA133 sem indução da mucosite (CIDCA 133) ( $4,769 \pm 1,49$  células  $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) notou-se que estes grupos não diferiram estatisticamente entre si, revelando, portanto que o tratamento apenas com o referido probiótico não influenciou na redução de leucócitos totais (**Figura 16**).



**Figura 16.** Contagem de leucócitos totais dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133. Animais que receberam 5-FU (300 mg/kg) (MUC e MUC+CIDCA 133) ou salina 0,9% (CTL e CIDCA 133) por via intraperitoneal, e que foram tratados por *continuous feeding* com leite não-fermentado ou com leite fermentado ( $n=8$  animais por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) por ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

## 5.6 Leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 reduz os níveis de IgA secretória (sIgA) do fluido intestinal de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU

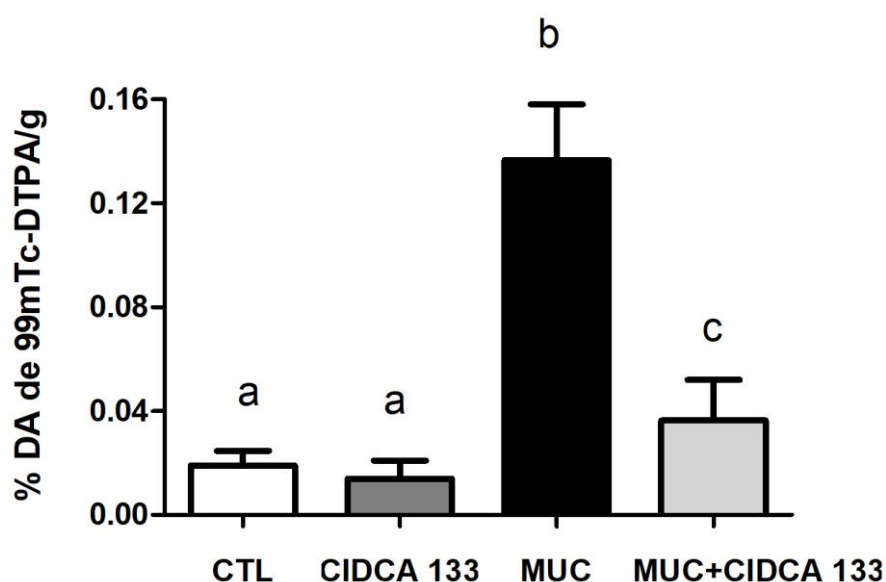
A proteção na superfície das mucosas correlaciona-se principalmente com a produção de IgA secretória, sIgA. Assim para avaliar a proteção da mucosa intestinal, níveis de IgA secretória foram mensurados através da técnica de ELISA. A **Figura 17** mostra que o tratamento com 5-FU (MUC) aumentou significativamente os níveis de sIgA no fluido intestinal dos camundongos quando comparado ao controle negativo (CTL) e o grupo tratado com CIDCA 133 sem indução da mucosite (CIDCA 133) ( $p < 0,001$ ). No entanto, o tratamento com CIDCA 133 (MUC+CIDCA 133) foi capaz de reduzir significativamente os níveis de sIgA ( $p < 0,001$ ) no fluido intestinal dos animais que receberam o quimioterápico demonstrando, portanto, que o tratamento com o referido probiótico é capaz de conferir proteção à mucosa intestinal.



**Figura 17.** Níveis de sIgA do fluido intestinal de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133. Animais que receberam 5-FU (300 mg/kg) (MUC e MUC+CIDCA 133) ou salina 0,9% (CTL e CIDCA 133) por via intraperitoneal, e tratados por *continuous feeding* ou com leite não-fermentado ou com leite fermentado ( $n=8$  animais por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) por Kruskal Wallis seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunns.

### 5.7 Leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 atenua o aumento da permeabilidade intestinal induzida por 5-FU

A integridade da barreira epitelial foi mensurada por meio da permeabilidade intestinal, medindo-se a difusão de radioatividade no sangue após a administração oral de  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA. A **Figura 18** mostra que o tratamento com 5-FU (MUC) aumentou a permeabilidade intestinal dos animais 72 h após a indução da doença, quando comparado ao controle negativo (CTL) e o grupo tratado com CIDCA 133 sem indução da mucosite (CIDCA 133) ( $p < 0,001$ ). Entretanto, o tratamento com CIDCA 133 (MUC+CIDCA 133) foi capaz de reduzir significativamente a permeabilidade intestinal dos animais que receberam o quimioterápico ( $p < 0,001$ ).



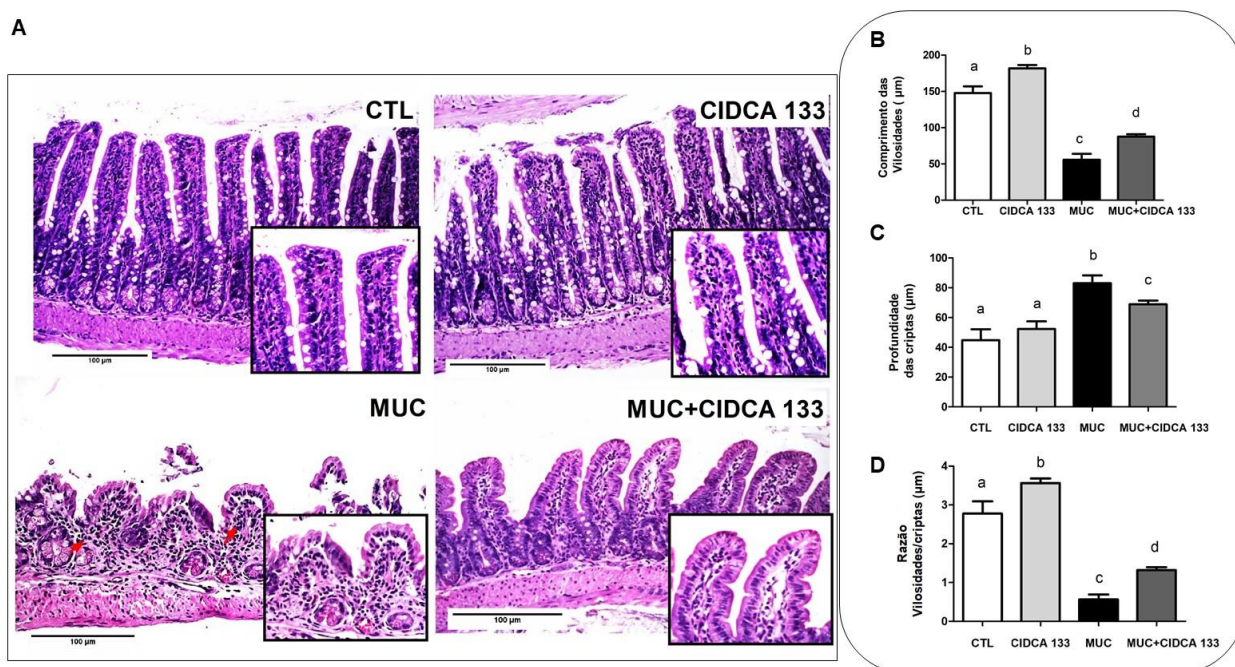
**Figura 18.** Permeabilidade intestinal de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com CIDCA 133. Animais que receberam 5-FU (300 mg/kg) (MUC e MUC+CIDCA 133) ou salina 0,9% (CTL e CIDCA 133) por via intraperitoneal, e que foram tratados por *continuous feeding* com leite não-fermentado ou com leite fermentado (n=8 animais por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) por ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni.



### 5.8 Leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 melhora os parâmetros histopatológicos, morfométricos e previne a perda de células caliciformes no íleo de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU

O tratamento com 5-FU (MUC) induziu drásticas lesões no íleo dos animais, alterando a arquitetura da mucosa intestinal, quando comparado ao controle negativo (CTL). Essas alterações são caracterizadas por encurtamento das vilosidades, intenso infiltrado de células polimorfonucleares nas vilosidades, na lâmina própria e na submucosa, ulceração, edema, vacuolização e necrose de criptas, além de redução do número de células caliciformes (Figura 19 A).

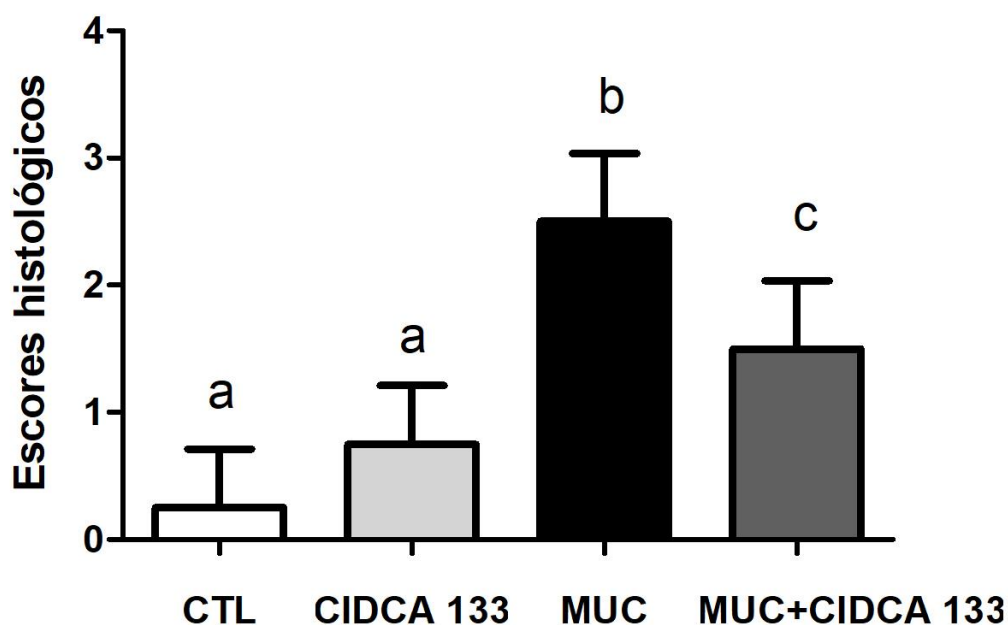
Contudo, observou-se que o tratamento com CIDCA 133 (MUC+CIDCA 133) foi capaz de restaurar a arquitetura da mucosa, uma vez que foi observado um aumento na altura das vilosidades, redução do infiltrado inflamatório na submucosa, nas vilosidades e aumento de células caliciformes quando comparado aos animais inflamados (MUC). Adicionalmente, como esperado, não foram observadas alterações histopatológicas para o grupo controle negativo e grupo CIDCA 133 (sem indução da mucosite), observando-se epitélios sem infiltrado inflamatório e com arquitetura conservada (Figura 19A).



**Figura 19. Análise histológica e morfométrica do íleo dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133.** Achado histopatológico (A), Altura das vilosidades (B), profundidade das criptas (C), razão do comprimento das vilosidades e profundidade das criptas (D) da seção íleo de animais que receberam 5-FU (300 mg/kg) (MUC e MUC+CIDCA 133) ou salina 0,9% (CTL e CIDCA 133) por via intraperitoneal, e que foram tratados por *continuous feeding* com leite não-fermentado ou com leite fermentado ( $n=8$  animais por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p<0,05$ ) por ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

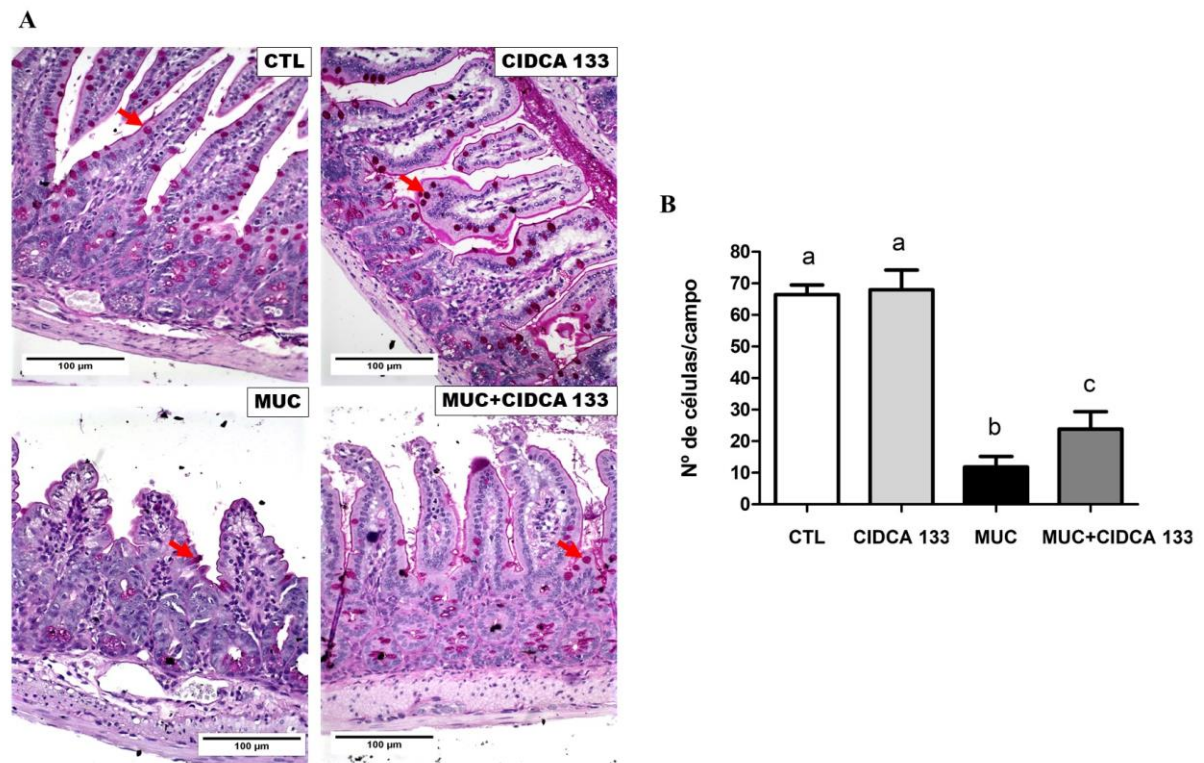


Com relação aos achados da análise morfométrica, os dados demonstraram que o 5-FU (MUC) foi capaz de induzir redução no comprimento das vilosidades ( $p < 0,001$ ), aumento na profundidade das criptas ( $p < 0,001$ ), bem como diminuição na razão vilosidades/criptas ( $p < 0,001$ ) (Figura 19A, B, C e D). Entretanto, o tratamento com CIDCA 133 (MUC+CIDCA 133) foi capaz de reduzir essas alterações ocasionadas pelo quimioterápico ( $p < 0,05$ ), conforme observado na relação do eixo vilosidades/criptas. Adicionalmente, ao se comparar o grupo controle negativo (CTL) com o grupo tratado com CIDCA 133 sem indução da mucosite (CIDCA 133), observa-se que estes grupos não diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ) (Figura 19), o que reflete nos resultados encontrados para os escores histológicos observados (Figura 20).



**Figura 20.** Escores histológicos de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133. Animais que receberam 5-FU (300 mg/kg) (MUC e MUC+CIDCA 133) ou salina 0,9% (CTL e CIDCA 133) por via intraperitoneal, e tratados por *continuous feeding* com leite não-fermentado ou com leite fermentado ( $n=8$  animais por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) por ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Por fim, com o intuito de avaliar o efeito de CIDCA 133 na barreira intestinal, foi realizada a contagem de células secretoras de muco (**Figura 21A**). Uma significativa redução no número de células caliciformes em animais inflamados com 5-FU foi observada (grupo MUC), quando comparado ao grupo controle negativo (CTL) ( $p < 0,001$ ). Por sua vez, os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com CIDCA 133 (MUC+CIDCA 133) foi capaz de prevenir a perda de células caliciformes ( $p < 0,05$ ) (**Figura 21B**).



**Figura 21.** Número de células caliciformes no íleo de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133. (A) Fotomicrografia de células caliciformes coradas por Alcian Blue; (B) Número de células caliciformes dos respectivos grupos experimentais. Animais que receberam 5-FU (300 mg/kg) (MUC e MUC+CIDCA 133) ou salina 0,9% (CTL e CIDCA 133) por via intraperitoneal, e que foram tratados por *continuous feeding* com leite não-fermentado ou com leite fermentado ( $n=8$  animais por grupo). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) por ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

## 6 DISCUSSÃO

A mucosite intestinal é um dos principais efeitos citotóxicos ocasionados ao TGI de pacientes em tratamento com antineoplásicos como o 5-FU (LEE et al., 2014; PHILLIPS et al., 2018), sendo um sério problema na clínica médica, uma vez que se torna um fator limitante para a eficácia do tratamento e sobrevida dos pacientes.

No presente estudo foi observado que a administração de 300 mg/kg de 5-FU em camundongos BALB/c promove sintomas sistêmicos ao organismo dos animais, como fezes pastosas e sanguinolentas, perda de peso corpóreo, redução do consumo hídrico e alimentar, redução do comprimento intestinal, presença de infiltrado inflamatório, aumento de secreção de sIgA na mucosa, leucopenia, aumento da permeabilidade intestinal, além de drásticas alterações na estrutura da mucosa intestinal, como redução das vilosidades, aumento da profundidade e destruição das células das criptas e redução do número de células caliciformes. Estes achados são consistentes com estudos prévios que utilizaram o referido fármaco (DUCAN e GRANT, 2003; FERREIRA et al., 2012; YEUNG et al., 2015; LI et al., 2017; HAMOUDA et al., 2017; CARVALHO et al., 2017), revelando, portanto, a associação destes parâmetros com a severidade da mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico.

Encontrar alternativas terapêuticas para prevenir, reduzir ou até mesmo tratar os danos à mucosa intestinal causados por quimioterápicos, torna-se de fundamental importância durante o tratamento de diversos tipos de cânceres. Nesse contexto, sabendo que cepas bacterianas com potencial probiótico têm sido descritas como terapias eficazes para o tratamento de várias condições patológicas, incluindo as desordens inflamatórias intestinais (BELLAVIA, 2014; KATO et al., 2017; JACOUTON et al., 2017; CHANG et al., 2018), no presente estudo investigou-se se *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 seria capaz de apresentar efeito terapêutico sobre os danos à mucosa intestinal ocasionados pelo quimioterápico 5-FU.

A severidade da mucosite ocasionada por quimioterápicos pode predispor ao comprometimento da ingestão oral, devido haver dificuldades na mastigação, deglutição, absorção (EDUARDO et al., 2018), bem como pode estar relacionada ao atraso do esvaziamento gástrico (SOARES et al., 2008). Assim, o comprometimento alimentar um fator limitante comumente observado durante a mucosite ocasionada em pacientes durante o processo de quimioterapia (PETERSON et al., 2011; COLLING et al., 2012; ARENDS et al., 2018), o que consequentemente reflete na perda de massa corporal. Dessa forma, avaliou-se o efeito do leite fermentado por CIDCA 133 no consumo alimentar, hídrico, no comprimento intestinal e o efeito destes parâmetros na perda de peso dos animais com mucosite. Os

resultados obtidos demonstraram que esta cepa bacteriana não tem efeito sobre a redução da ingestão alimentar e hídrica dos animais inflamados com 5-FU, no entanto ela foi capaz de prevenir a redução do comprimento do intestino e perda de massa corporal. Baseado nesses achados, sugere-se que essa atenuação na perda de massa corporal demonstrada nos animais com mucosite ocorreu devido esta cepa bacteriana ser capaz de amenizar a intensa redução do comprimento intestinal (redução da superfície de absorção) e a drástica alteração do epitélio da mucosa intestinal ocasionada pelo quimioterápico 5-FU, de forma a não comprometer a absorção de nutrientes, perda de água e eletrólitos, e conseqüentemente o balanço energético dos animais.

Um dos principais efeitos relacionados à mucosite intestinal é a perda da arquitetura intestinal, acompanhado por destruição da mucosa e o estabelecimento de um intenso processo inflamatório (DUNCAN e GRANT, 2003; SONIS et al., 2004; SOARES et al., 2013; LEE et al., 2014), o que confirma a susceptibilidade do trato gastrointestinal à terapia oncológica. Os animais que foram inflamados com 300mg/kg de 5-FU no presente estudo apresentaram perda da arquitetura da mucosa do íleo, no qual se observou redução das vilosidades, aumento da profundidade e destruição das células das criptas, ulceração e intensa resposta inflamatória, estando esses achados em consonância com a patobiologia da mucosite proposta por Sonis (2004) e os escores histopatológicos proposto por Soares et al. (2008). Por sua vez, os resultados do presente estudo demonstraram que o leite fermentado por CIDCA 133 foi capaz de atenuar os danos à mucosa intestinal ocasionados pelo quimioterápico 5-FU, uma vez que o tratamento com leite fermentado pela referida bactéria foi capaz de prevenir a redução do comprimento das vilosidades, o aumento na profundidade das criptas, o aumento do infiltrado inflamatório e a perda do número de células caliciformes.

De acordo com a patobiologia da mucosite, proposta por Sonis (2004), e sabendo que a alteração da integridade da mucosa intestinal compromete não só a capacidade absorptiva do intestino, mas também altera os padrões de permeabilidade, deixando o intestino permissível à passagem de agentes exógenos, como bactérias patogênicas e antígenos nocivos que comprometem a homeostase do organismo (CINAUSERO et al., 2017), os dados encontrados no presente estudo sugerem que o efeito de CIDCA 133 sobre a integridade da arquitetura da mucosa possa estar relacionado à sua capacidade de (i) prevenir o estresse oxidativo, uma vez que a produção de ROS está relacionada com danos ao material genético das células, culminando em danos/morte e perda celular; (ii) reduzir a produção de citocinas pro-inflamatórias, possivelmente, inibindo a ativação da via NF- $\kappa$ B, de forma a proteger a mucosa de uma lesão tecidual exacerbada, e (iii) estimular a migração de enterócitos, produzidos pelas

células estaminais das criptas, a repararem o epitélio intestinal pela substituição das células danificadas/mortas. Estas inferências foram extrapoladas para o efeito do leite fermentado por CIDCA 133 no presente estudo devido alguns estudos relatarem que diferentes cepas de *Lactobacillus*, utilizadas como arsenal terapêutico na mucosite intestinal ocasionada por 5-FU, foram capazes de prevenir o aumento da produção de citocinas pro-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , (JUSTINO et al., 2015; YEUNG et al., 2015), inibir a ativação da via NF- $\kappa$ B (DAI, 2013; JEONG et al., 2017), diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio, sem comprometimento no efeito citotóxico do 5-FU sobre células cancerosas (LEVIT et al., 2018), e reduzir a apoptose de enterócitos (PRISCIANDARO et al., 2011).

A destruição das células epiteliais do TGI durante o processo de mucosite intestinal induzido por quimioterápicos é o principal estímulo para o recrutamento de células polimorfonucleares como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos para a mucosa intestinal (SONIS et al., 2004), sendo este efeito reportado em estudos experimentais prévios (FERREIRA et al., 2012; SOARES et al., 2013; PEREIRA et al., 2016).

Sob condições homeostáticas, a maioria dos eosinófilos produzidos na medula óssea migram para o intestino delgado, onde residem e compõem cerca de 20-30% da população celular (JUNG e ROTHENBERG, 2014). Durante os processos inflamatórios, estas células (além de residirem no intestino delgado) se juntam aos neutrófilos e são as primeiras células ativadas na defesa do organismo que migram dos vasos sanguíneos, por quimiotaxia, até o local da lesão, de forma a combater possíveis infecções. Por sua vez, estas células iniciam uma cascata de sinalização, recrutando outras células da resposta imune inata. Ambas células, ao migrarem para o sítio da lesão, são capazes de reconhecer, fagocitar e destruir antígenos e micro-organismos nocivos ao organismo pela liberação de enzimas proteolíticas, ROS e citocinas pró-inflamatórias (WOODRUFF et al., 2011; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013). Entretanto, a produção desses mediadores induz a dano tecidual adicional, resultando em ulceração da mucosa (VILLA e SONIS, 2015; LI et al., 2017).

Nesse contexto, para avaliar o efeito do leite fermentado por CIDCA 133 no infiltrado inflamatório, avaliou-se o perfil da atividade das enzimas mieloperoxidase e peroxidase eosinofílica, as quais permitem avaliar de forma indireta a extensão do infiltrado inflamatório por neutrófilos e eosinófilos, respectivamente. Os resultados mostraram que os animais que receberam o quimioterápico 5-FU apresentaram intenso infiltrado inflamatório tanto por neutrófilos quanto por eosinófilos no íleo, sendo que o tratamento com CIDCA 133 foi capaz de promover redução no nível das enzimas MPO e EPO. Estudos prévios são consistentes com os resultados aqui obtidos, uma vez que igualmente observaram o efeito de probióticos

como *Lactobacillus acidophilus* (JUSTINO et al., 2015; OH et al., 2017), *Lactobacillus fermentum* (SMITH et al., 2008), *Saccharomyces boulardii* (JUSTINO et al., 2014) e *L. plantarum* CRL 2130 (LEVIT et al., 2018) na modulação do infiltrado inflamatório, produção de citocinas pró-inflamatórias e redução do estresse oxidativo ocasionado por 5-FU. Assim, os achados do presente estudo sugerem que a ação de CIDCA 133 na redução do infiltrado de células polimorfonucleares na mucosa intestinal pode estar relacionada à sua capacidade em reduzir a produção de ROS e de citocinas pró-inflamatórias estimuladas pela administração do 5-FU, o que consequentemente diminui o dano tecidual gerado no epitélio intestinal e reduz a intensa migração de neutrófilos e eosinófilos para o local afetado.

A leucopenia é outro aspecto clínico de suma importância na mucosite intestinal gerada pela administração de 5-FU, conforme demonstrado no presente estudo e reportado em estudos prévios (SOARES et al., 2008; SOARES et al., 2013; JUSTINO et al., 2014; ARAUJO et al., 2015). Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a perda de leucócitos totais sanguíneos, ocasionada pela administração de 5-FU, foi atenuada pela administração do leite fermentado por CIDCA 133. Conforme reportado anteriormente, danos à mucosa intestinal contribuem para o aumento do infiltrado inflamatório nos locais afetados, devido ao recrutamento de células sanguíneas como neutrófilos e eosinófilos. Assim, de acordo com esses achados, sugere-se que CIDCA 133 exerce efeito sobre a leucopenia possivelmente devido à redução do processo inflamatório na mucosa intestinal, o que consequentemente reduz o recrutamento de leucócitos circulantes para o local da inflamação, de forma que estas células permanecem em número expressivo na corrente sanguínea.

O epitélio do trato gastrointestinal funciona também como uma barreira que seletivamente limita a entrada de toxinas e antígenos luminais para os tecidos da mucosa, de forma a manter a homeostase do organismo (BISCHOFF et al., 2014; AHMAD et al., 2017). Entretanto, qualquer mudança nos mecanismos de defesa que compõem esta função de barreira leva ao aumento da permeabilidade intestinal, facilitando a translocação de substâncias prejudiciais e agentes patogênicos do lúmen intestinal para o interior dos tecidos, inclusive para a corrente sanguínea, o que por sua vez pode levar ao desenvolvimento e progressão de algumas condições patológicas como as Doenças Inflamatórias Intestinais (IBDs), sepsies, diabetes entre outros (NALLE e TURNER, 2015; KONIG et al., 2016; VANCAMELBEKE e VERMEIRE, 2017).

Nesse contexto, sabendo que o 5-FU induz alterações na função de barreira do epitélio intestinal (DANIELE et al., 2001; SONG et al., 2013), avaliou-se o efeito do leite fermentado por CIDCA 133 na manutenção da barreira epitelial por meio da mensuração dos

níveis de IgA secretória, contagem de células produtoras de muco e alteração da permeabilidade intestinal. Os resultados obtidos demonstraram que a administração do 5-FU induziu o aumento de IgA secretória, reduziu o número de células caliciformes e aumentou a permeabilidade intestinal. No entanto, o tratamento com leite fermentado por CIDCA 133 foi capaz de atenuar estes efeitos.

A principal função da sIgA é desempenhar um papel na proteção e manter a homeostase nas superfícies mucosas contra agentes exógenos (MANTIS et al., 2011; MONTEIRO et al., 2014). Nesse contexto, o aumento de sIgA nos animais inflamados por 5-FU no presente estudo era esperado, uma vez que os níveis desta imunoglobulina aumentaram durante o processo inflamatório como mecanismo de defesa do hospedeiro. Adicionalmente, o efeito observado para CIDCA 133 na redução da produção dessa imunoglobulina nos animais com mucosite pode estar relacionado à capacidade dessa cepa bacteriana em reduzir o processo inflamatório ocasionado por 5-FU, conforme já reportado.

Similarmente aos achados encontrados neste estudo, Carvalho et al. (2017) observaram redução na secreção de sIgA gerada pela administração da bactéria láctica *Lactococcus lactis* NZ9000 selvagem, durante o tratamento da mucosite. Contudo, os resultados sobre a secreção de sIgA por probióticos são controversos, uma vez que alguns estudos têm demonstrado que o consumo de probióticos está associado ao aumento dos níveis de sIgA (ROCHA et al., 2014; KIKUCHI et al., 2014; KAWASHIMA et al., 2018). Assim, esses achados somados aos resultados obtidos neste trabalho levantam a hipótese de que o efeito dos probióticos na manutenção da barreira intestinal via sIgA pode depender da cepa bacteriana utilizada e da condição patológica do organismo.

A mucosite intestinal induzida por quimioterápicos também leva à perda de células caliciformes, o que conseqüentemente gera impacto na barreira intestinal (STRINGER et al., 2009; YEUNG et al., 2015; CIOBANU et al., 2016). O principal papel das células caliciformes é secretar muco para proteger a membrana mucosa, evitando que agentes nocivos ao organismo entrem diretamente nas células epiteliais (VLIET et al., 2010). A intensa redução no número de células caliciformes gerada pelo quimioterápico 5-FU na mucosa intestinal foi atenuada pelo tratamento com leite fermentado por CIDCA 133. Estes achados estão de acordo com outras pesquisas que demonstraram que o uso de bactérias probióticas, como por exemplo *Lactobacillus casei* (YEUNG et al., 2015) e *Lactobacillus acidophilus* (OH et al., 2017) também foram capazes de diminuir a perda dessas células na mucosa intestinal. Diante disto, sugere-se que o efeito de CIDCA 133 na redução da perda de células caliciformes pode estar atribuído ao seu efeito de proteger os danos à arquitetura do epitélio

intestinal gerados por 5-FU, como redução da vilosidades e destruição das células das criptas intestinais.

Dados na literatura relatam que *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus planetarium* aumentaram a expressão dos genes de MUC-2 and MUC-3 em resposta à aderência de *E. coli* em células epiteliais (MACK et al., 1999; MACK et al., 2003). Por sua vez, *Lactobacillus acidophilus* aumentou a regulação da expressão do gene MUC-2 e MUC5AC em resposta aos danos intestinais induzidos por 5-FU (OH et al., 2017). Resultados similares foram obtidos utilizando *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* presentes no probiótico misto VSL#3 contendo quatro linhagens de *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* e *L. bulgaricus*), três linhagens de *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. breve* e *B. infantis*) e uma linhagem de *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (CABALLERO-FRANCO et al., 2007). Assim, o mecanismo de ação de bactérias probióticas, que poderia ser extrapolado para o efeito de CIDCA 133 reportado nesse estudo, poderia ser sua capacidade de regular genes codificantes de mucinas, evidenciando ainda mais a função essencial que estes micro-organismos exercem na manutenção da barreira do epitélio intestinal.

A perda da integridade da barreira epitelial também leva ao aumento da permeabilidade intestinal (SONIS, 2004). A permeabilidade intestinal refere-se à facilidade com que o epitélio permite a passagem de moléculas por difusão simples, devido a mudanças na estrutura das proteínas denominadas *tight junctions* (como ocludina, claudina e zonulina-1) que interconectam as células epiteliais, vedando o espaço intercelular, e assim, evitando a passagem (paracelular) de agentes nocivos do lúmen para dentro da mucosa intestinal (KONING et al., 2016; AHMAD et al., 2017).

Segundo Youmba et al. (2012), as drogas quimioterápicas podem aumentar a permeabilidade da barreira epitelial intestinal por meio da redução da expressão proteica das *tight junctions*. Baseado nessa informação, uma das hipóteses acerca do efeito de bactérias probióticas em amenizar a permeabilidade do intestino é a capacidades desses micro-organismos e/ou seus metabólitos aumentarem a expressão de genes envolvidos na formação dessas proteínas. Alguns trabalhos sustentam essa hipótese. Por exemplo, Anderson et al. (2010) observaram que *L. plantarum* MB452 alterou a expressão genes diretamente envolvidos e genes relacionados à formação das *tight junctions* em células epiteliais Caco-2. Por sua vez, Ewaschuk et al. (2008) reportou que a administração de metabólitos de *Bifidobacterium* Y1 aumentou a expressão de genes relacionados às proteínas ZO-1 e ocludina em células epiteliais humanas T84. Estes resultados também são corroborados pelo estudo de Lépine et al. (2017) o qual mostraram que *Lactobacillus acidophilus* foi capaz de



regular a expressão de cerca de 26 genes envolvidos na formação de *tight junctions*. Alguns estudos têm demonstrado que o 5-FU aumenta a permeabilidade intestinal (FERREIRA et al.; 2012; SONG et al., 2013; LI et al., 2017), o que é consistente com os achados do presente estudo. Por sua vez, os resultados obtidos demonstram que o tratamento com leite fermentado por CIDCA 133 foi capaz de restaurar, pelo menos em parte, o aumento da permeabilidade intestinal. Esses achados são corroborados por trabalhos prévios (JUSTINO et al., 2014; TRINDADE et al., 2018) que similarmente, mostraram que bactérias e leveduras probióticas atenuaram o aumento da permeabilidade intestinal induzido por 5-FU.

Portanto, baseado nesses achados, sugere-se que o efeito de CIDCA 133 na manutenção da permeabilidade possa estar relacionado à capacidade de suas proteínas de superfície ou de seus metabólitos produzidos durante o seu crescimento no meio leite ativarem a expressão de genes relacionados a produção das proteínas *tight junctions*, cuja estrutura foi alterada durante a administração do 5-FU. Adicionalmente, é bem elucidado que as células inflamatórias podem promover alteração das proteínas *tight junctions* devido à produção de ROS (SHETH et al., 2003; MAEDA et al., 2010). Assim, a redução do infiltrado inflamatório pode ser outro mecanismo pela qual CIDCA 133 reduz a permeabilidade do intestino. Entretanto, novos estudos devem ser realizados a fim de elucidar o mecanismo de ação dessa bactéria sobre as proteínas *tight junctions*.

Outro fator advindo da perda de barreira intestinal, via aumento da permeabilidade do intestino, é a translocação de bactérias patogênicas pela corrente sanguínea para outros órgãos. Alguns estudos tem demonstrado que o tratamento com 5-FU, induz uma alteração na microbiota residente (disbiose intestinal), e que essa alteração pode estar ligada ao processo de translocação bacteriana e aos danos gastrintestinais relacionados ao tratamento com o fármaco (VON BÜLTZINGSLÖWEN et al., 2003; STRINGER et al., 2009; VANLANCKER et al., 2017; LI et al., 2017).

Segundo Vliet et al. (2010), a microbiota intestinal pode contribuir para a patobiologia da mucosite induzido por quimioterápicos devido a sua influência sobre: (i) o processo inflamatório e o estresse oxidativo, (ii) permeabilidade intestinal, (iii) composição da camada de muco, (iv) o reparo epitelial, e (vi) a ativação e liberação de moléculas imunológicas efetoras. Entretanto, a microbiota intestinal comensal também pode ter efeitos benéficos no desenvolvimento da mucosite intestinal, pois a simples presença de bactérias intestinais residentes pode oferecer proteção contra o seu desenvolvimento.

Nesse sentido, a modulação da microbiota pela administração de bactérias probióticas parece ser uma alternativa terapêutica promissora para manter a integridade e homeostase intestinal dos danos ocasionados por quimioterápicos ou outros agentes. Alguns trabalhos corroboram com esta hipótese. Por exemplo, *L. acidophilus* reduziu a abundância de *S. aureus* e aumentou a abundância de bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* durante a colite ulcerativa induzida por DSS 5% (CHEN et al., 2013). Por sua vez, Song et al. (2017) mostraram que a administração de *Lactobacillus plantarum* LIP-1 promoveu modulação da microbiota intestinal de ratos hiperlipidêmicos. Os autores observaram que as amostras fecais dos animais tinham significativamente menos bactérias produtoras de lipopolissacarídeos (especialmente *Bilophila*, *Sutterella* e *Oscillibacter*) e bactérias prejudiciais à mucosa (*Bilophila* e *Akkermansia muciniphila*), enquanto apresentaram aumento significativo da abundância de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), como *Lactobacillus*, *Alloprevotella*, *Coprococcus*, *Eubacterium* e *Ruminococcus*. Adicionalmente, Kato et al. (2017) mostraram em um modelo de mucosite intestinal que a administração de 5-FU diminuiu a abundância de bactérias do filo Firmicutes e aumentou a abundância de Bacteroidetes, sendo este efeito restaurado pelo tratamento com *Bifidobacterium bifidum* G9-1.

Diante dessas informações, apesar da alteração da microbiota intestinal não ter sido avaliada, os achados encontrados no presente estudo sugerem que a modulação da microbiota intestinal possa ser um dos mecanismos utilizados por CIDCA 133 para atenuar os danos ocasionados à mucosa intestinal induzidos pelo quimioterápico 5-FU. No entanto, enfatiza-se a necessidade de realização de novos estudos a fim de confirmar esta hipótese.

Resumidamente, os resultados encontrados ao longo desta pesquisa mostraram um efeito protetor claro de *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* CIDCA 133 sobre os danos à mucosa intestinal induzida por um quimioterápico, demonstrando, portanto, ser uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento da mucosite. O presente estudo é pioneiro na caracterização das propriedades terapêuticas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* CIDCA 133 em modelo *in vivo*, o que permite hipotetizar que os principais mecanismos utilizados por CIDCA 133 para amenizar os efeitos deletérios de 5-FU sobre a mucosa intestinal advêm dos mecanismos gerais de ação propostos, até então, para as bactérias probióticas, como: (i) ação anti-inflamatória, (ii) imunomodulatória, (iii) capacidade de estimular a função de barreira do TGI, e (iv) modular a microbiota intestinal. No entanto, reforça-se a necessidade de novos estudos serem realizados, visando investigar os mecanismos subjacentes aos efeitos encontrados neste trabalho, para uma compreensão mais

aprofundada das vias pelas quais esta linhagem utiliza para exercer seu papel probiótico na mucosite.

## **8 CONCLUSÃO**

A administração oral do leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 atenua a mucosite intestinal experimental induzida pelo antineoplásico 5-FU em modelo murino, demonstrando ser uma estratégia terapêutica promissora para a prevenção ou tratamento da mucosite.

## 9 PERSPECTIVAS

- Mensurar os metabólitos produzidos no leite fermentado por CIDCA 133 e encontrados nas fezes dos animais através de HPLC, e a sua influência na melhora da mucosite.
- Avaliar o efeito de culturas mortas de CIDCA 133 sobre parâmetros histopatológicos e morfométricos na mucosite.
- Estudar o efeito de CIDCA 133 sobre a expressão das proteínas *tight junctions*, através de RT-qPCR.
- Estudar o efeito de CIDCA 133 no processo de translocação bacteriana, através de *E. coli* marcada radioativamente.
- Avaliar o efeito de CIDCA 133 sobre a produção de muco através de imunohistoquímica.
- Avaliar o efeito de CIDCA 133 sobre o perfil de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4), anti-inflamatórias (IL-33, IL-13) e células T reguladoras (IL-10, TGF- $\beta$ ) através da técnica de RT-qPCR.
- Avaliar o efeito de CIDCA 133 sobre a alteração da composição da microbiota promovida por 5-FU, através do sequenciamento do gene rRNA16S nas amostras fecais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM, B.P et al. Probiotics in Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 46, n. 4, p. 769-782, 2017.
2. ACURCIO, L.B 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**, vol. 33, p.436–445, 2017.
3. AGERHOLM-LARSEN, L et al. Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. **Eur J Clin Nutr**, vol., n. 4, p. 288–297, 2000.
4. AHMAD, R et al. Gut permeability and mucosal inflammation: bad, good or context dependent. **Mucosal Immunology**, vol. 10, p. 307–317, 2017.
5. ALIAKBARPOUR, H.R et al. The *Bacillus subtilis* and Lactic Acid Bacteria Probiotics Influences Intestinal Mucin Gene Expression, Histomorphology and Growth Performance in Broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 9, p. 1285–1293, 2012.
6. ALMEIDA, V.L et al. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction. **Química. Nova**, vol.28, n.1, p.118-129, 2005.
7. ALMOKASHFY, F.I.A et al. The Severity of 5-Fluorouracil Induced Gastrointestinal (Gi) Mucositis It's Impact on Treatment. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 6, p. 293-300, 2016.
8. ANDERSON, R et al. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. **BMC Microbiology**, vol. 10, n. 1, p. 1-11, 2010.
9. AOKI, R et al. A proliferative probiotic *Bifidobacterium* strain in the gut ameliorates progression of metabolic disorders via microbiota modulation and acetate elevation. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-10, 2017.
10. 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, p. 493–501, 2015.
11. ARENDS, J. How to feed patients with gastrointestinal mucositis. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, vol. 12, n. 2, p. 168-173, 2018.
12. AUTENRIETH, D.M. BAUMGART, D.C. Microbiome and Gut Inflammation. **Dtsch. Med. Wochenschr**, vol.142, p. 261–266, 2017
13. BELKAID, Y; HAND, T. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 121–141, 2014.
14. BELLAVIA, M. *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* supplementation reduces tissue damage of intestinal mucosa and liver after 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid treatment in mice. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, vol. 28, n.2, p.251–61, 2014.
15. BISCHOFF, S.C et al. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. **BMC Gastroenterology**, vol. 14, n.189, p. 1-25, 2014
16. BLACKADAR, C.B. Historical review of the causes of cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 1, p. 54-86, 2016.

17. BLACKWOOD, B.P et al. Probiotic *Lactobacillus* Species Strengthen Intestinal Barrier Function and Tight Junction Integrity in Experimental Necrotizing Enterocolitis. **Journal of Probiotics and Health**, v. 5, n. 1, p. 1-20, 2017.
18. BOWEN, J.M et al. VSL#3 probiotic treatment reduces chemotherapy-induced diarrhea and weight loss. **Cancer Biol Ther**, vol. 6, p. 1449–54, 2007
19. CABALLERO-FRANCO, C et al. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, vol. 292, p. 315–322, 2007
20. CAMILLERI, M et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 24, n. 6, p. 503-12, 2012.
21. CARVALHO, R.D et al. Secretion of biologically active pancreatitis-associated protein I (PAP) by genetically modified dairy *Lactococcus lactis* NZ9000 in the prevention of intestinal mucositis. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, 1-11, 2017.
22. CASSIDY, S; SYED, B. A. Colorectal cancer drugs market. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 16, n. 8, p. 525-526, 2017.
23. CAWLEY, E.P et al. An examination of skin from patients with collagen disease utilizing the combined Alcian blue-periodic acid Schiff stain. **Journal of Investigative Dermatology**, vol. 27, n. 6, p. 389–394, 1956.
24. CHANG, C.T et al. 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- $\kappa$ B activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. **Plos One**, v.7, n. 3, p 1-8, 2012.
25. CHANG, C.W et al. *Lactobacillus Casei* Variety *rhamnosus* Probiotic Preventively Attenuates 5-Fluorouracil/Oxaliplatin-Induced Intestinal Injury in a Syngeneic Colorectal Cancer Model. **Frontiers in Microbiology**, vol. 9, p. 983, 2018.
26. CHEN, L.L et al. Efficacy profiles for different concentrations of *Lactobacillus acidophilus* in experimental colitis. **World J Gastroenterol**, vol.19, n. 32, p. 5347-5356, 2013.
27. CHENG, L.K et al. Gastrointestinal system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 65–79, 2010.
28. CHENG, Y et al. Molecularly targeted drugs for metastatic colorectal cancer. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 7, p. 1315–1322, 2013.
29. CINAUSERO, M et al. New Frontiers in the Pathobiology and Treatment of Cancer Regimen-Related Mucosal Injury. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 354, p. 1-17, 2017.
30. CIOBANU, L et al. Rifaximin modulates 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis in rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, vol. 20, p. 4993-5001, 2016.
31. CLARE, D. A et al. Biodefence properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p.1239–1255, 2003
32. COLLING, C. Pacientes Submetidos à Quimioterapia: Avaliação Nutricional Prévia. **Revista Brasileira de Cancerologia**, vol. 58, n. 4, p. 611-617, 2012.
33. CORSELLO, G et al. Preventive Effect of Cow’s Milk Fermented with *Lactobacillus paracasei* CBA L74 on Common Infectious Diseases in Children: A Multicenter Randomized Controlled Trial. **Nutrients**, vol. 9, n. 669, p. 1-15, 2017
34. CROMBIE, J; LONGO, D.L. Principles of Cancer Treatment. In: **Clinical Cardio-Oncology**. Elsevier, p.1-13, 2016.

35. DAI, C. VSL#3 probiotics exerts the anti-inflammatory activity via PI3k/Akt and NF- $\kappa$ B pathway in rat model of DSS-induced colitis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, vol. 374, p.1–11, 2013.
36. DANIELE, B et al. Effect of chemotherapy with 5-fluorouracil on intestinal permeability and absorption in patients with advanced colorectal cancer. **Journal of Clinical Gastroenterology**, vol. 32, n. 3, p.228-30, 2001
37. DUAR, R.M et al. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.41 (Supp\_1), p. S27-S48, 2017.
38. DUNCAN, M; GRANT, G. Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.18, n. 9, p. 853-74, 2003.
39. EBRINGER, L et al. Beneficial Health Effects of Milk and Fermented Dairy Products – Review, **Folia Microbiol**, vol.53, n. 5, p.378–394, 2008.
40. EDUARDO, F.P et al. Impact of Oral and Gastrointestinal Mucositis on Body Weight Alterations during Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Nutrition and Cancer**, vol. 70, n.2, p. 1-8, 2017
41. EWASCHUK J.B et al. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, vol. 295, n. 5, p. 1025-34, 2008.
42. FANG, S.B et al. Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG upregulate gene expression of pro-inflammatory cytokines in 5-fluorouracil-pretreated Caco-2 cells. **Supportive Care Cancer**, v.22, n. 6, p. 1647-54, 2014.
43. FERRARIS, R. P.; VINNAKOTA, R. R. The time course of adaptation of intestinal nutrient uptake in mice is independent of age. **J. Nutr**, v.125, n.8, p.2172-2182,1995.
44. FERREIRA, T.M et al. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. **Lipids**, vol. 47, p. 669-678, 2012.
45. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION -FAO/WHO. 2002. Guidelines for evaluation of probiotics in food. Disponível em: <[http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)>. Acessado em 10 de janeiro de 2018.
46. FORBES J.D et al. The Gut Microbiota in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. **Frontiers in Microbiology**, vol.7, p. 1081, 2016.
47. GAO, K et al. Immunomodulation and signaling mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* GG and its components on porcine intestinal epithelial cells stimulated by lipopolysaccharide. **Journal of Microbiology Immunology Infection**, v. 14, n. 5, p. 1684-1182, 2015.
48. GAREAU, M.G et al. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.7, n. 9, p. 503–514, 2010.
49. GRANIER, A et al. Fermentation products: immunological effects on human and animal models. **Pediatr.Res**, vol. 74, p. 238–244, 2013.
50. GENEROSO, S.V et al. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. **European Journal of Nutrition**, v. 50, p. 261-269, 2011.
51. GOSMANN, C et al. *Lactobacillus*-Deficient Cervicovaginal Bacterial Communities Are Associated with Increased HIV Acquisition in Young South African Women. **Immunity**, v. 46, n. 1, p. 29-37, 2017.



52. GUARNER, F. Enteric flora in health and disease. **Digestion**, v. 73, p. 5-12, 2006.
53. HALDER, D et al. Indigenous Probiotic Lactobacillus Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria. **Biomedicines**, v. 5, n. 31, p. 1-11, 2017.
54. HAMOUDA, N et al. Apoptosis, Dysbiosis and Expression of Inflammatory Cytokines are Sequential Events in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 121, n. 3, p. 159-168, 2017.
55. HE, X et al. Lactobacillus rhamnosus GG supernatant enhance neonatal resistance to systemic Escherichia coli K1 infection by accelerating development of intestinal defense. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-13, 2017.
56. HEIDELBERGER, C et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. **Nature**, v. 179, n. 4561, p. 663-666, 1957.
57. HELLER, K.J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **Am J Clin Nutr**, vol. 73(2 Suppl):374S-379S, 2001
58. HEMARAJATA, P; VERSALOVIC, J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 39–51, 2013.
59. HILL, C et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, vol. 11, p. 506–514, 2014.
60. HOLLERAN, G et al. Gut microbiota and inflammatory bowel disease: so far so gut. **Minerva Gastroenterol Dietol**, vol. 63, p.373–384, 2017
61. HOOPER, L.V et al. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1268-73, 2012.
62. HUEBNER, E.S; SURAWICZ, C.M. Probiotics in the prevention and treatment of gastrointestinal infections. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 355-65, 2006.
63. HUGO A.A et al. Lactobacillus delbrueckii subsp lactis (strain CIDCA 133) resists the antimicrobial activity triggered by molecules derived from enterocyte-like Caco-2 cells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 335-40, 2010.
64. HUGO, A.A et al. Lactobacillus delbrueckii subsp lactis strain CIDCA 133 inhibits nitrate reductase activity of Escherichia coli. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 191-6, 2006.
65. HUGO, A.A et al. Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic Escherichia coli in vitro. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 613-9, 2008.
66. HUGO, A.A et al. Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis (strain CIDCA 133) stimulates murine macrophages infected with Citrobacter rodentium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n.3, p. 3-10, 2017.
67. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA-INCA. 2018. Câncer. Disponível em: < [http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acessado em 28 de dezembro de 2018.
68. JACOUTON, E et al. Probiotic Strain Lactobacillus casei BL23 Prevents Colitis-Associated Colorectal Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1-10, 2017.
69. JANDHYALA, S.M et al. role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8787-8803, 2015.

70. JEONG, J.J et al. Lactobacillus plantarum C29 alleviates NF- $\kappa$ B activation and Th17/Treg imbalance in mice with TNBS-induced colitis. **Food and Agricultural Immunology**, p. 1-12, 2018.
71. JOHANSSON, M.A et al. Probiotic Lactobacilli Modulate Staphylococcus aureus-Induced Activation of Conventional and Unconventional T cells and NK Cells. **Frontiers in Immunology**, v.7, p. 1-15, 2016.
72. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
73. JUSTINO, P. F. C et al., Treatment with Saccharomyces boulardii reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Nutrition**, vol. 111, n. 9, p. 1611-1621, 2014.
74. JUSTINO, P.F 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. 559-67, 2015.
75. JUNG, Y, ROTHENBERG, M.E. Roles and regulation of gastrointestinal eosinophils in immunity and disease. *J Immunol*, vol. 193, n. 3, p. 999-1005, 2014.
76. KACI, G et al. Inhibition of the NF- $\kappa$ B Pathway in Human Intestinal Epithelial Cells by Commensal Streptococcus salivarius. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4681-4684, 2011.
77. KATO, S et al. Probiotic Bifidobacterium bifidum G9-1 attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice via suppression of dysbiosis-related secondary inflammatory responses. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, vol.44, p.1017-1025, 2017.
78. KAWASHIMA, T et al. The molecular mechanism for activating IgA production by Pediococcus acidilactici K15 and the clinical impact in a randomized trial. **Scientific Reports**, vol. 8, n. 5065, p. 1-9, 2018.
79. KEEF, D.M. Intestinal mucositis: mechanisms and management. **Current Opinion in Oncology**, v.19, n. 4, p. 323-327, 2007.
80. KIKUCHI, Y et al. Oral Administration of Lactobacillus plantarum Strain AYA Enhances IgA Secretion and Provides Survival Protection against Influenza Virus Infection in Mice. **PLoS ONE**, vol. 9, n.1, p. e86416, 2014.
81. KOCIUBINSKI, G.L et al. A Method of Screening for Highly Inhibitory Lactic Acid Bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 59. n.7, p. 739-745, 1996.
82. KOCIUBINSKI, G et al. Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 8, p. 905-12,1999.
83. KOLACZKOWSKA, E; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, vol.13, p. 159-175, 2013.
84. KÖNIG, J et al. Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 7, n. 10, p. e196, 2016
85. KORHONEN, H; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **Int. Dairy J.** v. 16, n.9, p. 945-960, 2006
86. LANE, E.R et al. The microbiota in inflammatory bowel disease: current and therapeutic insights. **Journal of Inflammation Research**, v. 10, p. 63-73, 2017.
87. LEE, B et al. Attenuation of colitis by Lactobacillus casei BL23 is dependent on the dairy delivery matrix. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 6425-6435, 2015.

88. LEE, C.S et al. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: The role of inflammation. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 14, p. 3751–3761, 2014.
89. LÉPINE, F.A et al. Lactobacillus acidophilus attenuates Salmonella-induced stress of epithelial cells by modulating tight-junction genes and cytokine responses. **Frontiers in Microbiology**, 2018.
90. LEVIT, R et al. Protective effect of the riboflavin-overproducing strain *lactobacillus plantarum* CRL 2130 on intestinal mucositis in mice: Riboflavin-overproducing strain vs.intestinal mucositis. **Nutrition**, p. 2018.
91. LI, H.L et al. Alteration of Gut Microbiota and Inflammatory Cytokine/Chemokine Profiles in 5-Fluorouracil Induced Intestinal Mucositis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.7, n. 455, p. 1-14, 2017.
92. LILBURN, T.G; GARRITY, G.M. Exploring prokaryotic taxonomy. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54(Pt 1), p. 7-13, 2004.
93. LOGAN, R.M et al. Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. **Oral Oncology**, v. 43, n. 4, p. 395-401, 2007.
94. LONGLEY, D.B et al. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330-338.
95. MACK, D.R et al. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro. **Gut**, vol. 52, p. 827–833, 2003.
96. MACK, D.R et al. Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. **American Journal of Physiology**, vol. 276, p. 941–50, 1999.
97. MACK, D.R. Probiotics in inflammatory bowel diseases and associated conditions. **Nutrients**, v.3, n. 2, p. 245-64, 2011.
98. MAEDA, T et al. Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.65, p.1117–1123, 2010
99. MANTIS, N.J et al. Secretory IgA's Complex Roles in Immunity and Mucosal Homeostasis in the Gut. **Mucosal immunology**, vol.4, n.6, p.603-611, 2011
100. MARIN, J.J et al. Chemoprevention, chemotherapy, and chemoresistance in colorectal cancer. **Drug Metabolism Reviews**, v. 44, n. 2, p.148-72, 2012.
101. MARLEY, A.R; NAN, H. Epidemiology of colorectal cancer. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, v. 7, n. 3, p. 105–114, 2016.
102. MARSHMAN, E et al. The intestinal epithelial stem cell. **Bioessays**, v. 4, n. 1, p. 91-8, 2002.
103. MARTINS, C.C et al. Pharmacokinetic Individualization of 5-Fluorouracil Doses in Colorectal Cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 59, n. 2, p. 271-280, 2013.
104. MARTINS, F.S et al. Comparative study of Bifidobacterium animalis, Escherichia coli, Lactobacillus casei and Saccharomyces boulardii probiotic properties. **Archives in Microbiology**, v. 191, n. 8, p. 623-630, 2009.
105. MARYA, D.T et al. Characterization and Antioxidant Activity of Fermented Milk Produced with a Starter Combination. **Pakistan Journal of Nutrition**, vol. 16, p. 451-456, 2016
106. McCARTHY, G.M et al. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-Fluorouracil. **Oral Oncology**, v.34, n.6, p.484-90, 1998.

- 107.MEGO, M et al. Prevention of irinotecan induced diarrhea by probiotics: A randomized double blind, placebo controlled pilot study. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 23, n. 3, p. 356-362, 2015.
- 108.MIURA, K et al. 5-FU metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs. **Cancers**, vol. 2, n. 3, p.1717-1730, 2010.
- 109.MOHAMED, H.A.F. 5-Fluorouracil–Induced Cardiotoxicity During Chemotherapy for Adenocarcinoma of the Small Bowel. **Gastrointestinal Cancer Research**, vol. 3, n. 4, p.167–170, 2009.
- 110.MOKOENA, M.P. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1-13, 2017.
- 111.MONTEIRO, R.C. Immunoglobulin A as an anti-inflammatory agent. **Clinical and Experimental Immunology**, vol. 178(Suppl 1), p.108-110, 2014.
- 112.MORENO D ELEBLANC, A et al. Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on a murine breast cancer model. **Breast Cancer Res**, vol. 7, p. R477–R486, 2005
- 113.MOWAT, A.M, AGACE, W.W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews: Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667-85, 2014.
114. NALLE, S.C; TURNER, J.R. Intestinal barrier loss as a critical pathogenic link between inflammatory bowel disease and graft-versus-host disease. **Mucosal Immunology**, v. 8, n. 4, p. 720-30, 2015
- 115.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.
- 116.OLIVEIRA, G.L.V et al. Intestinal dysbiosis and probiotic applications in autoimmune diseases. **Immunology**, v. 152, n. 1, p. 1-12, 2017.
- 117.PANESAR, P.S. Fermented Dairy Products: Starter Cultures and Potential Nutritional Benefits. **Food and Nutrition Sciences**, v. 2, n. 1, 2011, p. 47-51.
- 118.PASTORELLI, L et al. Central Role of the Gut Epithelial Barrier in the Pathogenesis of Chronic Intestinal Inflammation: Lessons Learned from Animal Models and Human Genetics. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 280, p. 1-22, 2013.
- 119.PEREIRA, V.B.M et al. A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, vol.77, n. 2, p. 323-327, 2015.
- 120.PETERSON, D.E et al. Management of Oral and Gastrointestinal Mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. **Annals of Oncology**, vol. 22, Suppl 6, p. vi78–vi84, 2011.
- 121.PETERSON, L.W; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 141-53, 2014.
- 122.PHILLIPS, E et al. Mucositis and Cardiotoxicity Due to 5-Fluorouracil. **American Journal of Therapeutics**, p. 1-2, 2018.
- 123.PLAZA-DÍAZ, J et al. Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Chronic Diseases. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 1-19, 2017.
- 124.PRESTI, I et al. Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their in vitro effect. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 13, p. 5613-26, 2015.

125. PRISCIANDARO, L.D et al. Probiotic factors partially prevent changes to caspases 3 and 7 activation and transepithelial electrical resistance in a model of 5-fluorouracil-induced epithelial cell damage. **Supportive Care in Cancer**, v. 20, n.12, p. 3205-10, 2012.
126. REED, K.K; WICKHAM, R. Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 25, n. 1, p 3-14, 2009.
127. RESCIGNO, M. Mucosal immunology and bacterial handling in the intestine. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 27, n. 1, p.17-24, 2013.
128. ROCHA, C.S et al. Local and systemic immune mechanisms underlying the anti-colitis effects of the dairy bacterium *Lactobacillus delbrueckii*. **Plos One**, v.9, n. 1, p. 1-8, 2014.
129. ROCHA-RAMÍREZ, L.M et al. Probiotic *Lactobacillus* Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 1-14, 2017.
130. ROCHAT, T et al. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 22, p. 1-10, 2007.
131. ROLNY, I.S et al. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133 modulates response of human epithelial and dendritic cells infected with *Bacillus cereus*. **Beneficial Microbes**, v. 7, n. 5, p. 749-760, 2016.
132. ROOKS, M.G; GARRETT, W.S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. **Nature Reviews: Immunology**, v. 16, n. 6, p. 341-52, 2016.
133. SAILAJA, B.S et al. The regulatory niche of intestinal stem cells. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 17, p. 4827-36, 2016.
134. SALVETTI, E; O'TOOLE, P.W. The genomic basis of *Lactobacilli* as health-promoting organisms. **Microbiol Spectrum**, v. 5, n. 3, p. 1-17, 2017.
135. SALVO-ROMERO, E et al. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. **Revista Espanola De Enfermedades Digestivas**, v. 107, n. 11, p. 686-696, 2015.
136. SHETH, P et al. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in oxidative stress-induced disruption of tight junctions. **J. Biol. Chem**, v.278, n.49, p.49239-49245, 2003.
137. SHI, Y et al. Restoration of cefixime-induced gut microbiota changes by *Lactobacillus* cocktails and fructooligosaccharides in a mouse model. **Microbiological Research**, v. 200, p. 14-24, 2017.
138. SHIELDS, M. Chemotherapeutics. In: *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies*. **Academic Press**, p. 295-313, 2017.
139. SHREINER, A.B et al. The gut microbiome in health and in disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, n. 31, v. 1, p. 69-75, 2015.
140. SINGH, B.P et al. Antimicrobial activity of bioactive peptides derived from fermentation of soy milk by *Lactobacillus plantarum* C2 against common foodborne pathogens. **International Journal of Fermented Foods**, v.4, n.1-2, p. 91-99, 2015
141. SLOVER, C.M. *Lactobacillus*: a Review. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 30, n. 4, p. 23-27, 2008.
142. SMITH, C.L et al. *Lactobacillus fermentum* BR11 and fructo-oligosaccharide partially reduce jejunal inflammation in a model of intestinal mucositis in rats. **Nutrition and Cancer**, v.60, n. 6, p. 757-67, 2008.

143. SOARES, P.M et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, vol. 63, p. 91–98, 2008.
144. SOARES, P.M et al. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine**, vol. 61, n. 1, p. 46-9, 2013.
145. SOCCOL, C.R et al. The Potential of Probiotics: A Review. **Food Technol. Biotechnol**, v. 48, n. 4, p. 413–434, 2010.
146. SONG, J.J et al. Effects of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* LIP-1 on the gut microbiota of hyperlipidaemic rats. **British Journal of Nutrition**, vol.118, p. 481-492, 2017
147. SONG, M et al. Wheat bran arabinoxylan supplementation alleviates 5-fluorouracil induced mucositis and myelosuppression in BALB/c mice. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 312-320, 2016.
148. SONG, MK et al., 5-Fluorouracil-Induced Changes of Intestinal Integrity Biomarkers in BALB/C Mice. **Journal of Cancer Prevention**, vol. 18, n. 4, p. 322-329, 2013
149. SONIS, S.T. The pathobiology of mucositis. **Nature Reviews Cancer**, vol.4, n. 4, p. 277-284, 2004.
150. SOUZA, D.G et al. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, n. 8, p. 1800–1808, 2000.
151. SOVERI, L.M et al. Association of adverse events and survival in colorectal cancer patients treated with adjuvant 5-fluorouracil and leucovorin: Is efficacy an impact of toxicity? **European Journal of Cancer**, vol. 50, n. 17, p. 2966-74, 2014.
152. STRATH, M; SANDERSON, C.J. Production and functional properties of eosinophils from bone marrow cultures. **The Journal of Cell Biology**, v. 74, p. 207-217, 1985.
153. STRINGER, A.M et al. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. **Experimental Biology and Medicine**, vol.234, p. 430–441, 2009
154. STRINGER, A.M. Interaction between host cells and microbes in chemotherapy-induced mucositis. **Nutrients**, v. 5, n. 5, p.1488-99, 2013.
155. TAMANG, J.P et al. Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Front. Microbiol*, vol. 7, n. 578, p. 1-13, 2016
156. TEZUKA, H et al. Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 247-57, 2011.
157. THOMAS, S.A et al. Adverse effects of 5-fluorouracil: Focus on rare side effects. **Cancer Cell & Microenvironment**, v. 3, n. 2, p. e1266-1270, 2016.
158. THURSBY, E; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 11, p. 1823–1836, 2017.
159. TRINDADE, L.M et al. Oral administration of Simbioflora® (synbiotic) attenuates intestinal damage in a mouse model of 5-fluorouracil-induced mucositis. **Beneficial Microbes**, v. 9, p.477-486, 2018.
160. TROTTI, A et al. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. **Radiotherapy and Oncology**, v. 66, n. 3, p. 253-62, 2003.
161. TURNER, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews: Immunology**, v. 9, n. 11, p. 799-809, 2009.

162. USINGER, L et al. The antihypertensive effect of fermented milk in individuals with prehypertension or borderline hypertension. *Journal of Human Hypertension*, vol. 24, p. 678–683, 2010.
163. UNDERWOOD, M.A. Probiotics and Innate and Adaptive Immune Responses in Premature Infants. **Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics**, v. 7, n. 1-2, p. 1-15, 2016.
164. VANCAMELBEKE, M; VERMEIRE, S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 9, p. 821-834, 2017.
165. VANLANCKER, E et al. 5-Fluorouracil and irinotecan (SN-38) have limited impact on colon microbial functionality and composition in vitro. **Peer Journal**, vol. 5, p. e4017, 2017.
166. VILLA, A; SONIS, S.T. Mucositis: pathobiology and management. **Current Opinion in Oncology**, v.27, n. 3, p. 159-64, 2015.
167. VLIET, M. J et al. The Role of Intestinal Microbiota in the Development and Severity of Chemotherapy-Induced Mucositis. **Plos Pathogens**, v. 6, n. 5, p. 1-7, 2010.
168. VON BULTZINGSLOWEN, I et al. Oral and intestinal microflora in 5-fluorouracil treated rats, translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotic bacteria. **Oral Microbiol Immunol**, vol. 18, p. 278–84, 2003
169. WALTER, J; LEY, R. The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 65, p. 411-429, 2011.
170. WANG, M et al. Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: a realistic therapeutic option. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5691-701, 2016.
171. WANG, Y et al. Cancer therapy-induced residual bone marrow injury-Mechanisms of induction and implication for therapy. **Current Cancer Therapy Reviews**, vol. 2, n. 3, p. 271–279, 2006.
172. WOODRUFF, S.A et al. Role of eosinophils in inflammatory bowel and gastrointestinal diseases. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, vol. 52, n. 6, p. 650-661, 2011.
173. WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. 2018. Fact sheets-Cancer. Disponivel em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acessado em 23 de dezembro de 2018.
174. WIDYASTUTI, Y et al. The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. **Food and Nutrition Sciences**, vol. 5, p. 435-442, 2014.
175. WU, Z.Q et al. Interleukin-1 receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-fluorouracil chemotherapy model in mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 68, n.1, p. 87-96, 2011.
176. YEUNG, C.Y et al. Amelioration of Chemotherapy-Induced Intestinal Mucositis by Orally Administered Probiotics in a Mouse Model. **Plos One**, v. 10, n. 9, p. 1-16, 2015.
177. YEUNG, C.Y et al. In vitro prevention of Salmonella lipopolysaccharide-induced damages in epithelial barrier function by various lactobacillus strains. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2013, p. 1-6, 2013.
178. YOUNG, S.B et al. O metotrexato modula as junções apertadas através das vias NF-κB, MEK e JNK. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, vol. 54, p. 463-470, 2012.
179. YU, J. Intestinal stem cell injury and protection during cancer therapy. **Translational Cancer Research**, v. 2, n. 5, p. 384–396, 2013.
180. ZHANG, N et al. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. **Molecules**, vol.13, n.8, p. 1551-1569, 2008.